

50376
1983
37
N° d'ordre : 590

50376
1983
37

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES-SCIENCES

Option : Sciences Naturelles

par

Christiane DELBART

**SPHINGOLIPIDES ET DYNAMIQUE MEMBRANAIRE :
SUPPORTS DE LA REACTION D'INCOMPATIBILITE
GAMETOPHYTIQUE DE FECONDATION**



Soutenu le 28 Juin 1983 devant la Commission d'Examen

Melle et Messieurs :

D. COUSTAUT
B. FOURNET
H.F. LINSKENS
P. MAZLIAK
G. REBEL
P. VERNET

A MES PARENTS

*L'aboutissement de ce travail nous donne
l'occasion de témoigner notre respectueuse gratitude
aux Membres du Jury de Thèse, et notre profonde
reconnaissance à tous ceux qui nous en ont permis la
réalisation.*

A MADEMOISELLE LE PROFESSEUR COUSTAUT

En m'accueillant en octobre 1975 dans votre laboratoire, vous m'avez donné la chance inestimable de pouvoir me passionner pour cette "Autoincompatibilité de fécondation" qui vous tient tant à coeur. Je voudrais vous exprimer ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez toujours accordée. Vos conseils avisés, vos critiques des plus constructives, ainsi que vos encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je vous prie de trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance et de mon attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LINSKENS

Les travaux mondialement connus que vous effectuez dans le domaine de la biologie de la reproduction prouvent l'intérêt que vous portez à ce sujet. Sans vous et sans les Petunia que vous me confiez chaque année, ce travail n'aurait pu se faire. Je vous le dois.

Vous m'avez déjà fait le plaisir de juger ma thèse de 3ème Cycle. Je ressens avec fierté l'honneur que vous me faites une seconde fois en acceptant de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma déférente gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR FOURNET

Je vous suis redevable de l'aide que vous m'avez toujours spontanément offerte. Vous m'avez fait profiter, avec beaucoup de gentillesse et de disponibilité, de votre expérience dans le domaine de la structure des sucres. Je suis très heureuse que vous ayez bien voulu juger ce travail et je tiens à vous exprimer ici ma très vive reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR VERNET

*Vous m'avez toujours accueillie avec
bienveillance et je suis très sensible à
l'intérêt que vous n'avez cessé de porter à
mon travail. Je vous prie de bien vouloir
trouver ici l'expression de ma respectueuse
gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MAZLIAK

*Vous avez accepté de me faire profiter
de votre haute compétence en jugeant ce
travail. Je vous prie de trouver ici les
marques de ma profonde considération et
de ma vive reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR REBEL

*Je suis très sensible à l'honneur que
vous me faites en acceptant de juger
aujourd'hui ce travail. Qu'il me soit permis
de vous adresser mes remerciements les plus
sincères et ma respectueuse gratitude.*

Mes chaleureux remerciements iront également à tous ceux qui m'ont aidée dans l'élaboration de ce travail et tout spécialement :

MONSIEUR A. NOUVELOT

nos sujets de recherche relativement proches ont fait souvent naître de fructueux échanges et ont renforcé les liens d'une profonde amitié.

MONSIEUR B. ERIS

qui tout au long de cette thèse m'a fait bénéficier de ses connaissances, dans une collaboration étroite et fructueuse.

MONSIEUR J.C. MICHALSKI

qui m'a apporté gentiment son précieux concours pour l'analyse en spectrométrie de masse.

MONSIEUR B. HOFLACK

auprès de qui j'ai toujours trouvé une aide morale et matérielle dans les circonstances difficiles.

MADAME I. DEVRED

dont la précieuse collaboration technique, pour laquelle elle n'a ménagé ni son temps ni son dévouement, est pour moi le gage d'une amitié sincère.

MESDAMES M. LETERME ET J. TRUYEN

pour leur aide efficace et amicale lors de la dactylographie de cette thèse.

Enfin je ne pourrais terminer sans remercier tous mes amis que je ne peux citer mais qui se retrouveront dans ces lignes.

Ce travail a débuté en octobre 1975 et a été réalisé sous la direction de Mademoiselle le Professeur COUSTAUT dans le Laboratoire de Biologie cellulaire de l'U.E.R. de Pharmacie de Lille II.

Il a bénéficié de l'aide du Professeur LINSKENS de l'Université de Nimègue (Pays Bas) qui nous a fourni le matériel génétique, de celle du Professeur VERNET de l'Université de Lille I et de celle du C.T.B.-I.N.S.E.R.M. du Docteur MOSCHETTO auquel le Laboratoire de Biologie cellulaire est associé.

ABREVIATIONS

AIS	: autoincompatibilité sporophytique
AIG	: autoincompatibilité gamétophytique
ATP	: adénosine tri-phosphate
GSL	: glycosphingolipides
Cer	: céramide
MGCer	: monoglycosylcéramide
DGCer	: diglycosylcéramide
TGCer	: triglycosylcéramide
TRGCer	: tétraglycosylcéramide
TSH	: hormone thyroïdienne
HCG	: hormone gonadotrophine chorionique
LH	: hormone lutéinisante
FSH	: hormone folliculo-stimulante
cAMP	: adénosine monophosphate cyclique
cGMP	: guanosine monophosphate cyclique
GM ₁	: monosialoganglioside
GD _{1b}	: disialoganglioside
GT	: trisialoganglioside
ConA	: concanavaline A
SL	: sulfolipide
PE	: phosphatidyléthanolamine
PC	: phosphatidylcholine
PS	: phosphatidylsérine
PI	: phosphatidylinositol
C	: cholestérol
PL	: phospholipides
GCL	: glycérolipides
HPLC	: chromatographie liquide à haute pression
GLC	: chromatographie en phase gazeuse
BLC	: base à longue chaîne
CCM	: chromatographie en couche mince

INTRODUCTION

GENERALITES

CHAPITRE I	: LES SYSTEMES D'AUTOINCOMPATIBILITE DE FECONDATION	10
I	: <u>INTRODUCTION</u>	10
II	: <u>INCOMPATIBILITE DE FECONDATION HETEROMORPHIQUE</u>	11
III	: <u>INCOMPATIBILITE DE FECONDATION HOMOMORPHIQUE</u>	12
A	- DETERMINISME GENETIQUE DES SYSTEMES D'INCOMPATIBILITE	12

a)	Autoincompatibilité gamétophytique de fécondation	12
b)	Autoincompatibilité sporophytique de fécondation	13
B	- RAPPEL SUCCINCT DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE CES	13

	DEUX SYSTEMES D'INCOMPATIBILITE	

a)	Cytologie du pollen et incompatibilité	13
b)	Surface stigmatique et incompatibilité	14
c)	Localisation de la réaction de rejet et	15
	d'incompatibilité	
d)	Stade de détermination et incompatibilité	16
e)	Récapitulation de la classification des systèmes	16
	d'autoincompatibilité	
C	- NATURE DES INTERACTIONS DANS LES SYSTEMES INCOMPATIBLES	17

CHAPITRE II	: BASES MOLECULAIRES ET STRUCTURALES DE LA RECONNAISSANCE	
	CELLULAIRE CHEZ LES ANIMAUX	21
I	: <u>INTRODUCTION : MODELISATION DE RECONNAISSANCE</u>	21
	<u>CELLULAIRE</u>	

A - DEFINITION FONCTIONNELLE DU RECEPTEUR -----	22
B - DEFINITION FONCTIONNELLE DU RELAIS TRANSMEMBRANAIRE -----	23
C - DEFINITION FONCTIONNELLE DE L'INDUCTEUR-EMETTEUR -----	23
II : <u>LA MEMBRANE : SA MODELISATION</u>	24
A - INSERTION DE PROTEINES DANS UNE MATRICE LIPIDIQUE -----	24
B - ASYMETRIE DE LA MEMBRANE -----	25
C - FLUIDITE MEMBRANAIRE -----	25
D - MOBILITE DES COMPOSANTS MEMBRANAIRES -----	26
a) Mobilité des protéines	26
b) Mobilité des lipides et glycolipides	27
III : <u>GLYCOCONJUGUES : BASE MOLECULAIRE DU RECEPTEUR</u>	27
A - EXIGENCE DE LA LIAISON LIGAND-RECEPTEUR -----	28
B - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUES -----	29
a) Les glycolipides membranaires	29
a1) Les GSL neutres	29
a2) Les GSL acides	30
b) Les glycoprotéines membranaires	30
c) Signification de l'identité structurale des glycoconjugués	31
C - GLYCOCONJUGUES ET SIGNAUX DE RECONNAISSANCE -----	32
a) Marqueurs antigéniques des hématies	32
b) Marqueurs de différenciation	33
D - GLYCOCONJUGUES ET RECEPTION DES SIGNAUX -----	34
a) Récepteurs de virus	34
b) Récepteurs de molécules solubles	34

IV - <u>INITIATION DE LA REPOSE INTRACELLULAIRE : LE SECOND</u>	35
<u>MESSAGER</u>	
A - ACTIVATION DES ENZYMES PERIPHERIQUES ET PRODUCTION ----- DE NUCLEOTIDES CYCLIQUES -----	36
a) Nucléotides cycliques : éventuel second messenger	36
b) Couplage fonctionnel : récepteur-adénylcyclase	36
b1) Réception de toxines	36
b2) Réception des hormones	37
c) Couplage fonctionnel : récepteur-guanylcyclase	37
B - ACTIVATION D'ENZYMES PERIPHERIQUES ET MODIFICATION ----- DE LA PERMEABILITE AUX IONS -----	37
a) Perméabilité aux ions $\text{Na}^+ + \text{K}^+$	38
b) Perméabilité aux ions Calcium Ca^{2+}	38
C - MIGRATION DU LIGAND EXTRACELLULAIRE VERS LE COMPARTIMENT ----- INTRACELLULAIRE -----	39
V - <u>EXIGENCE DU RELAIS TRANSMEMBRANAIRE</u>	40
A - EVIDENCE D'UN CONTROLE TRANSMEMBRANAIRE -----	40
a) Contrôle de la mobilité des récepteurs	41
a1) Modulation et amplification de l'information	41
a2) Ancrage de l'information	42
b) Contrôle de la coordination reconnaissance-réponse	43
b1) Récepteurs couplés au cAMP-cGMP	44
b2) Récepteurs couplés aux ions	44
b3) Récepteurs couplés aux phénomènes de phagocytose	45
b4) Conclusion	45
B - CONTROLE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE -----	46
a) Optimisation de la fluidité des chaînes aliphatiques	46
b) Contrôle des ponts hydrogène dans la zone intermédiaire	47

CHAPITRE III : ASPECT MOLECULAIRE DE LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE
CHEZ LES PLANTES

	49
I : <u>INTRODUCTION</u>	49
II : <u>STRUCTURE DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE VEGETALE</u>	49
A - STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE	50

B - STRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE	52

III : <u>MODALITE D'UN EVENTUEL MECANISME DE RECONNAISSANCE</u>	55
<u>CHEZ LES VEGETAUX</u>	
A - COMMUNICATIONS AU NIVEAU DES PLASMODESMES	55

B - INTERACTIONS COMPLEMENTAIRES AU NIVEAU DE LA PAROI	56

C - TRANSMISSION PASSIVE DU SIGNAL DE RECONNAISSANCE DE	

LA PAROI VERS LA MEMBRANE PLASMIQUE	56

D - CONCLUSION	57

IV : <u>MOLECULES IMPLIQUEES EVENTUELLEMENT DANS LA DISCRIMINATION</u>	
<u>" SOI -NON SOI" DES VEGETAUX</u>	58
A - LES LECTINES	59

B - LES PHYTOALEXINES	60

C - LES COMPOSANTS DE LA PAROI CELLULAIRE	61

a) Les arabinogalactanes	61
b) Les arabinoxylanes	61
D - LES ALLERGENES	61

E - LES DETERMINANTS CELLULAIRES	62

V : <u>NATURE DES COMPOSES IMPLIQUES DANS LA RECONNAISSANCE</u>	
<u>POLLEN-PISTIL</u>	62
A - LES LECTINES	63

B - LES ARABINO GALACTANES	63

C - LES PROTEINES ET GLYCOPROTEINES	63

a) AIS et protéines de surface	64

a1) Protéines de la papille stigmatique	64
a2) Protéines du pollen	65
b) AIG et protéines de surface	66
b1) Protéines du pistil	66
b2) Protéines du pollen	67
VI : <u>CONCLUSION</u>	68

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I : HYPOTHESE DE TRAVAIL	71
I : <u>INTRODUCTION</u>	71
A - IMPORTANCE DE LA MATURITE DU PISTIL	71
B - IMPORTANCE DE LA MATURITE DU POLLEN	72
C - IMPORTANCE DE L'ADHESION	73
D - EXEMPLE D'UNE DOUBLE RECONNAISSANCE	74
II : <u>HYPOTHESE D'UN DOUBLE CONTROLE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE</u>	75
A - COMPOSANTS DU MODELE	75
a) Régulation de l'adhésion : système RA	75
b) Régulation de la sélection du gamétophyte : système RSG	76
c) AIS ou AIG : maturation des déterminants de surface	77
B - MODALITES DU CONTROLE DE L'AIS : RECONNAISSANCE	77
SIMULTANEE	
C - MODALITES DU CONTROLE DE L'AIG : RECONNAISSANCE	78
SEQUENTIELLE	
a) Interaction séquentielle : nécessité d'une maturation	78
des déterminants polliniques	

b) Modalités de la maturation d'un déterminant	79
b1) Clivage protéolytique d'un précurseur	79
b2) Maturation des chaînes glycaniques	80
D - MODALITES DE LA REPONSE INCOMPATIBLE	80

a) Dépôt de callose : sa signification	81
b) Modification de la perméabilité : sa signification	81
III : <u>CONCORDANCE AVEC LES RESULTATS PRECEDENTS</u>	82
A - ADHESION ET HYDRATATION	82

B - CONCORDANCE AVEC CERTAINES EXPERIENCES DE LEVEE	83

D'INCOMPATIBILITE FAISANT INTERVENIR L'EFFET MENTOR	

OU L'AGE DU POLLEN	

C - LEVEE DES BARRIERES D'INCOMPATIBILITE	84

D - EFFET MUTAGENE	85

E - EFFET DE LA TEMPERATURE	85

F - RESULTATS DE L'ANALYSE DES PROTEINES	85

IV : <u>POURQUOI UNE ANALYSE DES GSL DANS LES SYSTEMES A AIG</u>	86
A - ROLE DES GLYCOCONJUGUES	86

a) Rôle dans l'adhésion cellulaire	87
b) Rôle dans le contrôle de la croissance	87
c) Rôle dans le déclenchement de la mitose	88
d) Rôle dans la différenciation cellulaire	88
e) Contrôle de la perméabilité cellulaire	89
B - EVENTUELLE PARTICIPATION DES LIPIDES DANS L'AIG	90

CHAPITRE II : MATERIEL D'ETUDE	92

CHAPITRE III : ANALYSE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES	93
I : <u>INTRODUCTION</u>	93
II : <u>DISTRIBUTION DES GSL</u>	93
A - EVOLUTION DES GSL TOTAUX	94

B - EVOLUTION DES DIVERS GSL NEUTRES	94

C - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE	96

a) 24 heures de pollinisation	96
b) 8 heures de pollinisation	97
D - CONCLUSION	98

III : <u>COMPOSITION EN OSES</u>	99
IV : <u>COMPOSITION EN ACIDES GRAS</u>	100
A - COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES GSL NEUTRES TOTAUX	101

B - COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIVERS GSL	101

C - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE	102

D - CONCLUSION	104

V : <u>ANALYSE DE LA COMPOSITION EN BASES DE TYPE SPHINGOSINE</u>	105
A - COMPOSITION EN BASES DE TYPE SPHINGOSINE	105

B - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE	106

VI : <u>CONCLUSION</u>	107
CHAPITRE IV : ANALYSE DES SULFOLIPIDES	108
I : <u>INTRODUCTION</u>	108
II : <u>RESULTATS</u>	108
A - POLLINISATION ET SULFOLIPIDES	108

B - DISTRIBUTION DES ACIDES GRAS DES SULFOLIPIDES	109

C - DISTRIBUTION DES SPHINGOSINES DANS LES SULFOLIPIDES	111

III :	<u>INTERPRETATION DES RESULTATS</u>	112
A -	SULFOLIPIDES ET TRANSPORT ACTIF DES CATIONS	112
B -	REGULATION VISCOTROPIQUE DE LA PERMEABILITE AUX IONS	113
C -	REGULATION DU NOMBRE DE SITES TRANSPORTEURS	114
IV :	<u>CONCLUSION</u>	115
CHAPITRE V	: TRANSPORT ACTIF ET ACTIVITE DES Na ⁺ , K ⁺ ATPases	117
I :	<u>INTRODUCTION</u>	117
II :	<u>RESULTATS</u>	118
III :	<u>INTERPRETATION DES RESULTATS</u>	119
A -	(Na ⁺ + K ⁺) ATPase ET CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE	119
B -	COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET REGULATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE	120
C -	(Na ⁺ + K ⁺) ATPase ET TURN-OVER LIPIDIQUE	121
IV :	<u>CONCLUSION</u>	121
CHAPITRE VI	: ANALYSE DES GLYCEROLIPIDES	123
I :	<u>INTRODUCTION</u>	123
II :	<u>RESULTATS</u>	125
A -	EVOLUTION DES GLYCEROLIPIDES	126
a)	Les glycérolipides d' <i>Oenothera missouriensis</i>	126
b)	Les glycérolipides de <i>Petunia hybrida</i>	127
B -	EVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES	127
a)	Les phospholipides d' <i>Oenothera missouriensis</i>	127
b)	Les phospholipides de <i>Petunia hybrida</i>	127
C -	EVOLUTION DU RAPPORT PL/GCL	128

a)	Evolution du rapport PL/GCL chez <i>Oenothera</i>	128
b)	Evolution du rapport PL/GCL chez <i>Petunia</i>	129
III :	<u>INTERPRETRATION</u>	129
A -	RELATION AVEC LES CHAINES DE TRANSPORT D'ELECTRONS	130
B -	ROLE DANS LES REACTIONS DE TRANSPORT MEMBRANAIRE	131

CHAPITRE VII :	ANALYSE DES GSL ACIDES COMPLEXES	133
I :	<u>INTRODUCTION</u>	133
II :	<u>MISE EN EVIDENCE D'UN GLYCOLIPIDE ACIDE TRES COMPLEXE</u>	133
A -	MISE EN EVIDENCE D'UN GLYCOLIPIDE RESORCINOL-POSITIF	133
B -	ESSAIS DE CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES	135
a)	Hydrolyse acide	135
b)	Hydrolyse par la neuraminidase de <i>Vibrio cholerae</i>	136
c)	Caractérisation des acides sialiques après réaction	137
de WARREN		
d)	Analyse en spectre de masse du composé libéré	137
III :	<u>EVOLUTION DE CE GLYCOLIPIDE ACIDE AVEC LA POLLINISATION</u>	138
A -	RESULTATS	139
a)	Evolution au niveau des stigmates	139
b)	Evolution au niveau des styles	139
B -	INTERPRETATION	139
IV :	<u>EVOLUTION DES DIVERS GSL ACIDES</u>	140
A -	ANALYSE DES GSL ACIDES DES PISTILS VIERGES ET DU POLLEN	141
B -	EVOLUTION DU PROFIL DE REPARTITION DES GSL ACIDES EN	141
XENOPOLLINISATION		
C -	EVOLUTION DU PROFIL DE REPARTITION DES GSL ACIDES EN	142
AUTOPOLLINISATION		
D -	SIGNIFICATION BIOLOGIQUE	142

RESUME ET CONCLUSION

I	: <u>PHYSIOLOGIE DE L'INCOMPATIBILITE ET ACTIVITES</u>	145
	<u>MEMBRANAIRES</u>	
A	- GLYCOLIPIDES ET REGULATION DE CROISSANCE	146
B	- GLYCOLIPIDES : TEMOINS D'UN ETAT DE MATURATION	147
	<u>CELLULAIRE</u>	
C	- GLYCOLIPIDES : DETERMINANTS DE SURFACE	149
D	- GLYCOLIPIDES ET PERMEABILITE CELLULAIRE	149
E	- GSL, EXISTENCE ET AMPLIFICATION D'UN SIGNAL	152
II	: <u>INTEGRATION DES RESULTATS DANS UN MODELE METABOLIQUE</u>	154
	<u>EXPLICATIF DE L'AIG</u>	
III	: <u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE D'AVENIR</u>	158

BIBLIOGRAPHIE	164
---------------	-----

LISTE DES PUBLICATIONS CITEES DANS LES RESULTATS	197
--	-----

PUBLICATION I	198
PUBLICATION II	208
PUBLICATION III	219
PUBLICATION IV	230
PUBLICATION V	244
PUBLICATION VI	250

APPENDICE TECHNIQUE	
---------------------	--

INTRODUCTION

Le choix et la sélection des gamètes susceptibles de réaliser la fécondation sont des avantages acquis et perfectionnés par les végétaux au cours de l'évolution. Cette capacité de reconnaissance et de rejet assure le maintien de la stabilité de l'espèce, en défavorisant les croisements trop éloignés, et l'installation d'un degré raisonnable de variabilité génétique au sein de l'espèce en empêchant les croisements trop proches.

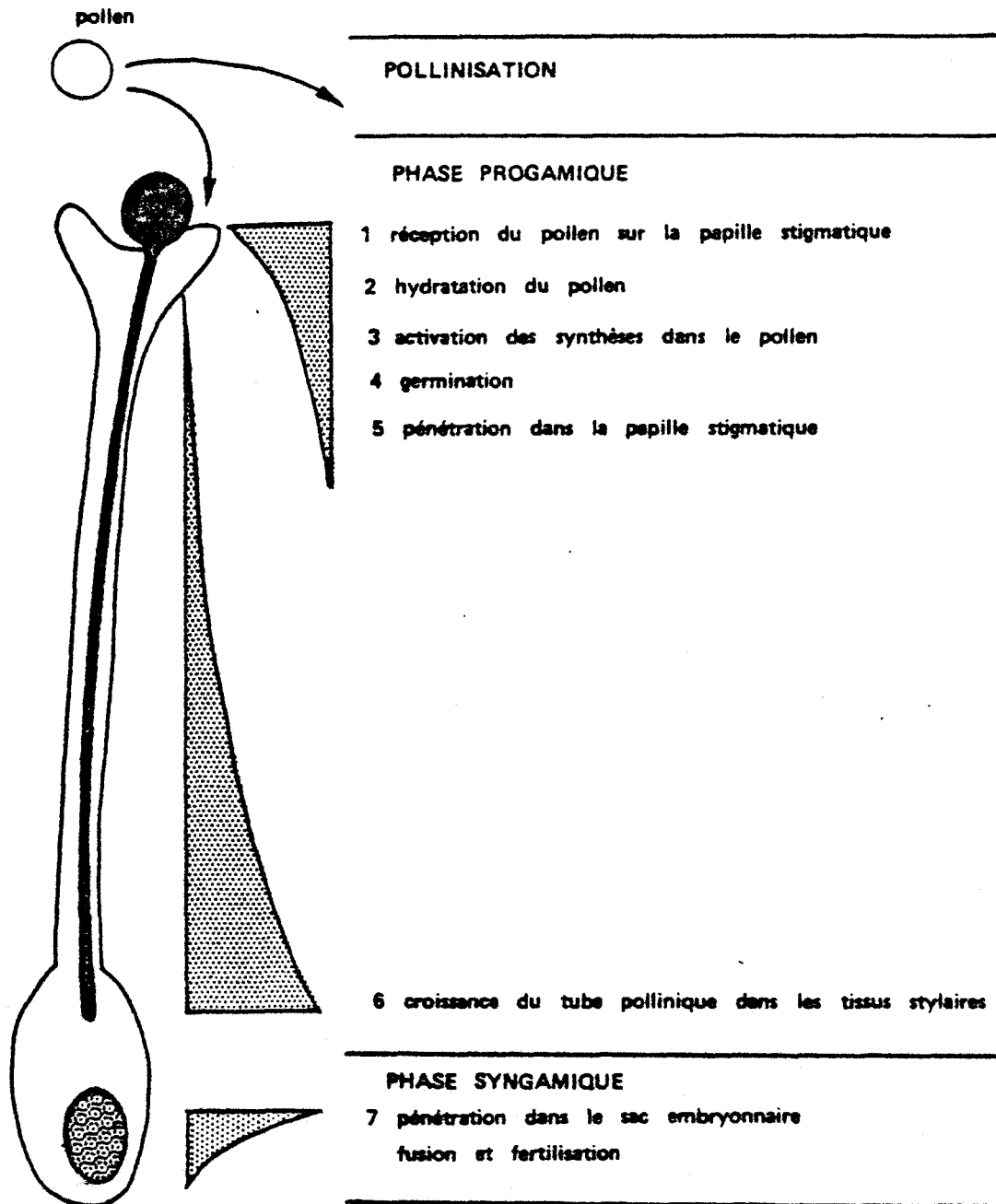
Comme la plupart des plantes (95%) sont hermaphrodites et produisent simultanément des gamètes mâles et femelles, le succès de la reproduction sexuée et le maintien d'un certain degré d'hétérozygotie au sein de l'espèce reposent essentiellement sur l'installation de mécanismes permettant la sélection des gamètes. Les systèmes de reproduction chez les végétaux sont donc programmés pour conférer, après sélection, aux gamètes non génétiquement identiques un avantage dans le processus de fertilisation. C'est le phénomène "d'auto-rejet" qui module la fécondation intraspécifique et qui se superpose au système plus large défavorisant la fécondation interspécifique.

Jusqu'à ce jour, le processus de sélection des gamètes compatibles est mal défini ; il repose sur une discrimination soi - non soi (self - non self des anglo-saxons). Cette distinction fait partie d'un processus plus vaste : celui de la reconnaissance biologique qui permet l'interaction entre les organismes et entre leurs composants tissulaires ou cellulaires.

Les modalités de reconnaissance et de rejet des gamètes impropres à la fertilisation varient selon les plantes et leur degré d'évolution.

FIGURE 1

PROCESSUS NORMAL DE FERTILISATION



Ainsi chez les cryptogames, et en particulier chez les chlamydomonas, les gamètes mâles sont libérés directement dans le milieu aqueux et ont directement accès aux gamètes femelles. La reconnaissance et le rejet du partenaire mâle est à la complète discrétion du gamète femelle ; aucune autre cellule ni aucun tissu n'intervient dans ce processus. La première étape de la fertilisation chez chlamydomonas débute par un contact direct entre les deux gamètes au niveau de leurs membranes. L'identification des gamètes compatibles se fait apparemment par une réaction identique à celle que l'on rencontre au cours des processus de reconnaissance entre cellules animales.

Chez les gymnospermes, le gamétophyte femelle est enfermé à l'intérieur d'un tissu sporophytique (le nucelle). Le grain de pollen doit émettre un tube pollinique afin de libérer les gamètes mâles non loin de l'oeuf. Une interaction entre le tube pollinique haploïde et le tissu sporophytique diploïde (bien que restreint à quelques couches cellulaires) est obligatoire.

Les événements conduisant à la fertilisation chez les plantes supérieures sont très complexes. Au cours de l'évolution, l'ovule s'est enfermé dans le pistil, l'oeuf haploïde se trouve à l'intérieur du sac embryonnaire et repose dans le tissu sporophytique (diploïde) du pistil. Le grain de pollen (gamétophyte mâle) contenant les gamètes mâles doit donc germer en un tube pollinique qui assurera le transport des deux gamètes jusqu'à l'ovule. Dans la plupart des cas, le tube pollinique doit traverser la cuticule de la papille stigmatique puis le tissu conducteur stylaire avant d'entrer dans le sac embryonnaire où s'effectue la double fertilisation caractéristique des plantes à fleurs (Figure n°1).

Le contrôle de la reproduction s'effectue par une régulation de la croissance du tube pollinique ; en effet la réaction d'auto-rejet se traduit par l'inhibition de la germination et/ou de la progression du tube pollinique dans le pistil.

La conséquence directe de l'évolution de la structure florale est l'élaboration d'une série d'interactions entre le gamétophyte mâle et le sporophyte femelle, ainsi que le transfert de la fonction de reconnaissance et d'auto-rejet de l'oeuf aux tissus sporophytiques du pistil. Ce dernier a donc dû développer des mécanismes pour sélectionner et permettre aux gamètes appropriés d'entrer dans le sac embryonnaire. L'installation d'un système d'autoincompatibilité et le transfert de la fonction de reconnaissance et d'auto-rejet du gamète femelle aux tissus sporophytiques du pistil est probablement la cause la plus importante de l'incomparable développement des angiospermes au cours de l'évolution.

L'autoincompatibilité est très répandue chez les angiospermes puisqu'on la retrouve dans plus de 3000 espèces, appartenant à 350 genres distribués dans 70 familles (GAGNIEU -84-, BREWBAKER -30-, LINSKENS et KROH -179-, LINSKENS -183-). Il n'est donc pas surprenant de rencontrer divers systèmes de reconnaissance et diverses manifestations de l'autoincompatibilité. Cependant tous les systèmes autoincompatibles sont basés sur le fait que l'identité entre le génotype du pollen et celui du pistil pour le (ou les) caractère(s) qui contrôlent la réaction d'incompatibilité, conduit à l'impossibilité de produire un zygote : ceci implique la participation du pollen et des constituants du pistil dans la réaction de rejet de ce qui est reconnu comme semblable à soi.

Les interactions pollen - pistil sont donc d'une importance capitale dans la biologie de la reproduction. Elles impliquent une étape de reconnaissance et l'installation de coopérations métaboliques qui sont soumises à des mécanismes rigoureux de contrôle génétique strictement définis. La participation de molécules transmettant ou décodant un message est indispensable. Pour assurer ces deux fonctions, les macromolécules doivent non seulement être situées en surface, mais également posséder un pouvoir informatif qui se trouve généralement localisé dans la séquence en acides aminés des protéines et/ou dans la séquence osidique des glycoconjugués (glycoprotéine - glycolipide). Dans certains cas, la surface cellulaire, composée chez les végétaux d'une membrane plasmique entourée d'une paroi épaisse de nature polysaccharidique, pourra servir de barrière et empêcher toutes communications entre pollen et pistil ; dans d'autres cas elle sera le siège de réactions de reconnaissance positives indispensables à l'installation de coopérations métaboliques.

L'objectif de notre travail a été d'analyser dans les organes floraux lors de l'autoincompatibilité de fécondation, les processus déclenchés après l'étape de reconnaissance et induisant une vague de perturbations métaboliques aboutissant à l'arrêt de la croissance du tube pollinique.

Nous nous sommes attaché plus précisément à l'étude de la structure et de l'évolution des composants membranaires et tout particulièrement à l'analyse de la matrice lipidique afin de répondre aux questions suivantes :

1) l'autofécondation est-elle liée aux perturbations de diverses propriétés membranaires telles que réception, discrimination et transmission de signaux biologiques en relation avec les fonctions de perméabilité et d'amplification qui leurs sont propres ?

2) si un contrôle membranaire existe, quelles classes de lipides y jouent un rôle et lequel ?

Afin de préciser l'évolution de la perméabilité membranaire, nous avons également entrepris l'étude des ATPases liées au transport des ions sodium et potassium.

L'étude de ces divers points nous a conduit à utiliser un certain nombre de techniques qui sont reportées dans l'appendice technique.

Avant d'exposer nos résultats sur l'autoincompatibilité de fécondation, il nous a semblé important, après un bref rappel sur les divers systèmes d'incompatibilité, de définir la reconnaissance cellulaire en détail.

Nous envisagerons donc dans un premier temps les modalités de la reconnaissance cellulaire dans les cellules animales, puisque la majorité des travaux y ont trait, puis par extension nous définirons l'aspect moléculaire de cette même reconnaissance cellulaire chez les plantes. Le parallèle entre les modalités de la discrimination soit non soit dans le règne animal et végétal nous a permis de définir une hypothèse de travail impliquant un contrôle de l'autoincompatibilité par les glycolipides. Dans la seconde partie nous exposerons le résultat de nos recherches qui ont débuté dans le laboratoire du Professeur COUSTAUT en octobre 1975.

L'ensemble de nos travaux sur l'autoincompatibilité de fécondation a fait l'objet des publications suivantes :

PUBLICATIONS

- 1 - D. COUSTAUT, H.F. LINSKENS, Y. MOSCHETTO et C. DELBART. -
Quelques aspects du métabolisme des glycosphingolipides des styles et du pollen chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible. *Soc. bot. Fr. Actualités botaniques*, 1978, n° 1-2, p. 69-77.
- 2 - B. BRIS et C. DELBART. -
The glycosphingolipids of the pollen and the style in *Oenothera missouriensis* Sims, autoincompatible species. *Incompatibility Newsletter*, 1978, n° 9, p. 74-77.
- 3 - C. DELBART, H.F. LINSKENS, B. BRIS, Y. MOSCHETTO and D. COUSTAUT. -
Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*, a self incompatible species. I - Composition in fatty acids and in long chained bases of pollen and unpollinated style. *Proc. Kon. Ned. Akad Wet. C*, 1980, 83, p. 229-239.
- 4 - C. DELBART, B. BRIS, H.F. LINSKENS, R. LINDER and D. COUSTAUT. -
Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*, a self incompatible species. II - Evolution of the fatty acids composition after cross - and self-pollination. *Proc. Kon. Ned. Akad Wet. C*, 1980, 83, p. 241-254.
- 5 - C. DELBART, B. BRIS, H.F. LINSKENS and D. COUSTAUT. -
Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*, a self incompatible species. III - Evolution of the long chained bases after self- and cross-pollination. *Proc. Kon. Ned. Akad Wet. C*, 1980, 83, p. 255-269.

- 6 - B. BRIS, C. DELBART, D. COUSTAUT and R. LINDER. -
Changes in glycosphingolipids during pollination in *Oenothera missouriensis*. *Phytochemistry*, 1981, 20, n° 6, p. 1255-1258.
- 7 - B. BRIS, C. DELBART and D. COUSTAUT. -
Evolution des sulfolipides après pollinations compatibles et incompatibles. *Bull. Soc. Bot. N. France*, 1981, 34, n° 1-2, p. 34-40.
- 8 - C. DELBART, B. BRIS and D. COUSTAUT. -
Glycolipid metabolism : its characteristics in incompatibility reaction. *Incompatibility Newsletter*, 1982, n° 14, p. 29-35.
- 9 - B. BRIS, C. DELBART and D. COUSTAUT. -
L'autoincompatibilité de fécondation chez les Angiospermes. *Année biologique*, 1982, n° 22, p. 322-358.
- 10 - C. DELBART, B. BRIS, H.F. LINSKENS and D. COUSTAUT. -
Cell surface components and the incompatibility reaction. Second international pollen symposium lake garda, June 1982.
- 11 - C. DELBART, B. BRIS, A. NOUVELOT and D. COUSTAUT. -
Sulfatides and pollination in *Oenothera missouriensis*. *Phytochem.*, 1982, 22, p. 869-874.
- 12 - C. DELBART, B. HOFACK, H.F. LINSKENS and D. COUSTAUT. -
(Na⁺+K⁺) - ATPase in *Oenothera missouriensis* : possible connection with self incompatibility. Soumis pour publication à *Phytochemistry* 1983.

COMMUNICATIONS

5ème Colloque international de Cytobiologie de la reproduction sexuée des plantes ovulées.

Communication présentée : 1976.

"Quelques aspects du métabolisme des glycosphingolipides des styles et du pollen chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible".

D. COUSTAUT, H.F. LINSKENS, Y. MOSCHETTO et C. DELBART. -

Second international pollen Symposium. Lac de Garde. Italie.

Communication présentée : 1982.

"Cell surface components and the incompatibility reaction".

C. DELBART, B. BRIS et D. COUSTAUT. -

1er Congrès européen de Biologie cellulaire, 18-23 Juillet 1982.

Paris.

Communication présentée :

"Glycolipides et régulation de croissance".

C. DELBART, B. BRIS, H.F. LINSKENS et D. COUSTAUT. -

GENERALITES

CHAPITRE I

LES SYSTEMES D'AUTOINCOMPATIBILITE DE FECONDATION

I - INTRODUCTION

Il existe deux grands systèmes de contrôle de la reproduction chez les plantes, destinés : le premier à inhiber le succès d'une pollinisation entre espèces végétales trop éloignées (c'est l'incompatibilité interspécifique) ; le second à assurer un certain degré d'hétérozygotie.

La reproduction sexuée chez les plantes à fleurs favorise une pollinisation sélective suivie d'une fertilisation sélective (LEWIS -173-).

La pollinisation sélective doit assurer un transport suffisant du pollen provenant de la "bonne" espèce par l'intermédiaire de divers agents (vent ou eau, insectes ou animaux). La pollinisation sélective repose le plus souvent sur la forme, la taille, les caractères de surface et l'insertion des organes mâles et femelles sur les pièces florales ou sur le réceptacle.

La fertilisation sélective doit pour sa part assurer le maintien d'un degré important d'hétérozygotie en réduisant le succès de l'autopollinisation. Elle suppose la mise en place d'un système contraceptif n'entraînant aucune perte de fertilité ni pour le pollen ni pour l'ovule. C'est l'autoincompatibilité de fécondation. Ce terme a été proposé par STOUT -289- et défini par MATHER -196- comme "l'incapacité pour des gamètes mâles et femelles à réaliser la fécondation après pollinisation, alors que chacun d'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".

Les systèmes d'autoincompatibilité ou d'incompatibilité intraspécifique privilégient les croisements impliquant des gamètes provenant de la même espèce, mais d'individus différents.

L'incompatibilité de fécondation intraspécifique a été subdivisée, généralement selon des critères morphologiques et génétiques, en un système hétéromorphe et un système homomorphe. Comme son nom l'indique l'incompatibilité hétéromorphe repose sur des différences structurales importantes au niveau du pistil et du pollen des espèces infertiles. Par contre, les plantes à incompatibilité homomorphe ne représentent aucune différence dans leur morphologie florale et assurent le maintien de l'hétérozygotie uniquement par la mise en jeu d'un contrôle génétique au niveau macromoléculaire (HESLOP-HARRISON -113-).

II - INCOMPATIBILITE DE FECONDATION HETEROMORPHIQUE

L'incompatibilité de fécondation hétéromorphe a été enregistrée dans 23 familles de 131 genres (LEWIS -173-). Ces familles se répartissent à travers tout le règne végétal.

Les caractères morphologiques contrôlant ce type d'incompatibilité ont été répertoriés (De NETTANCOURT -225-). Pour le pollen, ce sont le plus souvent : la forme, la taille, les sculptures et la composition de la paroi, mais également la position du pollen par rapport au stigmate. Celle-ci est déterminée par la longueur ou par le point d'insertion de l'anthère dans la corolle. La forme, les sculptures de la surface de la papille stigmatique peuvent également intervenir ainsi que la longueur du style.

Les diverses espèces hétéromorphes ne possèdent pas toujours l'ensemble de ces caractères à l'exception de *Limonium meyeri* où

tous ces divers facteurs se combinent afin de réaliser un grand nombre de types intercompatibles (LEWIS -173-).

III - INCOMPATIBILITE DE FECONDATION HOMOMORPHIQUE

L'incompatibilité homomorphique est nettement plus répandue que l'hétéromorphie et se rencontre dans à peu près la moitié des familles de plantes à fleurs. Il semble que ce soit le mode le plus efficace de reproduction croisée.

Comme son nom l'indique, aucune différence morphologique ne permet la distinction entre les différentes plantes. Cette incompatibilité est basée uniquement sur le multiallélisme d'un gène contrôlant l'incompatibilité de fécondation. En effet, depuis les travaux de CORRENS -51-, EAST -69-70-, EAST et al. -68-, on sait que le contrôle de la fécondation est due à la présence d'un gène d'incompatibilité S dont la transmission héréditaire s'effectue selon un mécanisme mendélien. Deux systèmes homomorphiques ont été identifiés : l'un à détermination gamétophytique (AIG), l'autre à détermination sporophytique (AIS). Ce sont ces deux systèmes que nous présentons ci-après.

A - DETERMINISME GENETIQUE DES SYSTEMES D'INCOMPATIBILITE

a) Autoincompatibilité gamétophytique de fécondation

Dans le cas de l'autoincompatibilité gamétophytique de fécondation (AIG) c'est le génotype du pollen (gamétophyte issu de la méiose) qui détermine à lui seul la compatibilité ou l'incompatibilité de fécondation (LINDER -175-, De NETTANCOURT -225-, LUNDQUIST -189-).

Une plante de génotype $S_1 S_3$ par exemple donnera, après méiose, une population de microspores composée par moitié d'individus

S_1 et d'individus S_3 . Le tube pollinique S_1 ne pourra traverser le style d'une plante de génotype $S_1 S_1$ ni même de génotype $S_1 S_2$. Par contre une plante $S_1 S_2$ ne refusera pas le passage du tube pollinique S_3 .

b) Autoincompatibilité sporophytique de fécondation (AIS)

Le second cas d'autoincompatibilité homomorphe est dit sporophytique car c'est le génotype du sporophyte inscrit globalement dans le cytoplasme et la paroi de chaque grain de pollen qui contrôle son comportement (son phénotype incompatible).

La distinction AIS-AIG est facilitée par le fait qu'il existe une correspondance remarquable entre l'autoincompatibilité et certaines caractéristiques telles que : cytologie du pollen ou du stigmate, localisation de la réaction de rejet du gamète incompatible, stade de détermination et enfin nombre de loci et de séries polyalléliques pour le ou les gènes contrôlant la réaction d'incompatibilité.

B - RAPPEL SUCCINCT DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE CES

DEUX SYSTEMES D'INCOMPATIBILITE

a) Cytologie du pollen et incompatibilité

BREWBAKER -29- a montré qu'il existe un certain nombre de corrélations entre le type gamétophytique ou sporophytique d'autoincompatibilité et les caractéristiques cytologiques du grain de pollen. Deux types de pollen sont connus : binucléé et trinucléé en fonction du moment de la seconde mitose pollinique :

- le pollen binucléé possède un noyau végétatif et un noyau reproducteur. Celui-ci en se divisant au cours de la croissance du tube pollinique donne deux gamètes mâles.

- Dans le cas d'un pollen trinué, la division du noyau reproducteur a déjà eu lieu dans l'anthère ; il possède donc un noyau végétatif et deux gamètes mâles.

Les systèmes AIS appartiennent exclusivement aux plantes à pollen trinué tandis que les systèmes AIG ne faisant intervenir qu'un seul gène d'incompatibilité sont rencontrés exclusivement dans les familles possédant des grains de pollen binué. Il faut remarquer que certains systèmes AIG faisant intervenir plusieurs gènes d'incompatibilité peuvent correspondre avec la présence de pollen trinué.

b) Surface stigmatique et incompatibilité

De nombreux auteurs ont analysé la corrélation qui existe entre l'aspect de la surface stigmatique et les divers systèmes d'autoincompatibilité (KONAR-LINSKENS -151-, DICKINSON-LAWSON -64-, HESLOP HARRISON et coll. -112-). La classification des stigmates s'appuie sur l'existence et la nature d'une sécrétion qui recouvre les papilles. En effet, schématiquement on distingue des stigmates sécréteurs et des stigmates non sécréteurs (HESLOP HARRISON et coll. -114 -).

Les papilles des stigmates sécréteurs des plantes à AIG sont recouvertes d'une sécrétion abondante de nature essentiellement lipidique (LABARCA et coll. -157-). Elle constitue un milieu favorable à la capture et à la germination du pollen. Par contre, les stigmates des espèces à AIS sont non sécréteurs ; leurs papilles ne sont plus recouvertes d'une sécrétion liquide mais par une pellicule hydratée (MATTSON et coll. -197-) qui, selon ROBERTS et coll. -253-, doit être considérée comme une couche visqueuse ou encore comme une " mosaïque fluide de nature protéique ".

c) Localisation de la réaction de rejet et d'incompatibilité

La localisation de la réaction d'auto-rejet, c'est-à-dire

d'inhibition de la croissance du tube pollinique peut avoir lieu dans différentes parties du pistil et à des moments variables de la phase progamique. Une classification a été proposée par LINSKENS -181- et PANDEY -239- ; elle rend compte de la position de ces barrières à la germination et à la croissance du tube pollinique.

L'inhibition stigmatique caractérise les plantes à AIS. En effet, la réaction d'auto-rejet y est exclusivement localisée au niveau de la papille stigmatique : 95% des grains de pollen incompatibles ne germent pas ; les rares tubes polliniques émis sont toujours très courts, déformés, recroquevillés. Ils ne pénètrent jamais dans la paroi de la cellule stigmatique (ROGGEN -254-, OCKENDON -236-), et leur partie apicale est obstruée par un bouchon de callose.

L'inhibition stylaire caractérise les plantes à AIG. Le tube pollinique issu de la germination du pollen incompatible traverse le stigmate et pénètre dans le style. Le blocage de la croissance du tube peut se réaliser dès l'entrée dans le style (ex. *Oenothera*) ou plus bas (ex. *Petunia*). Le tube pollinique incompatible présente des parois épaissies et l'arrêt de sa croissance coïncide avec la formation à son extrémité d'un dépôt de callose et l'inhibition de la mitose (GAGNIEU -25-).

Il existe enfin un troisième site d'inhibition : l'ovaire. Le tube pollinique incompatible atteint le sac embryonnaire mais la libération des gamètes n'est pas suivie de syngamie. La détermination de ce type d'incompatibilité serait à la fois gamétophytique et sporophytique (COPE -50-).

d) Stades de détermination et incompatibilité

La détermination du phénotype incompatible du pistil coïncide avec l'ouverture de la fleur. Avant et après ce stade les pistils des plantes incompatibles peuvent quelque fois accepter l'auto-pollen.

Le moment où le gamétophyte mâle reçoit l'information nécessaire à la détermination de son phénotype incompatible varie, il est en relation avec le déterminisme de l'autoincompatibilité : BREWBAKER -29-30- estime que le stade de détermination du phénotype incompatible du grain de pollen se situe à la deuxième mitose pollinique et intervient dans les microspores pour les espèces à pollen trinué et dans le tube pollinique pour les espèces à pollen binué.

e) Récapitulation de la classification des systèmes

d'autoincompatibilité

De NETTANCOURT -225- a résumé de manière très synoptique (figure n° 2) les principales caractéristiques des systèmes autoincompatibles.

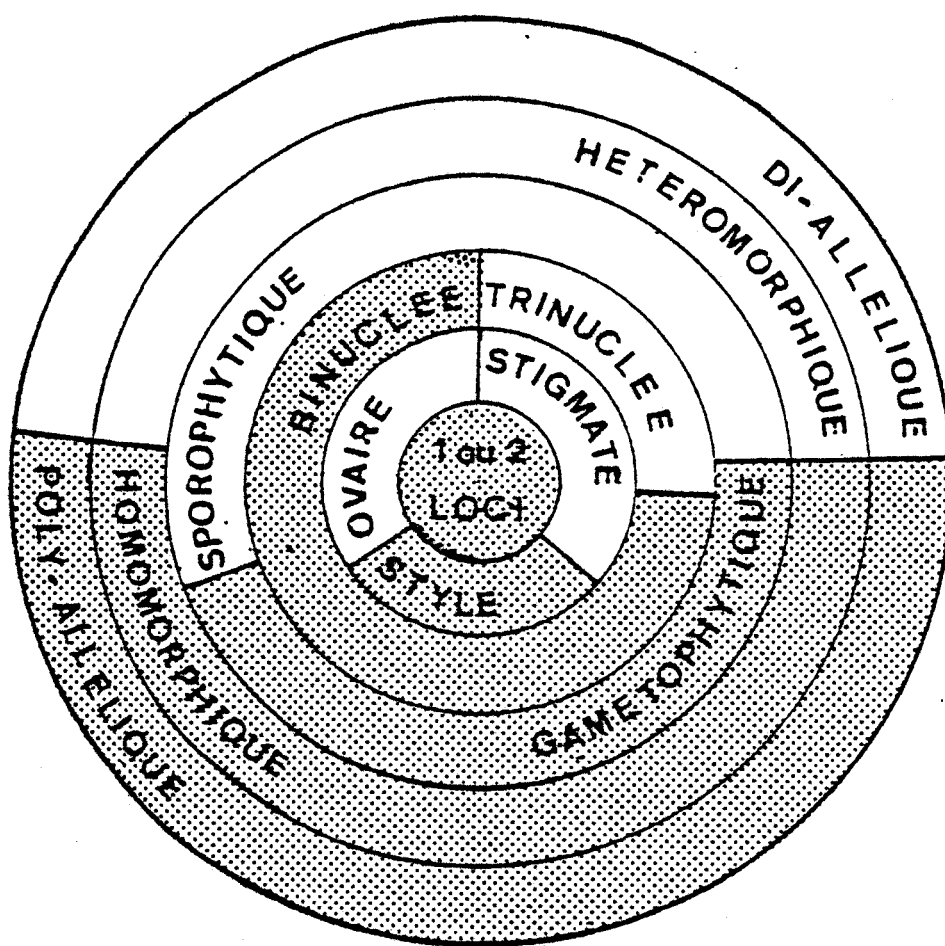
Ce schéma fait apparaître l'existence d'un ou deux loci, la localisation de la réaction de rejet, la cytologie du pollen, son stade de détermination, la présence ou l'absence de séries polyalléliques, l'association avec des caractères morphologiques.

Une corrélation très importante, non indiquée par ce schéma, est l'état du stigmate sécréteur (ou non) en association avec la détermination de l'autoincompatibilité.

Il existe un très grand nombre de revues générales précisant le contrôle génétique, l'ultrastructure et la physiologie des systèmes autoincompatibles (SEARS -271-, LEWIS -171-, ARASU -9-, ROSEN -260-, LUNDQUIST -189-, TOWNSEND -294-, De NETTANCOURT -223-225-, VASIL -304-, BREWBAKER -29-, HESLOP HARRISON -113-, LINSKENS -183-, BRIS et coll. -35-).

FIGURE 2

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



Nous ne rentrerons guère plus dans les détails de la définition des systèmes autoincompatibles pour envisager plus précisément la nature des interactions pollen/pistil dont l'importance est capitale dans la biologie de la reproduction.

C - NATURE DES INTERACTIONS DANS LES SYSTEMES AUTOINCOMPATIBLES

Nous limiterons notre étude aux systèmes homomorphiques d'incompatibilité de fécondation. Comme nous l'avons vu, l'autoincompatibilité n'est pas liée à une incapacité des gamètes à accomplir la fécondation mais à des mécanismes physiologiques strictement contrôlés par des gènes d'incompatibilité bien déterminés.

Selon HESLOP HARRISON -113-, la définition des barrières qui limitent la fertilisation s'effectue au cours des phases progamique et syngamique. Les divers niveaux d'interaction pollen - pistil sont résumés tableau n° 1. Ainsi au cours de la phase progamique (stades 1 à 5) des interactions se réalisent entre le gamétophyte mâle et le sporophyte femelle, il faut attendre la phase syngamique pour que se manifeste une interaction directe entre les deux gamétophytes.

Du côté femelle, le contrôle de l'autoincompatibilité dépendra en partie du sporophyte puis du gamétophyte. Par contre, côté mâle, ce même contrôle sera uniquement soumis au gamétophyte haploïde. Ainsi les matériaux transportés par le grain de pollen assurent le contrôle parental en AIS.

Longtemps considérée comme un phénomène unique, deux phases ont été distinguées dans la réaction d'incompatibilité après la présentation du modèle de LEWIS -172- :

- une première phase de reconnaissance contrôlée par le gène d'incompatibilité,



TABLEAU 1

DEFINITION DES INTERACTIONS DANS LES SYSTEMES AUTOINCOMPATIBLES (HESLOP-HARRISON, 1976)

PHASES	PRINCIPALES ETAPES	BARRIERE	SYSTEME	NIVEAU D'INTERACTIONS	NATURE DES INTERACTIONS
PHASE I pollinisation					
PHASE II progamique	1) capture 2) hydratation 3) germination 4) pénétration du tube pollinique	x x x x	} AIS AIG	• surface stigmatique } surface stigmatique et papilles sous-jacentes	Interaction avec le sporophyte femelle diploïde
	5) croissance du tube pollinique	x		tissu conducteur stylaire	
PHASE III syngamique	6) pénétration dans le gamétophyte femelle et fusion	x	AIS + AIG	sac embryonnaire	Interaction avec le gamétophyte femelle

- suivie par l'installation de la réaction de rejet.

Un grand pas a été franchi par BURNET -36- qui, comparant la réaction d'autoincompatibilité à une réaction immunologique, a imposé cette conception en l'affinant et en distinguant :

- un stade de reconnaissance soi - non soi mettant en jeu des molécules porteuses d'une information déterminée par le gène d'incompatibilité,

- l'induction d'une réponse rejet-admission,

- l'expression de cette réponse correspondant à la mise en route de diverses voies métaboliques adéquates.

L'étape primordiale de l'autoincompatibilité de fécondation, quelle que soit sa nature (sporophytique ou gamétophytisque), est celle de la reconnaissance qui appartient à la phase progamique dans la plupart des cas (HESLOP HARRISON -113-). Cependant, bien que reconnaissance et rejet soient confondus au niveau du stigmate chez les plantes à AIS (à inhibition stigmatique), il semble plus délicat de définir avec précision le site de reconnaissance des plantes à AIG (à inhibition intra-stylaire des tubes polliniques incompatibles). Ainsi il semblerait que chez *Petunia hybrida* (VANDERDONK -300-301-, LINSKENS -184-) et *Prunus avium* (RAFF-KNOX -245-) qui sont deux plantes à système AIG, la reconnaissance ait lieu après pollinisation au niveau de la papille stigmatique, suivie d'une inhibition dans le style 24 heures plus tard. Par contre chez *Lilium* le stigmate ne participe pas à la reconnaissance du pollen, ainsi que le suggère certaines expériences de greffes (LAWSON-DICKINSON -166-, FETT et coll. -76-). Seul le style serait impliqué dans l'étape de reconnaissance et la réaction d'auto-rejet. Les informations sont donc contradictoires et les résultats expérimentaux non univoques.

Quelle que soit sa localisation, (stigmate ou style), l'étape de reconnaissance se déroule soit entre le grain de pollen et les cellules stigmatiques, soit entre le tube pollinique et les cellules stylaires. Du contact entre ces deux surfaces très différentes naît une information précise qui conditionnera le succès de la fécondation ou l'installation des barrières d'incompatibilité. Tout repose sur la mise en jeu de réactions bien définies au niveau moléculaire.

Un grand nombre d'hypothèses concernant les mécanismes de contrôle de l'autoincompatibilité de fécondation ont été avancées (LEWIS -168-172-, NASRALLAH -220-, PANDEY -239-, ASCHER -10-, KROES -155-, VANDERDONK -301-, LINSKENS -178-, FERRARI-WALLACE -75-, CLARKE-GLEESON -48-). Cependant si aucun de ces modèles hypothétiques n'a été accepté totalement, tous postulent l'existence d'une reconnaissance dont ils définissent plus ou moins les éventuelles modalités

Les bases moléculaires de la reconnaissance cellulaire ont été définies par BURNET -36- qui conclut que "toutes les reconnaissances positives entre cellules peuvent être interprétées comme provenant de l'union spécifique, réversible ou non, entre des groupements chimiques appartenant aux surfaces cellulaires en contact".

Ainsi la reconnaissance cellulaire est liée à l'identification d'une molécule-vecteur d'information (ligand) par une molécule-récepteur capable de décoder le message du ligand. Un signal informatif est engendré puis transmis à l'intérieur de la cellule après passage au travers de la membrane. Il en découle une transcription de gènes spécifiques suivie de l'installation d'une coopération adaptant les activités métaboliques vers la réponse à produire.

Cette analyse est schématisée figure n° 3.

Dans tous les cas étudiés et en particulier chez les animaux, la discrimination soi - non soi s'est révélée être un phénomène de surface. La réception et la transmission d'informations, telles que celles qui conduisent à l'auto-rejet semblent être issues et dépendre d'interactions entre surfaces cellulaires par l'intermédiaire de molécules spécifiques complémentaires dont la combinaison est d'importance capitale pour le succès de la croissance du tube pollinique dans le pistil.

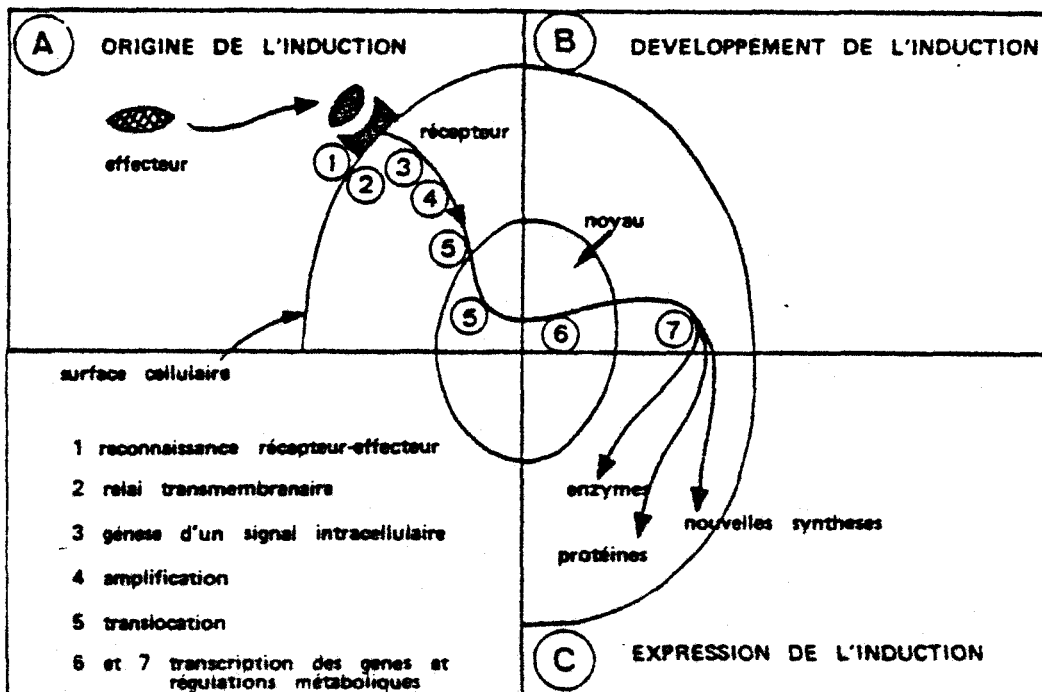
Nous allons donc, dans les chapitres suivants, essayer de définir les bases moléculaires de la reconnaissance, tout d'abord dans le règne animal où elle a été très étudiée, pour ensuite dégager les modalités d'une reconnaissance cellulaire chez les végétaux.

FIGURE 3

DIFFERENTES CONCEPTIONS DU PROCESSUS DE FERTILISATION

POINT DE VUE CONCEPTUEL	NIVEAU SUPRAMOLECULAIRE
INTERACTION ENTRE SURFACES CELLULAIRES <i>étape de reconnaissance discrimination</i>	1) reconnaissance d'un récepteur, émission d'un signal
INDUCTION D'UNE REPOSE	2) relai transmembranaire 3) genèse d'un signal intracellulaire 4) amplification du signal 5) translocation du signal 6) transcription de gènes 7) mise en route de régulations métaboliques
MANIFESTATION DE L'INDUCTION <i>réponse «admission-rejet»</i>	8) nouvelles synthèses nécessaires à l'expression de l'induction

DIFFERENTES ETAPES DU PROCESSUS DE FERTILISATION



CHAPITRE II

BASES MOLECULAIRES ET STRUCTURALES DE LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE CHEZ LES ANIMAUX

I - INTRODUCTION : MODELISATION DE RECONNAISSANCE CELLULAIRE

La réception et la traduction des signaux de reconnaissance régulant le comportement social et physiologique des cellules sont des phénomènes impliquant les surfaces cellulaires et dépendant de la présence, sur ces surfaces, d'éléments cognitifs ou récepteurs. Cette surface cellulaire peut être considérée comme une interface tridimensionnelle entre le cytoplasme et son environnement extracellulaire ; elle représente le siège idéal pour les processus cellulaires de communication et de reconnaissance. Ainsi la membrane cellulaire peut être assimilée à un territoire "sensoriel" susceptible de détecter les signaux environnants (reconnaissance) et d'en assurer le transfert et l'amplification puis la traduction en une réponse intracellulaire. Cependant, pour exercer un effet physiologique, tous les stimuli externes doivent traverser la surface cellulaire et atteindre les régions fonctionnelles du cytoplasme.

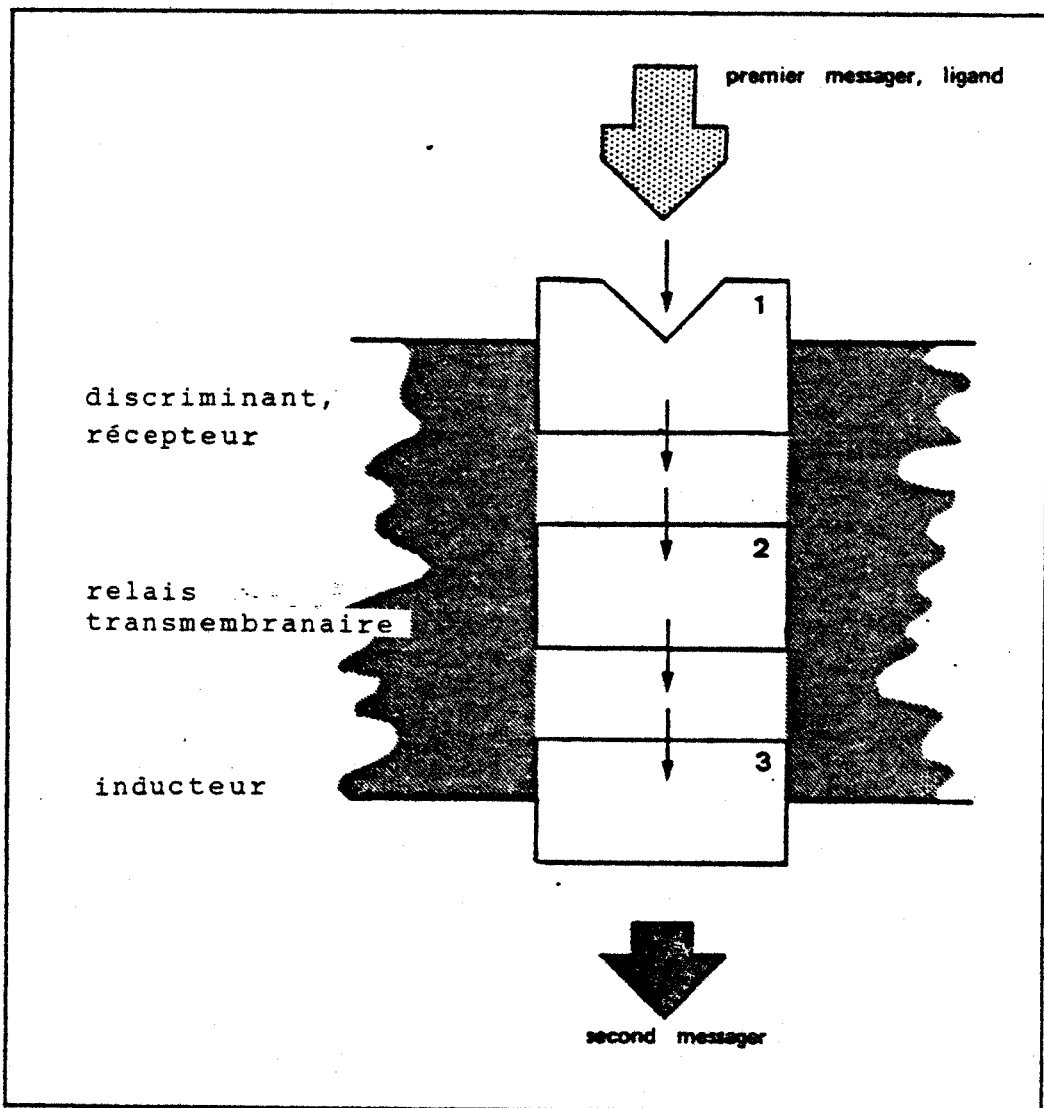
Les mécanismes par lesquels la membrane cellulaire réalise cette fonction de transfert d'information sont peu connus. Seuls, commencent à être étudiés les signaux extracellulaires et intercellulaires qui provoquent une réponse métabolique intracellulaire (AULT-BRAUN -16-, BRADY-FISHMAN -25-).

Conceptuellement ces processus peuvent se scinder en trois phases bien distinctes :

a) reconnaissance et liaison d'une substance effectrice (ligand) à la surface cellulaire.

FIGURE 4

MODELE HYPOTHETIQUE D'UN RECEPTEUR MEMBRANAIRE



b) transmission de l'information au travers de la membrane cellulaire,

c) activation des voies métaboliques intra-cytoplasmiques appropriées.

GREAVES et CUATRECASAS -97- ont proposé un modèle simple permettant de décrire la plupart des facettes des phénomènes de communications intercellulaires, et, en particulier la perception de l'information à la surface externe de la membrane puis son transfert de la membrane dans le compartiment intra-cytoplasmique (Figure n° 4).

Un tel modèle de reconnaissance et de communication implique l'intervention de paramètres multiples ainsi qu'un changement fréquent de langage. Ainsi, selon GREAVES -97- les diverses étapes du processus de communication impliquent (Figure n° 4) :

- un "discriminator" ou récepteur,
- un "transducer" ou relais transmembranaire,
- un "effector" ou inducteur-émetteur.

Nous allons donc essayer de définir les exigences fonctionnelles de chacun de ces trois paramètres.

A - DEFINITION FONCTIONNELLE DU RECEPTEUR

Le premier élément impliqué est l'élément de discrimination ou d'identification, c'est-à-dire le récepteur dont la fonction principale est d'être sensible à un signal particulier spécifique, que celui-ci soit une molécule soluble, ou faisant partie d'une autre cellule. Ce récepteur est caractérisé par deux propriétés fondamentales : sa localisation à la surface cellulaire et sa spécificité de combinaison. Il possède également la double fonction de décoder un signal externe et d'initier la réponse intracellulaire.

En effet, le récepteur doit être capable de communiquer à l'intérieur de la cellule le fait qu'il a interagi avec un ligand porteur d'une information. Cela nécessite en général la présence d'un relais transmembranaire.

B - DEFINITION FONCTIONNELLE DU RELAIS TRANSMEMBRANAIRE

GREAVES -97- a proposé l'existence d'un "transducer" ou transducteur qui, bien que peut-être hypothétique, doit assurer le transit de l'information reçue à la surface cellulaire vers la face interne de la membrane. Il correspond quelle que soit sa nature, à un relais transmembranaire.

C - DEFINITION FONCTIONNELLE DE L'INDUCTEUR-EMETTEUR

Le dernier élément vital dans le transfert de l'information est l'effecteur qui communique à l'intérieur de la cellule, au moyen de la production d'un second messenger ou second signal, les perturbations enregistrées à la surface cellulaire lors de la réception du message par le récepteur.

La reconnaissance cellulaire dépend étroitement de :

- a) la spécificité du récepteur et de son orientation vers le milieu extérieur,
- b) l'existence d'un relais transmembranaire et de ses relations avec deux propriétés membranaires qui sont asymétrie et amplification.

Ces paramètres sont conditionnés par la structure même de la membrane. L'orientation du récepteur semble être sous la dépendance étroite de composantes thermodynamiques en association avec les phases polaires (hydrophiles) et apolaires (hydrophobes) de la membrane. Sa spécificité dépendrait de composants biochimiques particuliers. Quant au relais transmembranaire, son efficacité est directement en relation avec la structure membranaire. Il nous semble donc

important de rappeler très brièvement la structure fondamentale de cette frontière que représente la membrane plasmique elle-même.

II - LA MEMBRANE : SA MODELISATION

Bien que divers modèles aient été proposés pour décrire la structure de la membrane (Figure 5a) c'est celui de SINGER et NICOLSON -281- qui est le plus fréquemment admis (CHAPMAN -43-, CHAPMAN et coll. -44-, BRETSCHER -28-). Il repose comme tous les modèles issus des travaux de PAPART et BALLENTINE, LUCY et coll. -187-, de WALLACH et GORDON -310-, sur :

- a) l'insertion des protéines et glycoprotéines dans une matrice lipidique,
- b) l'asymétrie de la membrane,
- c) la fluidité membranaire. La matrice lipidique représenterait un milieu visqueux permettant la mobilité et la diffusion de certaines molécules y compris des récepteurs membranaires en fonction de sa résonance de phase entre deux états (cristal-solide, cristal-liquide).

A - INSERTION DE PROTEINES DANS UNE MATRICE LIPIDIQUE

Malgré leur grande homogénéité structurale, les protéines se subdivisent en deux classes en fonction de leur solubilité dans la phase aqueuse ou lipidique et donc de leur association plus ou moins étroite avec la matrice lipidique constituée par une bicouche de composés hydrophobes de nature variable (Fig. 5b). Ce sont les protéines périphériques superficielles et les protéines intégrées.

Les premières ne sont que très faiblement liées à la membrane et par conséquent avec la matrice lipidique.

Les protéines intégrées sont par contre, très étroitement

associées aux lipides membranaires et participent à la structuration de la matrice membranaire. Elles représentent 70 à 80% des protéines. Y sont inclus des enzymes associés aux membranes, des antigènes, des protéines transporteuses ainsi que les divers récepteurs biologiques (SINGER -282-). De plus ces protéines intégrées requièrent la présence de lipides souvent spécifiques pour être activées.

B - ASYMETRIE DE LA MEMBRANE

Certes, l'asymétrie de la membrane existe au niveau de la répartition des protéines mais elle est particulièrement plus nette encore au niveau des glycoconjugués. En effet, les glycanes ne sont détectables qu'à la face externe de la membrane (Figure n° 5b). Les preuves cytologiques sont nombreuses. Diverses méthodes utilisant différents marqueurs tels que des lectines couplées à la ferritine (NICOLSON-SINGER -226-228-) et à tout autre composé glycosylé (KIEDA et coll. -143-) ou encore des enzymes ne pénétrant pas dans la cellule telle la galactose-oxydase (PARSONS-SUBJECK -240-, GAHMBERG-HAKOMORI -87-, STECK-DAWSON -287-) ont permis la "visualisation" de l'asymétrie de la membrane liée à l'orientation vers le milieu extracellulaire, des glycanes des glycoconjugués.

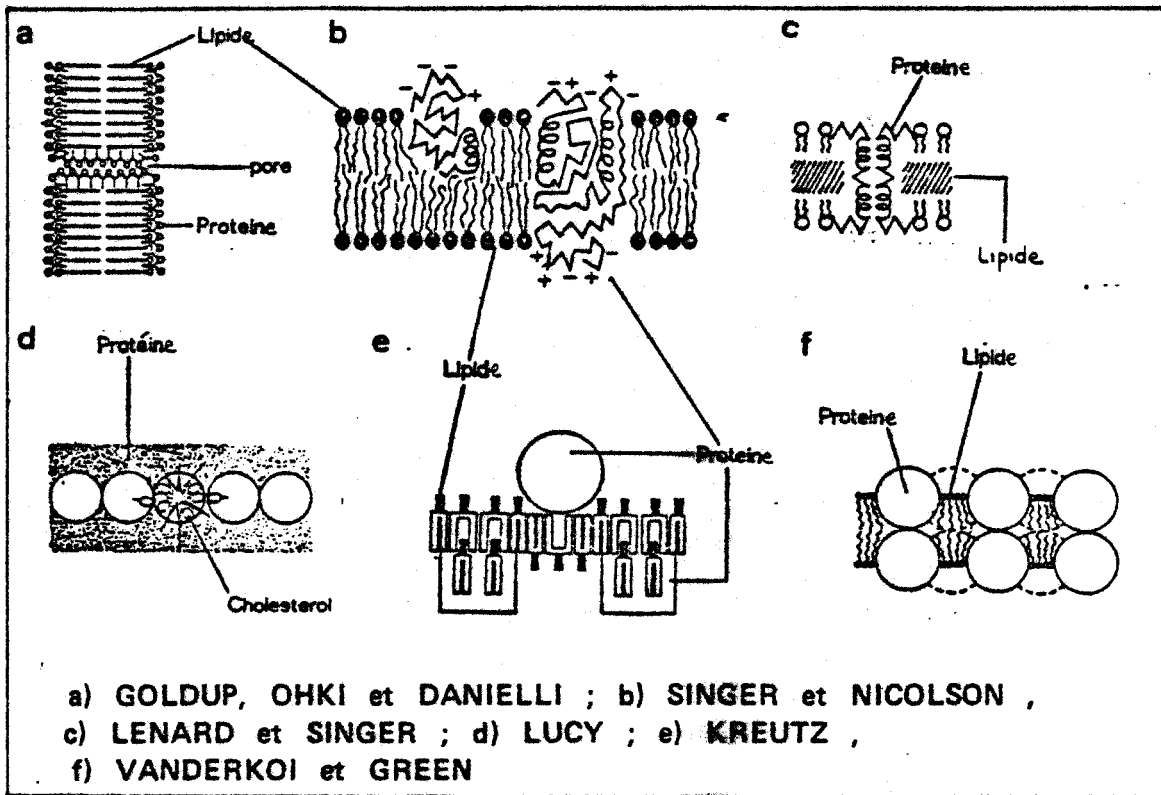
C - FLUIDITE MEMBRANAIRE

Le concept d'une membrane fonctionnelle sous forme d'une mosaïque fluide (SINGER et coll. -281-) est maintenant généralement admis.

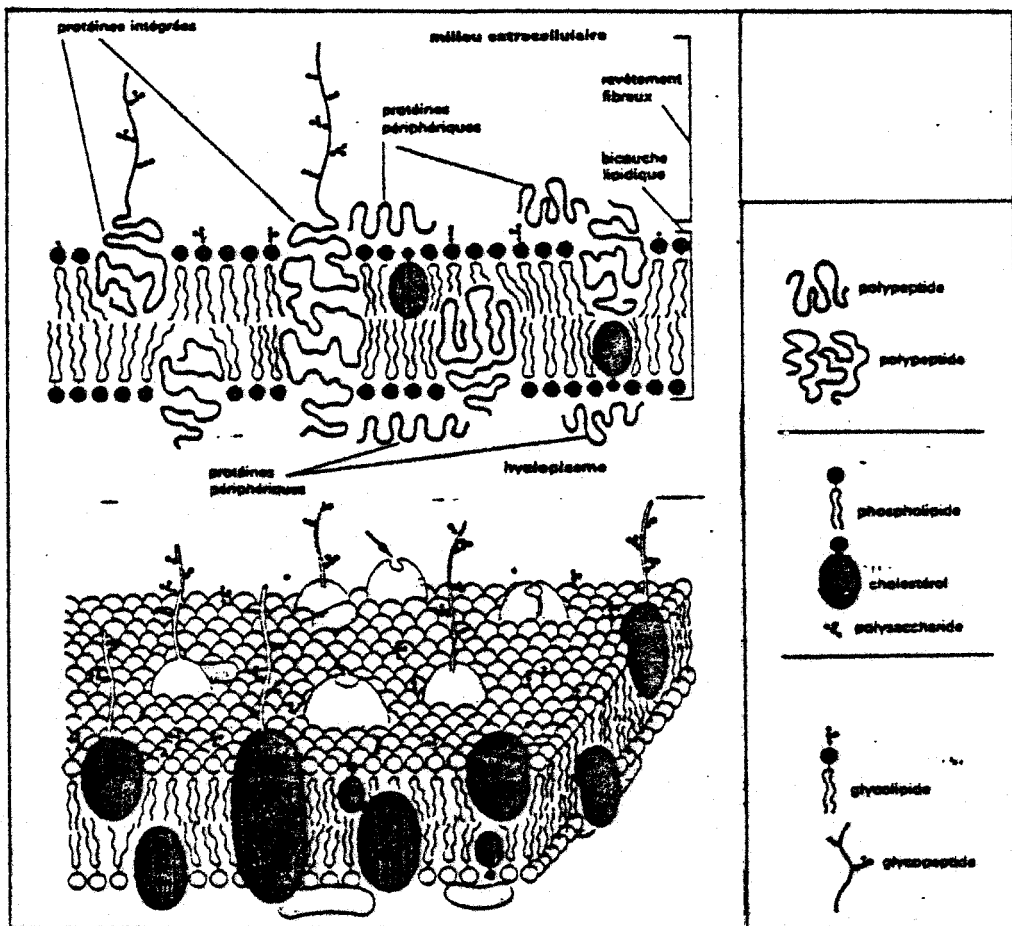
La fluidité membranaire est essentielle à l'établissement de la structure même de la membrane en permettant des interactions

FIGURE 5

A DIVERS MODELES MEMBRANAIRES



B SCHEMA DE L'INSERTION DES PROTEINES DANS LA MATRICE LIPIDIQUE



de type hydrophobe-hydrophile. Les lipides de la matrice forcent les protéines membranaires à prendre des orientations correspondant à un état d'énergie libre le plus bas. Cette fluidité est essentielle à la mobilité des constituants membranaires et des récepteurs.

La fluidité membranaire dépend de l'état de résonance de la matrice qui oscille entre deux états cristal-liquide et cristal-solide. Le passage d'un état à l'autre ou transition de phase, est sous la dépendance de la composition lipidique de la matrice. Ainsi des études physiques (CALHOUN SHIPLEY -37-) ont démontré que le degré d'insaturation et la longueur des chaînes aliphatiques des acides gras, tout comme la température, régulaient les transitions de phase. Turn-over lipidique et régulation des propriétés membranaires apparaissent comme deux processus étroitement associés (FRIEDMAN -83-, HAINES -99-). Ainsi il a été clairement démontré que la liaison ligand-récepteur à la surface de certaines cellules de mammifères était suivie d'une augmentation de la fluidité membranaire parallèlement à l'augmentation du turn-over des phospholipides et à la diminution du taux de saturation des acides gras (GREAVES -97-, LAUF -164-).

D - MOBILITE DES COMPOSANTS MEMBRANAIRES

Comme nous venons de le voir, la nature même de la membrane (fluide) permet la mobilité des macromolécules; nous en donnerons deux exemples.

a) Mobilité des protéines

Il est maintenant bien établi que les antigènes de surface sont répartis à la surface cellulaire et diffusent sur toute la

surface cellulaire. Le processus de "patching" qui préside à cette redistribution des protéines de surface, semble être une diffusion latérale, dépendante de la température et de la présence d'ATP. Le processus plus ample de "capping" ne dépend plus uniquement de la membrane, il implique également la présence de structures cytoplasmiques contractiles (AULT-BRAUN -16-).

b) Mobilité des lipides et glycolipides

Les lipides et glycolipides sont également mobiles au sein de la matrice.

Il semble que les lipides de la matrice membranaire, après les interactions de surface ligand-récepteur, subissent une redistribution latérale (MAGGIO et coll. -192-, SHAROM-GRANT -277-278-), qui est mesurable en fluorescence ou encore après avoir incorporé un marqueur de spin (le 5-doxylstéarate) (SHAPIRO -275-).

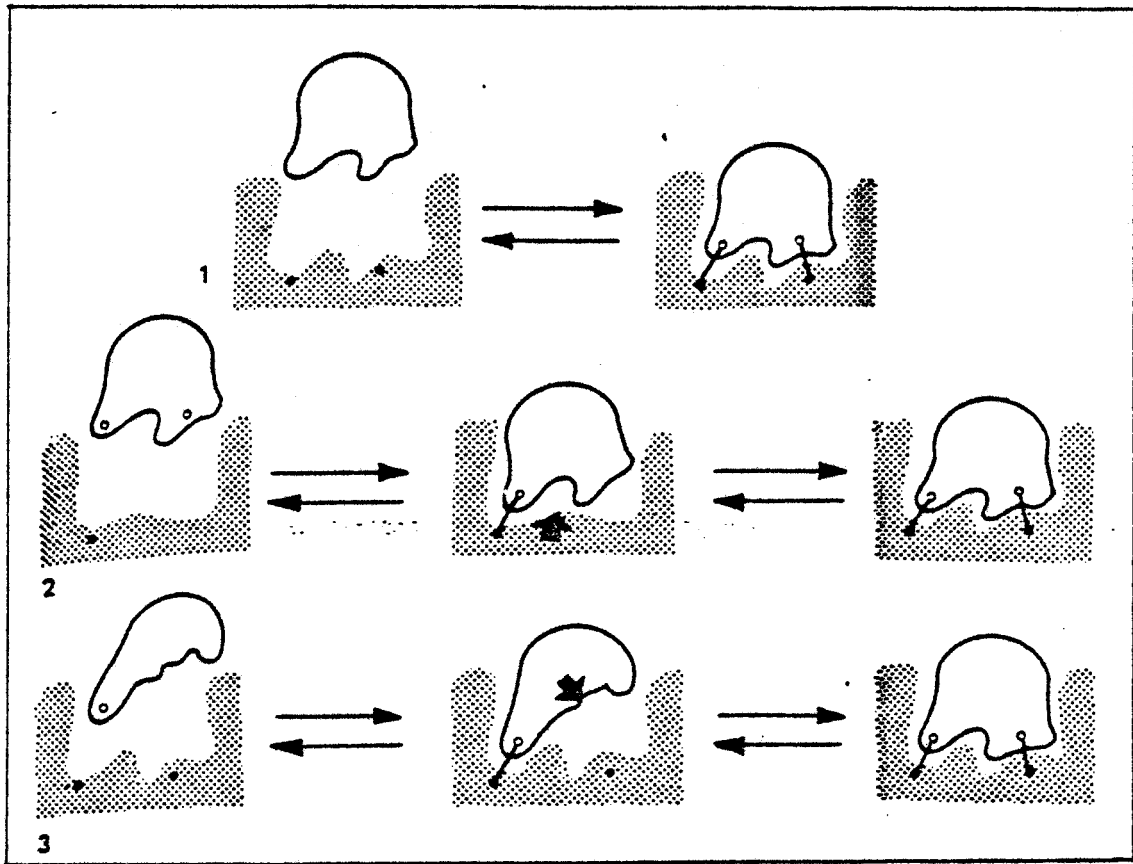
Cependant, bien que la fluidité de la membrane et par conséquent la mobilité des protéines et lipides dans le plan membranaire soient d'importance capitale, il semblerait que les variations de cette fluidité et mobilité soient restreintes à certaines membranes ou zones membranaires et selon des conditions particulières que les études encore trop parcellaires ne permettent pas de définir plus précisément (GREAVES -97-). En particulier le calcium est capable d'induire la formation de microdomaines cristallins dans les phospholipides acides (SHAPIRO -275-).

III - GLYCOCONJUGUES : BASE MOLECULAIRE DU RECEPTEUR

Le succès des processus de reconnaissance et de discrimination repose sur l'interaction spécifique entre une molécule (chargée d'une information) et son récepteur, aussi allons-nous envisager les

FIGURE 6

MODELES MOLECULAIRES D'INTERACTIONS STEREOSPECIFIQUES
ENTRE UN LIGAND ET SON RECEPTEUR



1 MODELE TYPE «CLEF-SERRURE» DE FISCHER

2 MODELE ADAPTATIF DE KOSHLAND

3 MODELE ADAPTATIF DE BURGEN

exigences des liaisons ligand-récepteur et définir leur base moléculaire.

A - EXIGENCE DE LA LIAISON LIGAND-RECEPTEUR

L'efficacité biologique des récepteurs membranaires dépend de leur capacité de liaison et de transmission. L'interaction ligand-récepteur doit être spécifique, sélective et réversible. Complémentarité de configuration et stéréospécificité sont nécessaires pour obtenir une spécificité aussi élevée. Trois modèles d'interaction ligand-récepteur ont été rapportés par CUATRECASAS et coll. -56-.

Le premier modèle proposé par FISCHER est de type "clef-serrure" (Figure n° 6). La liaison ligand-récepteur ne peut se faire que si les molécules possèdent la conformation voulue, l'établissement des points de contact se faisant d'emblée.

Le second modèle de BURGEN (Figure n° 6) correspond au modèle du "zipper" ou fermeture à glissière. La liaison du ligand en un point de sa molécule sur le récepteur, induit une série de changement dans la conformation de ce ligand. Les interactions ligand-récepteur sont adaptatives et séquentielles.

C'est également le cas du modèle de KOSHLAND (Figure n°6), mais c'est le récepteur qui cette fois sera adaptatif.

Les glycoconjugués tels les glycolipides et les glycoprotéines sont des molécules dont le potentiel informatif n'est plus à démontrer. Ils sont présents à la surface de la cellule et leurs parties osidiques sont en contact direct avec le milieu extérieur. Ils peuvent donc jouer les rôles décisifs de récepteur ou de ligand. Nous allons très brièvement rappeler la structure de ces glycoconjugués.

B - STRUCTURE DES GLYCOCONJUGUES

a) Les glycolipides membranaires

La structure des glycolipides est relativement simple à établir. En effet, les glycolipides à sphingosine ou glycosphingolipides (GSL) ne possèdent qu'un seul glycanne par molécule, ce qui en simplifie l'étude. D'autre part, 80 à 90% d'entre eux sont localisés dans la membrane plasmique (KLENK-CHOPPIN -145-, GAHMBERG -86- et KEENAN et coll. -141-), ce qui permet de les étudier à partir d'extraits cellulaires sans utiliser de préparations membranaires.

De nombreuses revues générales (en particulier WIEGANDT -316-, MORELL-BRAUN -207-, HAKOMORI -103-) se rapportent à l'étude de la structure et à la classification des GSL.

La structure lipidique des GSL est remarquable par l'omniprésence d'une base à longue chaîne de type sphingosine combinée à un acide gras par une liaison amide et qui constitue un céramide. Il porte, greffé par une liaison osidique, un glycanne plus ou moins complexe. Les GSL présentent donc une très grande hétérogénéité structurale dont la diversité résulte de la variabilité de leurs trois composants (KARLSSON -131-132-133-134-, HITCHCOCK -117-).

Globalement les glycolipides sont constitués d'une matrice lipophile (sphingosine et acide gras) et d'une capsule osidique hydrophile. C'est la variabilité de cette séquence osidique qui permet la classification des GSL. Nous distinguerons les GSL acides et les GSL neutres.

ai) Les glycolipides neutres

Les glycolipides les plus petits sont les monoglycosylcéramides (MGCer) ou cérébrosides. Ce sont des céramides ne comportant qu'un seul résidu osidique. Les dérivés substitués par un nombre de

résidus osidiques de plus en plus grand correspondent au di, tri, tetra, etc... glycosylcéramides ou GSL complexes dont les formules sont résumées tableau n° 2. .

Ils sont caractérisés, chez les mammifères, par la présence de N-acétylosamine (HAKOMORI -101-, SIDDIQUI-HAKOMORI -280-, ANDO et coll. -8-, NAIKI et coll. -215-).

Le fucose y est parfois décelé, par exemple chez les glycolipides qui s'accumulent dans les tumeurs du colon (WATANABE et coll. -311-) ou qui possèdent une activité de groupe sanguin (voir la revue d'HAKOMORI -103-).

A côté de ces glycolipides simples (moins de 5 résidus osidiques dans leurs molécules), il existe des céramides heptasaccharides (SLOMIANY et coll. -284-) possédant des glycanes branchés et même des mégaloglycolipides composés de 22 résidus osidiques (GARDAS -89-).

a2) Les glycolipides acides

=====

Le caractère acide des sulfolipides est dû à la présence dans leur molécule de résidu osidique sulfaté.

Par contre, les gangliosides se différencient des autres GSL par la présence dans leur glycanne de résidus d'acide sialique. Les gangliosides sont désignés, selon la nomenclature de SVENNENHOLM, par le nombre de résidus sialyl présents dans leur molécule (Tableau n° 2).

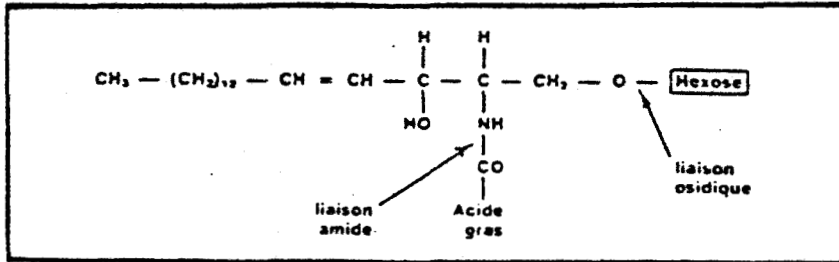
b) Les glycoprotéines membranaires

La définition de la structure des glycoprotéines membranaires est plus difficile. Ces molécules portent en général plusieurs glycanes, et leur extraction est malaisée.

TABLEAU 2

CLASSIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

la structure générale des glycosphingolipides est la suivante :

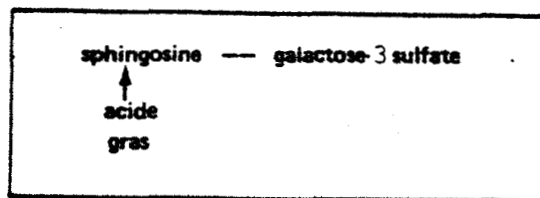


leur classification est fondée sur la structure de la chaîne oligosaccharidique et l'on distingue par exemple :

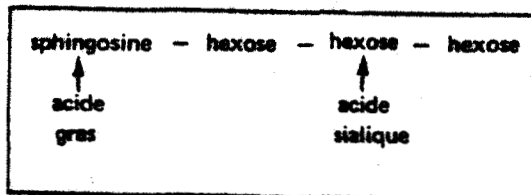
<i>Monohexosylcéramides</i>	
Glicosylcéramide	Glc β (1 \rightarrow 1) Cer
Galactosylcéramide	Gal β (1 \rightarrow 1) Cer
<i>Dihexosylcéramides</i>	
Lactosylcéramide	Gal β (1 \rightarrow 4) Glc β (1 \rightarrow 1) Cer
<i>Trihexosylcéramides</i>	
- Trihexoside -	Gal α (1 \rightarrow 4) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc β (1 \rightarrow 1) Cer
Glycolipide GA ₂	GalNAc β (1 \rightarrow 4) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc β (1 \rightarrow 1) Cer
<i>Tétrahexosylcéramides</i>	
- Globoside -	GalNAc β (1 \rightarrow 3) Gal α (1 \rightarrow 4) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc β (1 \rightarrow 1) Cer
Glycolipide GA ₁	Gal β (1 \rightarrow 3) GalNAc β (1 \rightarrow 4) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc β (1 \rightarrow 1) Cer
Glycolipide GA ₃ -GlcNAc	Gal β (1 \rightarrow 4) GlcNAc β (1 \rightarrow 3) Gal β (1 \rightarrow 4) Glc β (1 \rightarrow 1) Cer

CLASSIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES ACIDES

SULFATIDES : ce sont des esters sulfuriques de cérébrogalactosides



GANGLIOSIDES : leur structure est la suivante



Ces composés, contrairement aux glycolipides, ne faisant pas l'objet de notre mémoire, nous serons relativement brefs sur leur définition.

Le tableau n° 3 permet de distinguer deux types de glycoprotéines, en fonction du mode de liaison (N ou O-glycosidique) permettant le rattachement du glycanne sur la protéine.

Un grand nombre de glycoprotéines sont de type N-glycosidique, possédant un glycanne branché et un noyau pentasaccharidique commun (Tableau n° 3) sur lequel viennent se greffer des résidus fucosyl, neuraminyl, mannosyl ou N-acetyl-lactosaminyl (revue MONTREUIL -201-202-).

c) Signification de l'identité structurale des glycoconjugués

Les glycoprotéines et les glycolipides sont souvent considérés comme appartenant à deux classes bien distinctes de composés. Cependant récemment des résultats ont révélé les étonnantes similitudes de la partie terminale de leurs chaînes osidiques (RAUVALA - FINNE -247-, JARNEFELT et coll. -127-). Ces structures sont consignées dans le tableau n°4 présenté page suivante

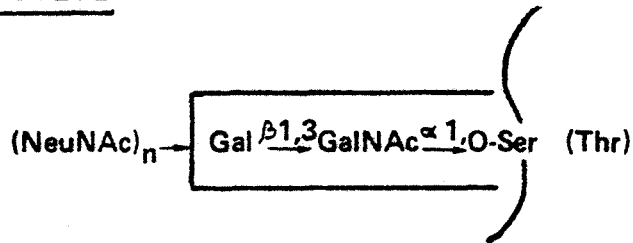
Par contre, ces composés diffèrent par les séquences proches des points d'attache sur la partie peptidique ou lipidique ce qui suggère que les séquences osidiques terminales sont synthétisées par des glycosyltransférases communes (RAUVALA FINNE -247 -).

Il est possible que les similitudes structurales mises en évidence dans le tableau 4 reflètent les propriétés fonctionnelles similaires correspondant par exemple à la stéréospécificité des récepteurs. HAKOMORI -103- donne une signification biologique particulière à la présence de chaînes olisaccharidiques communes aux

TABLEAU 3

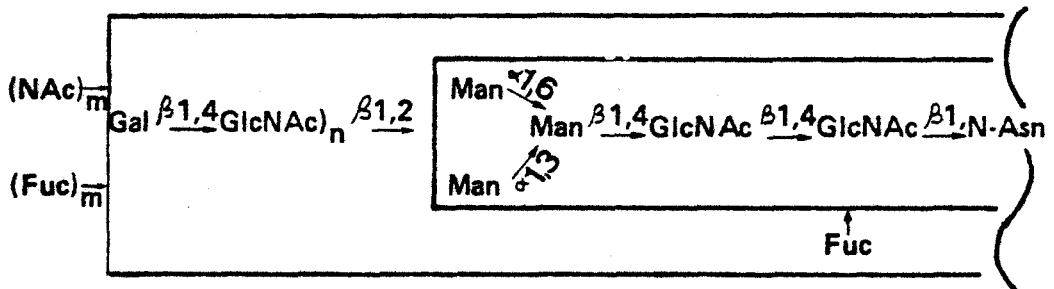
STRUCTURE DES DIFFERENTS TYPES DE GLYCANNES LIES
AUX GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES

LIAISON O-GLYCOSIDIQUE



LIAISON N-GLYCOSIDIQUE

- TYPE N-ACETYLLACTOSAMINIQUE



- TYPE OLIGOMANNOSIDIQUE

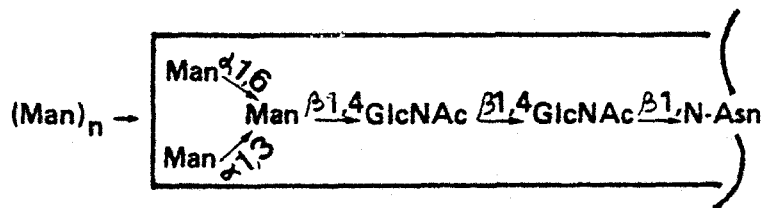


TABLEAU 4

SEQUENCES OSIDIQUES TERMINALES COMMUNES AUX GLYCOPROTEINES
ET AUX GLYCOLIPIDES

<p>A - FAMILLE Gal(β1-4)GlcNAc</p>		<p>19 Gal(β1-3)GlcNAc(β1- Fucose) 2</p>	
1	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Sia α 2) 3	20	GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1- Fucose) 2
2	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Sia α 2) 6	21	Gal(α 1-3)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1- Fucose) 2
3	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 3	<p>C - FAMILLE Gal(β1-3)GalNAc</p>	
4	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Sia α 2) Fucose 3 3	22 ^a	Gal(β 1-3)GalNAc- Sia α 2 3
5	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	23 ^b	Gal(β 1-3)GalNAc- Fucose 2
6	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) Fucose 2 3	24 ^b	Gal(β 1-3)GalNAc- Fucose 2
7	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	25 ^b	GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc- Fucose 2
8 ^a	GalNAc(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	26	Gal(α 1-3)Gal(β 1-3)GalNAc- Sia α 2 3
9 ^a	Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	27	GalNAc(β 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc- 3
10	Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	<p>D - FAMILLE analogue des globosides</p>	
11	Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	28 ^c	GalNAc(β 1-3)Gal(α 1- Fucose) 2
12	Gal(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Sia α 2) 3	29	GalNAc(α 1-3)GalNAc(β 1-3)Gal(α 1- Fucose) 2
13	Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	<p>E - FAMILLE des oligosialosyl</p>	
14	GlcNAc(α 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	30	Sia(α 2-8)Sia(α 2- Fucose) 4
15	GlcNAc(β 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1- Fucose) 2	31	Sia(α 2-8)Sia(α 2-8)Sia(α 2- Fucose) 4
<p>B - FAMILLE Gal(β1-3)GlcNAc</p>			
16	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1- Fucose) 4		
17	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1- Fucose) 2		
18	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1- Fucose) Fucose 2 4		

glycolipides et aux glycoprotéines. Selon lui, la réception d'un ligand pourrait s'effectuer en deux temps incluant les glycoprotéines d'abord, puis les glycolipides.

De toutes façons, glycolipides et glycoprotéines possèdent la même aptitude pour remplir la fonction de discrimination par rapport aux signaux extracellulaires. La complexité de leur structure et leur ubiquité renforcent l'éventualité de leur participation comme marqueurs ou récepteurs d'informations.

C - GLYCOCONJUGUES ET SIGNAUX DE RECONNAISSANCE

Il serait beaucoup trop long d'envisager tous les cas qui illustrent la participation des séquences oligosaccharidiques des glycoconjugués dans le codage des messages. Il suffit de rappeler que le comportement social cellulaire est régulé par un nombre considérable de signaux émis par l'intermédiaire des glycoconjugués via leurs chaînes osidiques (HUGHES -125-, HAKOMORI -103-).

Quelques cas typiques de participation des glycoconjugués à l'émission de signaux spécifiques sont reportés dans le tableau 5. Dans cet exposé, nous n'envisagerons que deux cas très précis où les glycoconjugués, marqueurs antigéniques des hématies ou de différenciation, seront des "vecteurs" d'information.

a) Marqueurs antigéniques des hématies

A l'heure actuelle la structure des déterminants antigéniques des groupes sanguins A, B et O (Tableau n°5) est parfaitement connue. Ils correspondent à des glycosphingolipides et c'est uniquement les sucres terminaux de leurs glycanes qui leur confèrent leurs propriétés antigéniques (KOSCIELAK et coll. -152-, HANFLAND -104-, WATKINS -312-).

TABLEAU 5

LES PRINCIPAUX DETERMINANTS ANTIGENIQUES PORTES PAR LES GLYCOPROTEINES MEMBRANAIRES DE CELLULES DE MAMMIFERES

Déterminants antigéniques du système ABO d'après WATKINS

ACTIVITE	CHAINE DE TYPE I	CHAINE DE TYPE II
O	$\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \downarrow \alpha 1,2 \\ \text{Fuc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \downarrow \alpha 1,2 \\ \text{Fuc} \end{array}$
A	$\begin{array}{c} \text{GalNAc} \xrightarrow{\alpha 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \downarrow \alpha 1,2 \\ \text{Fuc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{GalNAc} \xrightarrow{\alpha 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \downarrow \alpha 1,2 \\ \text{Fuc} \end{array}$
B	$\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{\alpha 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,3} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \downarrow \alpha 1,2 \\ \text{Fuc} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Gal} \xrightarrow{\alpha 1,3} \text{Gal} \xrightarrow{\beta 1,4} \text{GlcNAc} \text{---R} \\ \downarrow \alpha 1,2 \\ \text{Fuc} \end{array}$

Déterminants antigéniques des groupes M et N d'après SPRINGER et coll.

N	M
$\begin{array}{c} \text{GalNAc} \\ \text{(ou Gal)} \\ \swarrow \beta \\ \text{Gal} \xrightarrow{\alpha} \text{NeuNAc} \\ \searrow \beta \\ \text{Gal} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{GalNAc} \\ \text{(ou Gal)} \\ \swarrow \beta \\ \text{Gal} \xrightarrow{\alpha} \text{NeuNAc} \\ \searrow \beta \\ \text{Gal} \xrightarrow{\alpha} \text{NeuNAc} \end{array}$



De même les antigènes des systèmes LEWIS (Le a, Le b) sont des glycolipides (HAKOMORI-STRYCHARD -100-).

Par contre, la glycophorine, glycoprotéine majeure de l'hématie humaine, porte les déterminants M et N correspondant au second système de groupe sanguin, dans sa séquence osidique (tableau n°5) (HAKOMORI -103-).

Le fait que les glycoconjugués localisés à la surface cellulaire puissent être reconnus par d'autres structures est d'importance capitale dans les processus de reconnaissance.

b) Marqueur de différenciation

La différenciation des tissus embryonnaires s'est avérée être un processus ordonné, gouverné par des interactions cellulaires, elles-mêmes sous la dépendance de macromolécules en perpétuelle évolution selon un programme génétique pré-établi.

Au cours de l'embryogénèse, les glycolipides subissent une telle maturation qu'ils sont maintenant considérés comme des "molécules-code" (area-code-molecules) (HAKOMORI -103-, HOOD et coll. -120-, KEENAN-MORRE -142-). En effet le marqueur de stade embryonnaire (l'antigène F9) est un fucosyl-lacto-N-glycosylceramide branché (NUDELMAN et coll. -235-).

Par contre, la régression d'un tissu mature vers un stade embryonnaire par cancérisation, coïncide avec la réapparition de glycolipides immatures. Par exemple le marqueur des tératocarcinomes (antigène Ter C) est également un GSL de type embryonnaire.

Nous venons de démontrer le rôle de ligand que jouent les glycoconjugués dans la nature. Nous en présentons Tableau n°6 une liste récapitulative avant d'envisager la participation de ces composés dans la réception de l'information.

D - GLYCOCONJUGUES ET RECEPTION DES SIGNAUX

De même qu'ils peuvent être reconnus, les glycoconjugués peuvent participer à la réception des signaux extracellulaires. Ils semblent être la base moléculaire même des récepteurs biologiques.

Nous allons décrire cette fonction de réception-discrimination à travers deux exemples typiques : les récepteurs des virus et les récepteurs de facteurs biologiques.

a) Récepteurs de virus

L'adsorption d'un virus sur une membrane plasmique constitue une étape importante de la rencontre virion-cellule hôte. Elle suppose la présence de récepteurs spécifiques.

Ces récepteurs sont bien sûr des glycoconjugués. Ainsi, la glycophorine constitue un récepteur pour le virus de l'encéphalomyocardite (ENEGREN-BURNESS -72-). De même le récepteur du virus grippal chez l'homme est un antigène de groupe sanguin (type MN) (GIRARD-HIRTH -93-). Par contre, le récepteur du virus Sendai est un ganglioside (HAYWOOD -109-110-).

b) Récepteurs de molécules solubles

Les glycoconjugués peuvent interagir avec diverses molécules douées d'activité biologique (Tableau n° 6). De nombreuses revues ont traité de ce sujet (CRITCHLEY et coll. -53-, FISHMAN-BRADY -78-, BRADY-FISHMAN -25-, FISHMAN -79-).

Le récepteur de la toxine du choléra est un ganglioside (GM₁) (VANHEYNINGEN -303-, FISHMAN-BRADY -78-); celui de la toxine tétanique est associé à un ganglioside (GD_{1b}) (VANHEYNINGEN -303-). De même certains récepteurs des opiacés sont associés à un sulfo-galactosylcéramide (ZALC et coll. -319-). L'interaction entre hormones

TABLEAU 6

FONCTION DES GLYCOCONJUGUES

- 1) DETERMINANTS ET ANTIGENES DE SURFACE
- 2) INTERACTIONS INTERCELLULAIRES ET RECONNAISSANCE
 - réponse au contact cellulaire ; inhibition de contact
 - interaction neurogliale
 - reconnaissance rétine toit optique
 - reconnaissance neuro-musculaire
- 3) MARQUEURS DE DIFFERENCIATION
 - au niveau du développement embryonnaire
 - au niveau des tératocarcinomes et neuroblastomes
 - au niveau de la différenciation de l'épithélium intestinal
 - au niveau de la différenciation des erythrocytes
 - au niveau de la différenciation myogénique
 - au niveau de la différenciation des cellules lymphoïdes
- 4) REGULATION DE LA CROISSANCE CELLULAIRE
 - inhibition de contact
 - mitogénèse
- 5) REGULATION DE L'ONCOGENESE
- 6) RECEPTION DES SUBSTANCES POSSEDANT UNE ACTIVITE BIOLOGIQUE
 - toxines bactériennes
 - hormones glycoprotéiniques
 - virus
 - interféron, etc....



peptidiques (comme la TSH) et cellule-cible est également modulée par des gangliosides (MULLIN et coll. -214-). Il en va de même pour certains types d'interféron (HOMGREN et coll.-119-).

Par contre, les récepteurs de l'insuline au niveau de l'hépatocyte et de l'adipocyte sont des glycoprotéines (CUATRECASAS -54-).

Nous limiterons à ces quelques exemples la liste des travaux démontrant le rôle de récepteur des glycoconjugués. Un fait semble maintenant acquis : tous les glycoconjugués jouent un rôle double dans l'émission et la réception de signaux extracellulaires. Nous allons maintenant définir les modalités de l'induction d'une réponse intracellulaire.

IV - INITIATION DE LA REPOSE INTRACELLULAIRE : LE SECOND MESSAGER

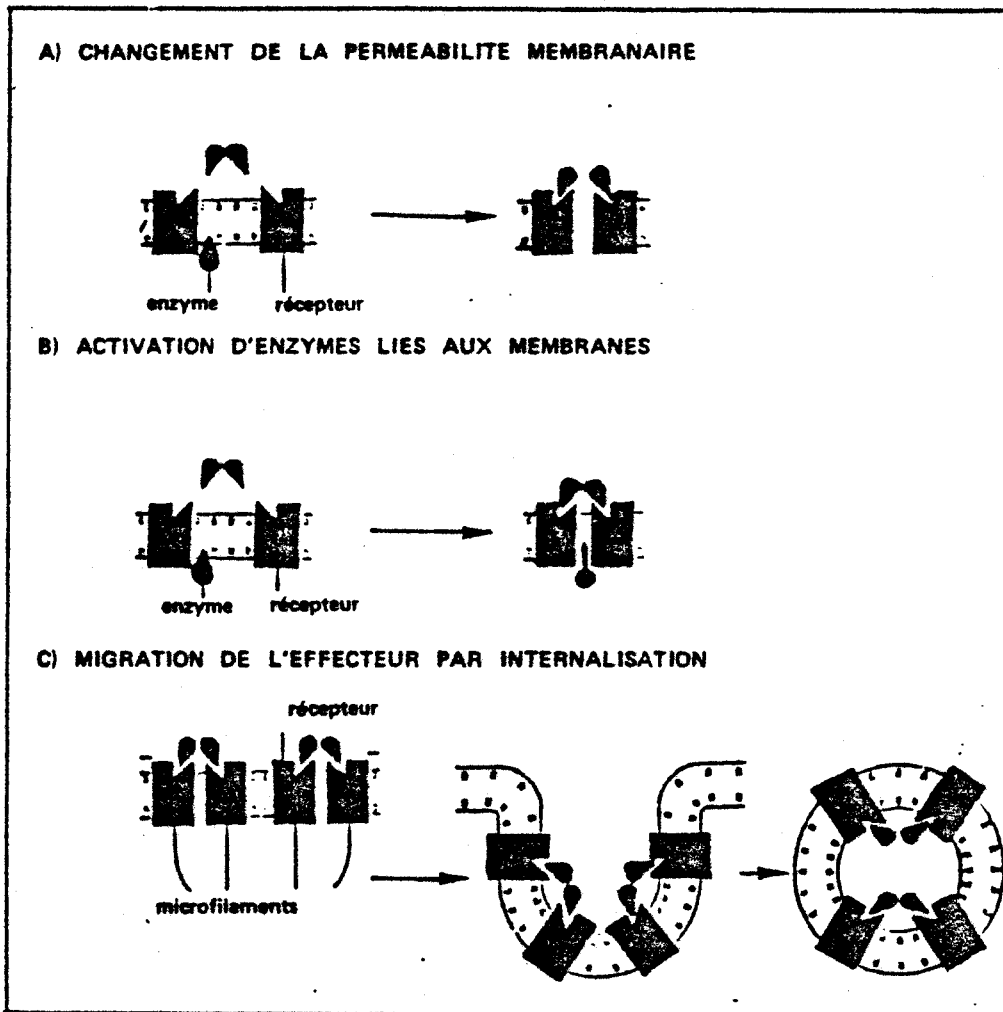
L'étape la plus délicate dans le fonctionnement du récepteur réside dans le couplage reconnaissance-réponse. Ce mécanisme de couplage, c'est-à-dire le relais transmembranaire est encore très mal connu. Nous nous proposons d'analyser dans un premier temps, les modalités d'émission d'un messager intracellulaire afin de mieux définir ensuite ce relais transmembranaire.

L'émission d'un signal intracellulaire fait appel à trois types de perturbations (Figure n° 7) :

- a) modification de l'activité des enzymes liés aux membranes du côté cytoplasmique,
- b) modification de la perméabilité aux ions,
- c) internalisation du récepteur ou du ligand que nous allons décrire successivement.

FIGURE 7

INITIATION D'UNE REPOSE INTRACELLULAIRE : MECANISMES POSSIBLES
(CLARKE ET GLEESON)



A - ACTIVATION DES ENZYMES PERIPHERIQUES ET PRODUCTION DE

NUCLEOTIDES CYCLIQUES

a) Nucléotides cycliques éventuel second messenger

Les nucléotides cycliques et en particulier le cAMP (adénosine monophosphate cyclique) possèdent un rôle régulateur sur un nombre important de systèmes (Tableau n° 7) et existent aussi bien dans le règne végétal qu'animal.

Les modalités du contrôle qu'ils exercent dans divers processus biologiques sont maintenant établies. La fonction principale du cAMP, en tant que second messenger, consiste en la régulation d'une protéine-kinase (Figure n° 8) responsable à son tour de la phosphorégulation de différentes protéines telles les enzymes des divers métabolismes (lipidique, glucidique), les protéines contractiles de l'actine ou encore les enzymes intervenant dans le transport actif du calcium.

La production de nucléotides cycliques met en jeu des enzymes (adenyl et guanyl cyclases) à localisation membranaire et dont l'unité catalytique est orientée vers le cytoplasme. Nous allons envisager quelques exemples de couplages fonctionnels récepteur-cyclase.

b) Couplage fonctionnel : récepteur-adénylcyclase

Le couplage fonctionnel récepteur-adénylcyclase trouve deux illustrations au niveau des récepteurs de toxines et au niveau des récepteurs d'hormones.

bi) Réception de toxines
=====

Comme nous l'avons vu précédemment, les gangliosides possèdent la capacité de fixer les toxines émises par *Vibrio cholerae*. La



TABLEAU 7

DIVERS ROLES REGULATEURS DU cAMP (GREAVES)

1) SECOND MESSAGER DANS LA REPOSE HORMONALE

- adrénaline (glycogénolyse)
- noradrénaline (libération d'acétylcholine)
- hormone parathyroïde
- hormone lutéinisante
- glucagon, vasopressine, thyroxine, etc.....

2) VISION

3) REGULATION DE LA PROLIFERATION ET DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

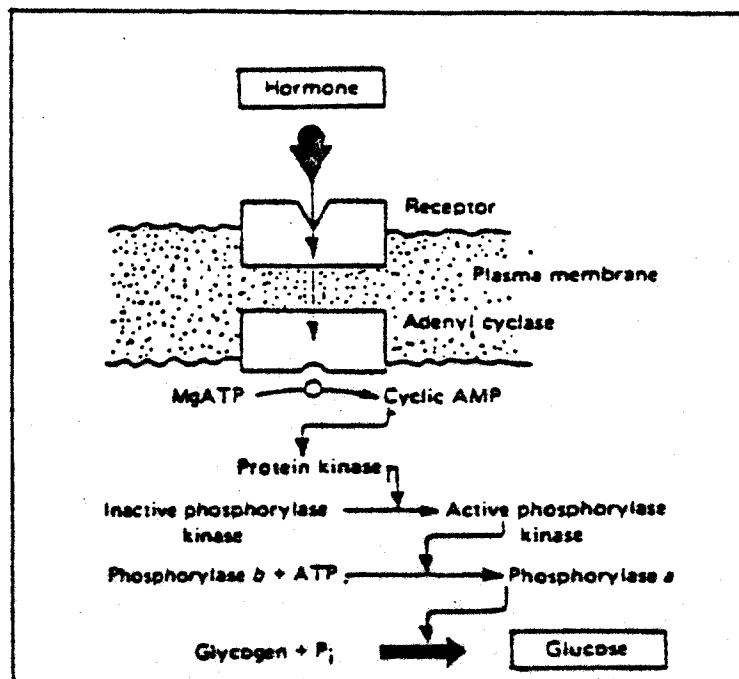
4) EXPRESSION GENIQUE DES BACTERIES

5) CONTROLE DE LA LYSOGENIE BACTERIENNE

6) AGREGATION DES CELLULES DE PROTOZOAIRES

FIGURE 8

INITIATION DE LA REPOSE INTRACELLULAIRE : ACTIVATION D'ENZYMES PERIPHERIQUES ET PRODUCTION DE NUCLEOTIDES CYCLIQUES



réception de la toxine cholérique sur son récepteur membranaire spécifique (GM_1) conduit à l'activation de l'adénylcyclase et à la production de cAMP (FIELD -77-, FRANKS -81-). De même la fixation de la toxine tétanique sur son récepteur (GD_1b) provoque la libération de cAMP.

b2) Réception des hormones

=====

Les hormones polypeptidiques ne pénètrent pas dans la cellule-cible et se fixent sur leurs récepteurs membranaires (glycoprotéines); leur message est transmis à la machinerie biosynthétique cellulaire par l'intermédiaire de la production de cAMP (CUATRECASAS -54-).

Un modèle de couplage fonctionnel est présenté figure n° 9.

c) Couplage fonctionnel : récepteur-guanylcyclase

Il semble que le cGMP (guanosine 3', 5' phosphate cyclique) puisse prendre le relais du cAMP.

La formation du cGMP est catalysée à partir du GTP par la guanylcyclase.

Dans de nombreux systèmes de reconnaissance c'est le rapport cAMP/cGMP, c'est-à-dire le rapport de deux paramètres partiellement antagonistes qui serait efficace et déterminerait la réponse intracytoplasmique (GREAVES -97-).

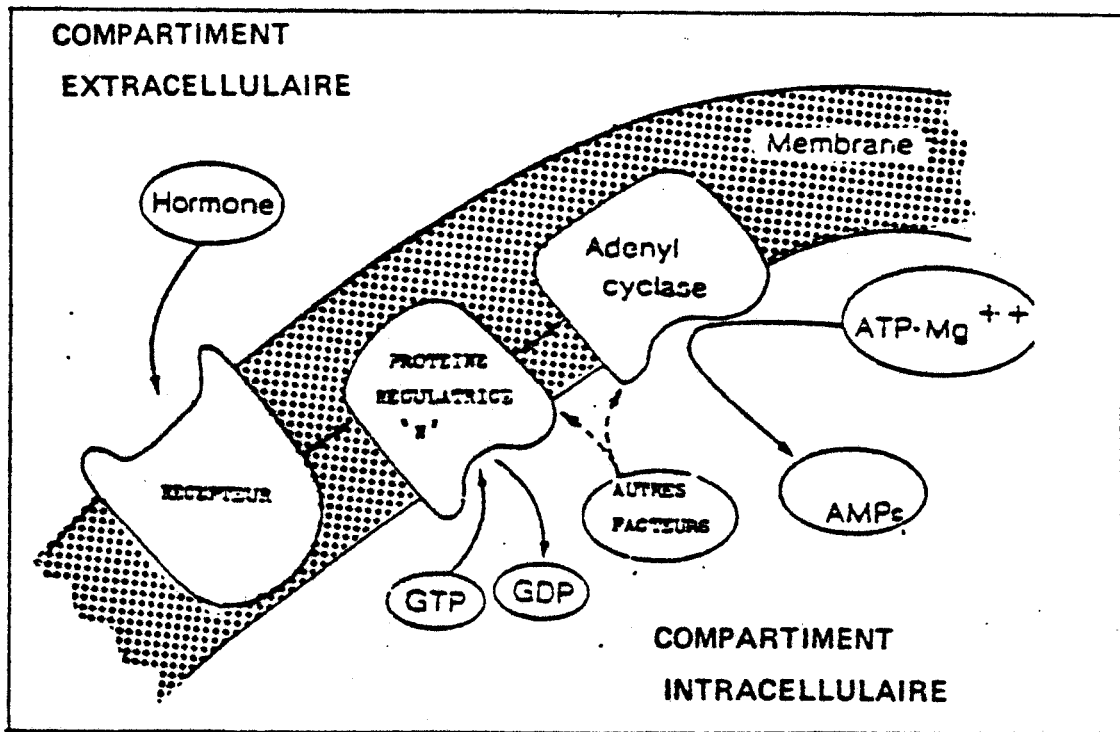
B - ACTIVATION D'ENZYMES PERIPHERIQUES ET MODIFICATION DE LA

PERMEABILITE AUX IONS

Dans certains cas, la fixation d'un ligand sur son récepteur spécifique induit la pénétration d'ions dans la cellule réceptrice et il est maintenant bien établi que les réactions de reconnaissance

FIGURE 9

SCHEMA HYPOTHETIQUE DE L'ACTIVATION DE L'ADENYL-CYCLASE PAR UNE HORMONE POLYPEPTIDIQUE



perturbent la perméabilité faible des membranes pour les cations (LAZO et coll. -166-). En effet des changements importants de perméabilité et d'activité des ATPases $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ dépendantes sont enregistrés après fixation sur des lymphocytes de deux lectines phytohéماغglutinine ou concanavaline A. Cette perméabilité est fonction de la structure membranaire et dépend du métabolisme cellulaire (Figure n° 10a). La modification de la perméabilité aux ions peut se faire de diverses façons : activation ou inactivation des transporteurs (ATPases), changements dans les paramètres cinétiques.

a) Perméabilité aux ions Na^+ et K^+

La liaison "acétylcholine-glycoprotéine" au niveau de la jonction neuromusculaire déclenche des modifications membranaires conduisant à la déformation d'une protéine ionophore responsable du passage des cations (GRUHAGEN-CHANGEUX -98-). Il s'ensuit une entrée rapide d'ions sodium et une sortie lente d'ions potassium. Ce flux de charges positives dépolarise la membrane de la cellule musculaire et déclenche le potentiel d'action qui se propage tout au long de la fibre. Le modèle de De ROBERTIS -250- (Figure 10b) représente une organisation fonctionnelle possible du récepteur cholinergique au niveau de la membrane post-synaptique.

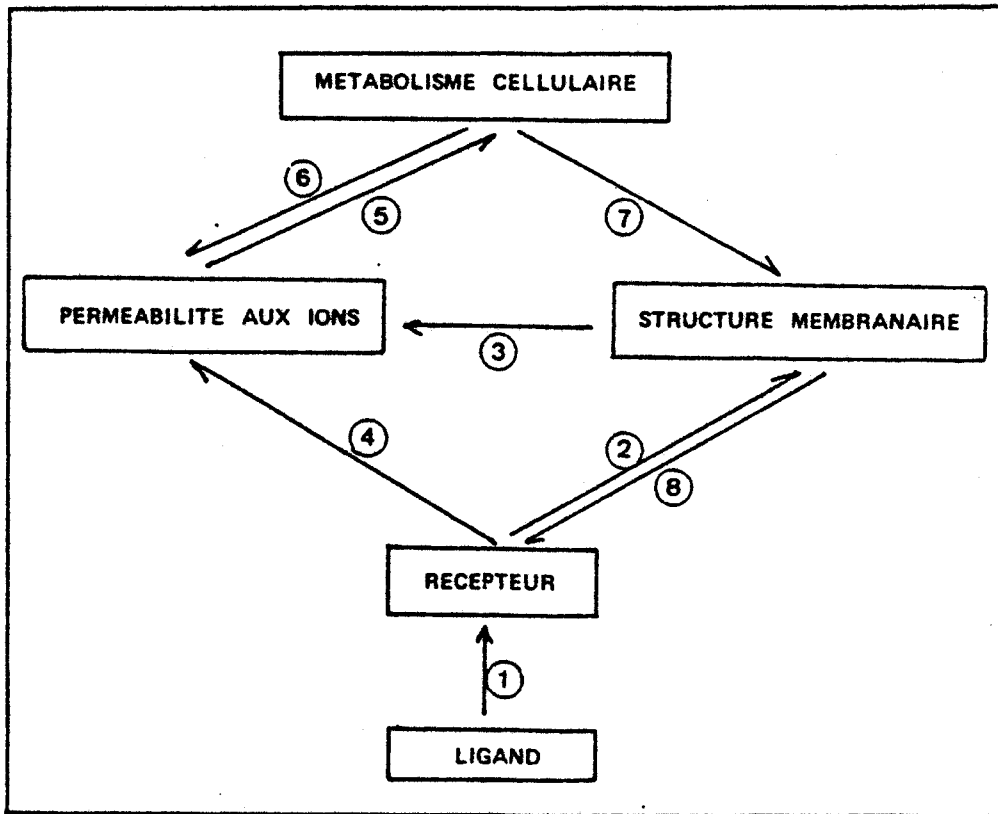
b) Perméabilité aux ions calcium Ca^{2+}

Un nombre de plus en plus grand de travaux démontre que les ions Ca^{2+} jouent un rôle crucial dans la réponse cellulaire à la liaison de ligands messagers en surface (GOMPERS -96-).

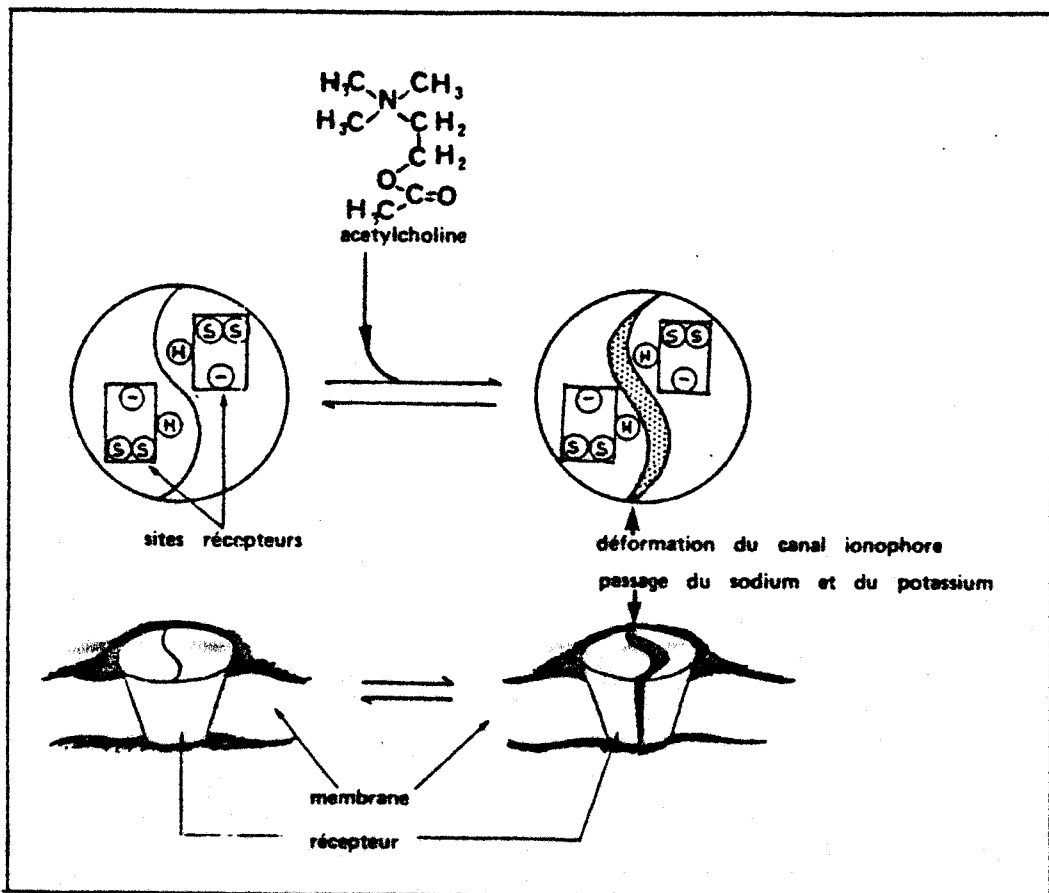
Le rôle de second messenger du Ca^{2+} n'est plus à démontrer. Nous n'en donnerons que deux exemples. Des variations dans les concentrations

FIGURE 10

A RELATIONS ENTRE RECEPTION D'UN LIGAND, PERMEABILITE ET METABOLISME CELLULAIRE (LAUF)



B ACTION DE L'ACETYLCHOLINE SUR LA PERMEABILITE CELLULAIRE



BUS LILLE

intracellulaires de Ca^{2+} peuvent provoquer l'activation de la prolifération des lymphocytes (MAINO et coll. -193-) ou encore celle d'oeufs d'oursin non fertilisés (STEINHARDT et coll. -288-).

Parmi les nombreux rôles de régulateur du Ca^{2+} , il faut signaler l'importance des interactions entre le calcium et les microtubules et microfibrilles ou encore le contrôle qu'il exerce sur le métabolisme des nucléotides cycliques : inhibiteur (adenylcyclase) et activateur (guanylcyclase). Mais le fait que les nucléotides cycliques peuvent, à leur tour, influencer la libération du Ca^{2+} dans le compartiment intracellulaire, rend peu claire la notion d'un second messenger unique.

C - MIGRATION DU LIGAND EXTRACELLULAIRE VERS LE COMPARTIMENT

INTRACELLULAIRE

Une troisième possibilité de production d'un messenger intracellulaire est représentée par la migration vers le compartiment intracellulaire du ligand ou d'une partie du ligand après sa fixation sur le récepteur spécifique périphérique. L'intervention de processus (phagocytose ou endocytose) est indispensable.

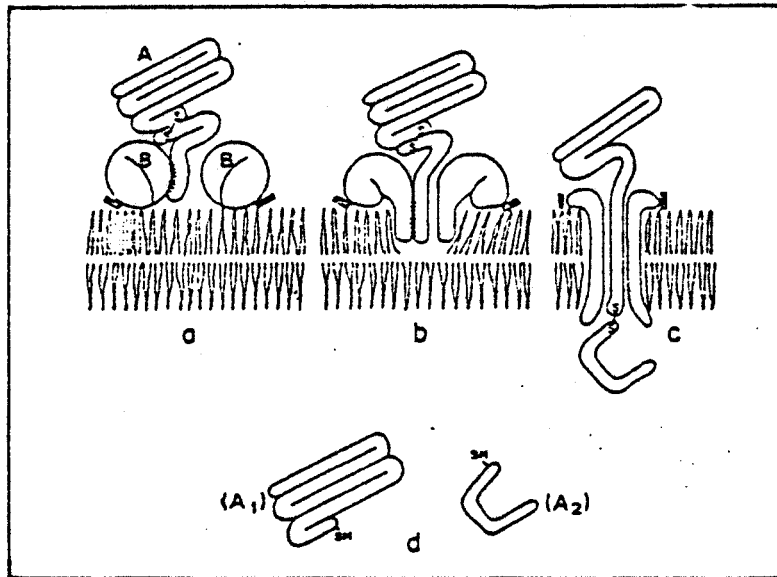
Nous présentons figure n° 11a un modèle possible de migration d'un peptide au travers de la membrane (GILL -92-, CRITCHLEY-VICKER -53-).

Cette possibilité d'un ligand-messenger intracellulaire après migration transmembranaire n'est pas hypothétique. Elle est illustrée par la migration de la toxine du choléra au travers de la membrane (Figure n° 11b). La toxine est un polymère dont la partie centrale, pourra traverser la membrane et migrer vers le compartiment intracellulaire.

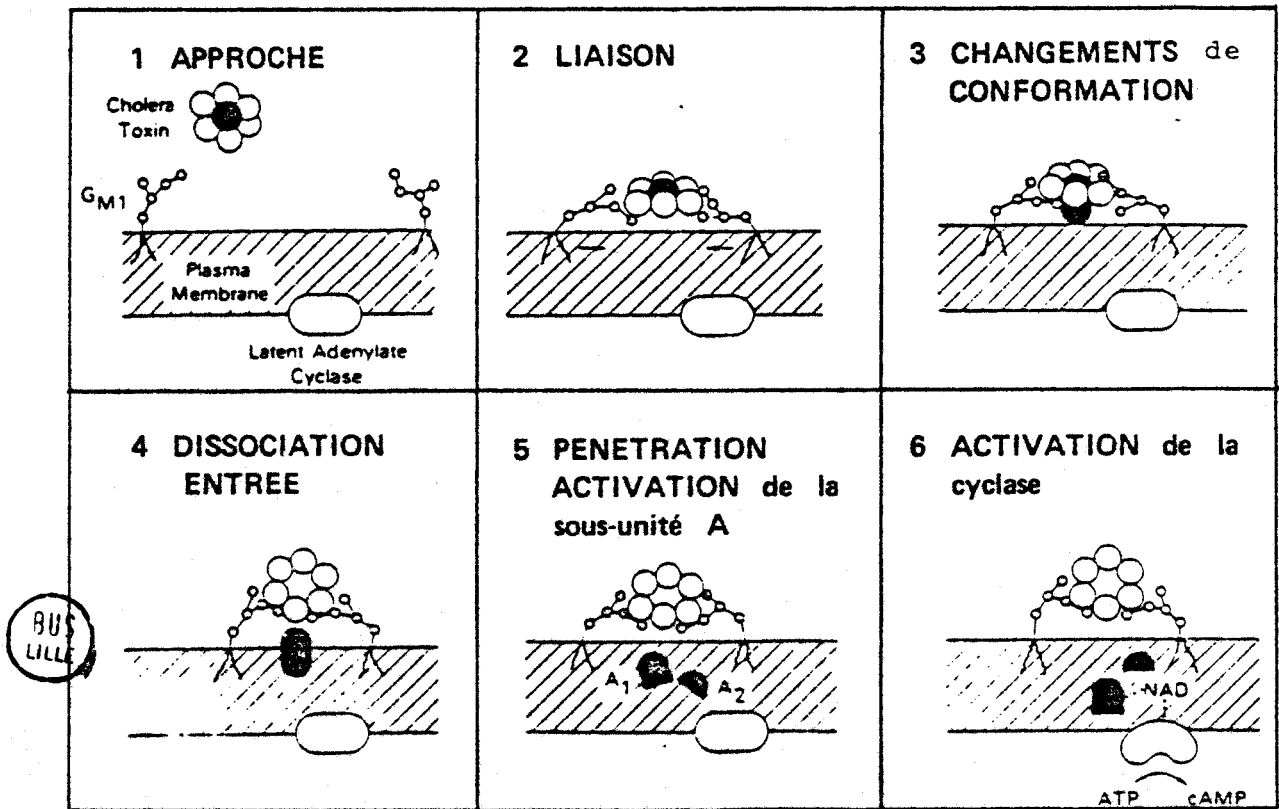
Un autre exemple est celui des enzymes lysosomiaux. Ces enzymes sécrétés par certaines cellules sont reconnus par d'autres. Leur

FIGURE 11

A MODELE DE LA MIGRATION D'UN PEPTIDE A TRAVERS LA MEMBRANE



B MECANISME D'ACTION DE LA TOXINE DU CHOLERA



reconnaissance par un récepteur approprié déclenche un phénomène de phagocytose conduisant à l'internalisation de ces enzymes dans les lysosomes (HICKMAN-NEUFELD -115-). C'est également le cas des asialoglycoprotéines qui après reconnaissance au niveau des récepteurs d'Ashwell, sont éliminées de la circulation par un processus identique d'internalisation (MORELL et coll. -206-).

Ces phénomènes d'endocytose ou de phagocytose sont en étroite relation avec l'infrastructure cellulaire : microfilaments et microtubules eux mêmes régulés par le Ca^{2+} et de façon indirecte par les cAMP - cGMP.

De la définition du (ou des) second(s) messenger(s) il ressort que la membrane doit posséder certaines propriétés de fluidité pour que l'émission de ce second messenger soit possible.

Ainsi, activation d'enzymes, perturbations de la perméabilité membranaire et migration du ligand sont trois processus qui impliquent une certaine fluidité membranaire correspondant à l'étape de relais. C'est ce relais que nous allons décrire.

V - EXIGENCE DU RELAIS TRANSMEMBRANAIRE

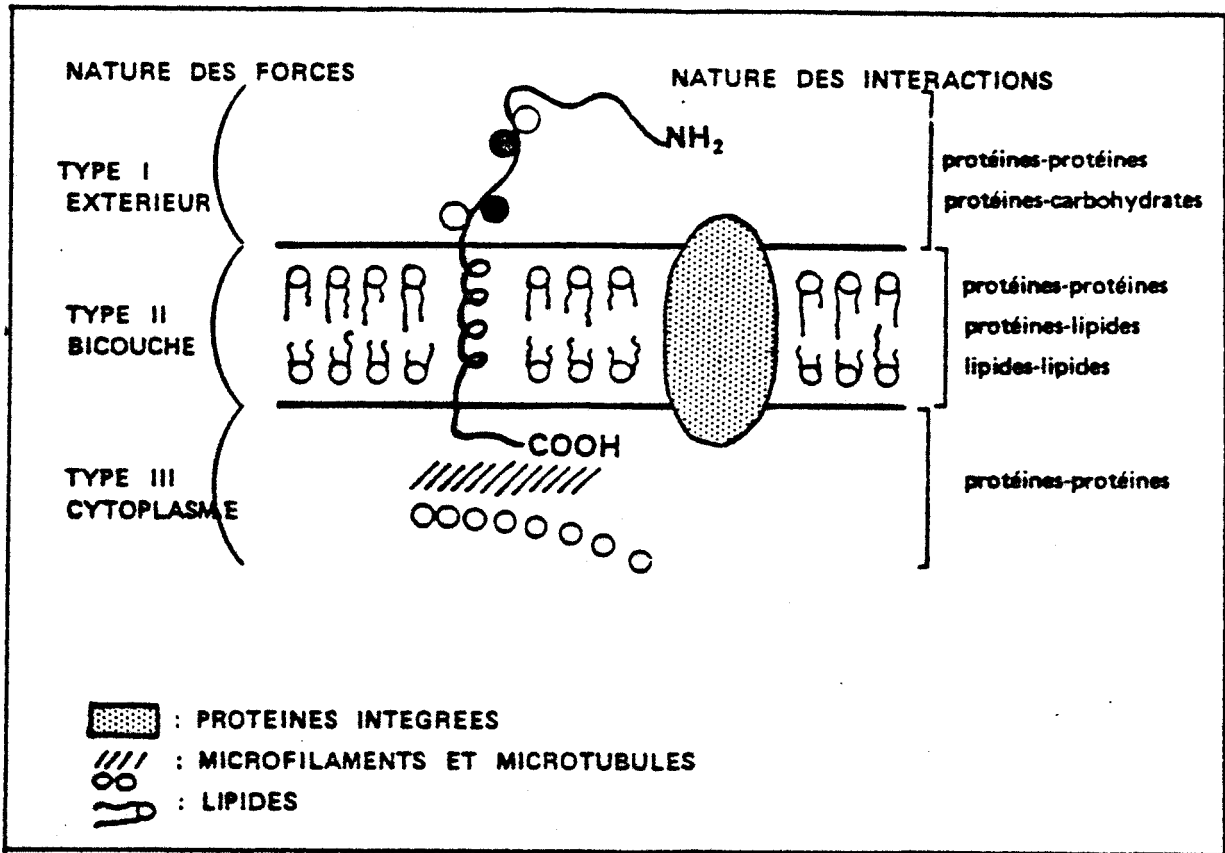
Le relais transmembranaire représente le maillon le plus mal défini dans le couplage reconnaissance-réponse nécessaire au déroulement des processus de communication. Cependant l'analyse de la structure du récepteur et de la production d'un second messenger permet d'envisager ce relais et d'en définir les exigences.

A - EVIDENCE D'UN CONTROLE TRANSMEMBRANAIRE

La mobilité des récepteurs périphériques et la coordination reconnaissance-réponse sont la preuve formelle d'un contrôle transmembranaire.

FIGURE 12

NATURE DES FORCES ET DES INTERACTIONS AUXQUELLES SONT SOUMISES
LES PROTEINES INTEGREES



a) Contrôle de la mobilité des récepteurs

Le contrôle transmembranaire du récepteur se situe selon EDELMAN

-166- à différents niveaux qui sont :

- celui de la modulation de la surface cellulaire,
- celui de l'amplification de l'information,
- celui de l'ancrage de cette information.

La modulation de la surface réceptrice se traduit par des changements dans la structure, l'ordonnement et l'état dynamique des récepteurs.

La reconnaissance et l'association combinatoire des molécules de surface en un supra-complexe conduisent à un phénomène d'amplification qui se propage ensuite à d'autres unités de reconnaissance (HOOD et coll. -120-).

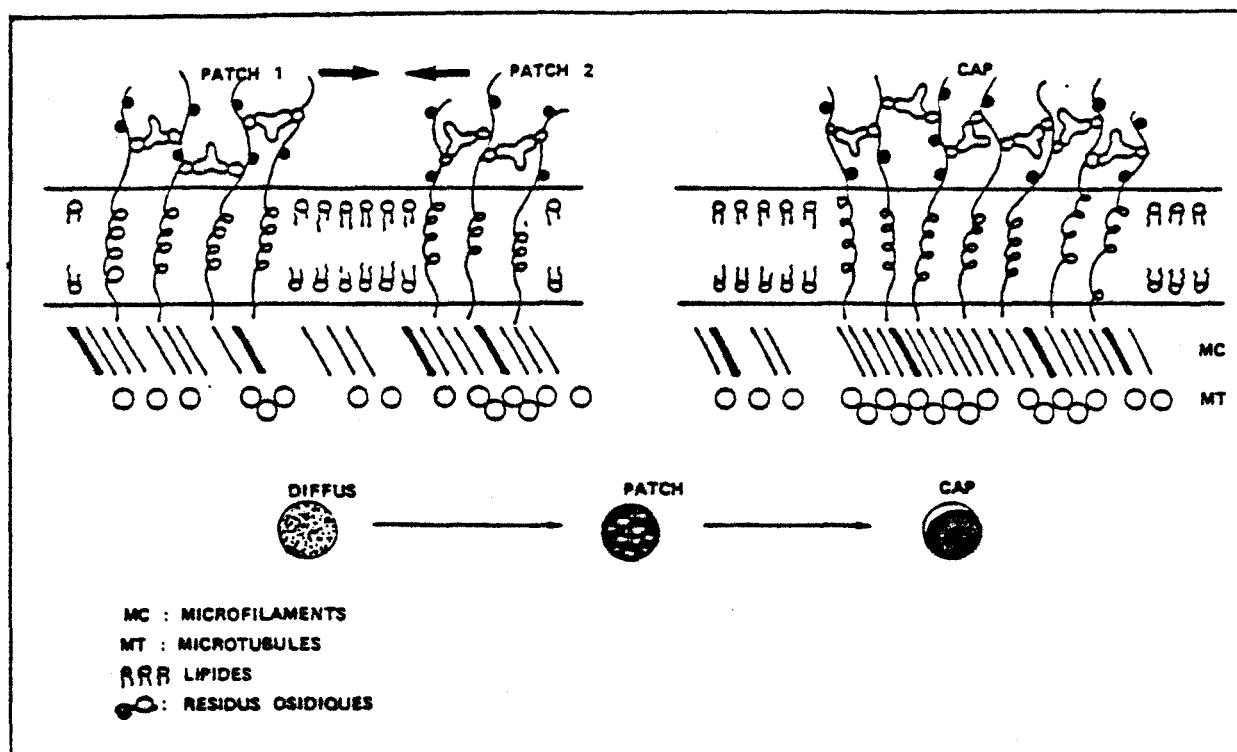
a1) Modulation et amplification de l'information

=====

Si on considère un récepteur (glycoconjugué) capable de diffuser latéralement dans le plan de la membrane, diverses forces vont s'exercer sur celui-ci perturbant ainsi sa mobilité, sa distribution périphérique, son comportement moléculaire. Nous avons représenté dans la figure n°12, un récepteur hypothétique dont le glycanne recouvre la surface externe de la membrane. Un tel récepteur, traversant de part en part la membrane, est en relation avec des zones hydrophobes et hydrophiles et peut par conséquent interagir avec des ligands extra et intracellulaires. Il est soumis à un nombre incalculable de forces qui viennent le contraindre mais actuellement il n'existe que peu de données sur l'estimation des contributions relatives des forces agissant sur un tel récepteur (SANDERMANN -266-). Cependant il est hautement probable que les forces entraînées par la liaison avec certains ligands et par les interactions

FIGURE 13

MOBILITE DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES, FORMATION DE «PATCH» ET DE «CAP»



TABEAU 8

CLASSIFICATION DES DIVERS PHENOMENES EN RELATION AVEC LA
MODULATION DE SURFACE (SELON EDELMAN)

<p>I - Interactions non covalentes liées à une altération locale des récepteurs spécifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - liaison antigène-anticorps - altération des antigènes d'histocompatibilité - attachement des virus sur leur cellule - liaison ganglioside-toxine du choléra - liaison de l'insuline ou d'autres hormones
<p>II - Interactions non covalentes liées à une altération globale de la surface cellulaire</p> <ul style="list-style-type: none"> - liaison lectine-glycoprotéine - capping
<p>III - Interactions covalentes résultant de la modulation de surface</p> <ul style="list-style-type: none"> - clivage protéolytique des glycoprotéines de surface - action des glycosyltransférases
<p>IV - Interactions cellulaires complexes</p> <ul style="list-style-type: none"> - interaction spermatozoïde-ovule

BUS
LILLE

avec les structures submembranaires soient très importantes. De même, les interactions contractées dans la matrice lipidique doivent jouer un rôle négligeable dans la mobilité d'un tel récepteur.

La meilleure preuve de la mobilité des récepteurs est donnée par la formation de "patches" puis de "caps" à la suite d'interactions entre surfaces cellulaires (récepteurs) et anticorps divalents dirigés contre les récepteurs de ces surfaces. En quelques minutes tous les récepteurs ont migré en un point de la surface cellulaire. (Figure n° 13). Ces deux phénomènes de "patching" et de "capping" témoignent de la mobilité latérale des récepteurs enlisés dans la matrice lipidique.

Le processus de patching correspond à une modulation locale, le processus de capping à une amplification du phénomène de mobilisation des récepteurs. Toutefois, on ne connaît pas encore la signification biologique de ces deux processus.

Les détails moléculaires et cinétiques de ces événements modulateurs ne sont en général pas connus, car la surface cellulaire subit des cycles complexes de synthèses, de redistribution et de turn-over. Toutefois, il a été démontré que le turn-over lipidique conditionnait la mobilité des récepteurs et l'agglutinabilité des cellules par les lectines (HORWITZ et coll. -121-).

Une classification des phénomènes en relation avec le processus de modulation de surface a été donnée par EDELMAN -71- et est présentée tableau 8.

a2) Ancrage de l'information

=====

Nous venons d'évoquer la réalité de la modulation de surface qu'elle soit restreinte ou amplifiée. Cette modulation de la surface

est sous la dépendance étroite d'un contrôle membranaire.

De même le maintien d'un récepteur dans une position donnée implique également un contrôle transmembranaire. Cet ancrage de l'information est également un phénomène modulable (YAHARA-EDELMAN -317-). En effet, l'application locale de concanavaline A inhibe le mouvement des récepteurs sur le reste de la membrane (EDELMAN -71 -).

Ainsi la modulation et l'ancrage de l'information reposent sur un contrôle transmembranaire et nécessitent, en plus de la participation des structures microfilamenteuses, la coopération de la fluidité de la matrice lipidique (YAHARA-EDELMAN -317-, BERLIN et coll. -20 -). Un modèle simple a été proposé (Figure n° 13) pour décrire modulation et ancrage d'informations. Il repose sur trois notions clefs :

- pénétration du récepteur dans la membrane,
- association à des microfilaments de type actine qui permettent la coordination des mouvements,
- association à des microtubules ;

les deux derniers points permettant l'ancrage du récepteur et la propagation du signal de l'extérieur vers l'intérieur. Ce modèle implique que le récepteur existe sous deux formes fondamentales : libre et ancré.

b) Contrôle de la coordination reconnaissance-réponse

Le contrôle transmembranaire de la coordination réception d'une information-émission d'une réponse est évident . Nous allons le décrire au niveau des récepteurs couplés : à la production de cAMP - cGMP, aux ions ou encore aux phénomènes d'internalisation.

b1) Récepteurs couplés au cAMP - cGMP

=====

La façon dont un récepteur influence l'activité de l'adénylcyclase n'est pas encore clairement définie.

Une des possibilités qui vient directement à l'esprit est que l'adénylcyclase est un enzyme allostérique dont la conformation est stabilisée par l'activité du récepteur. Dans ce cas, le récepteur serait également transducteur et sa mobilité basée sur la fluidité membranaire serait cruciale.

Une autre possibilité est que l'association entre récepteur et adénylcyclase est indirecte. La réponse intra-cytoplasmique (production de cAMP) dépendrait de changements dans les propriétés générales de la membrane (fluidité, perméabilité aux ions) et/ou des effets particuliers d'une molécule transductrice possédant certaine affinité pour la cyclase.

La régulation des enzymes allostériques membranaires par la matrice lipidique n'est pas uniquement spéculative comme le prouvent les travaux de FARIAS et coll. -73-.

b2) Récepteurs couplés aux ions

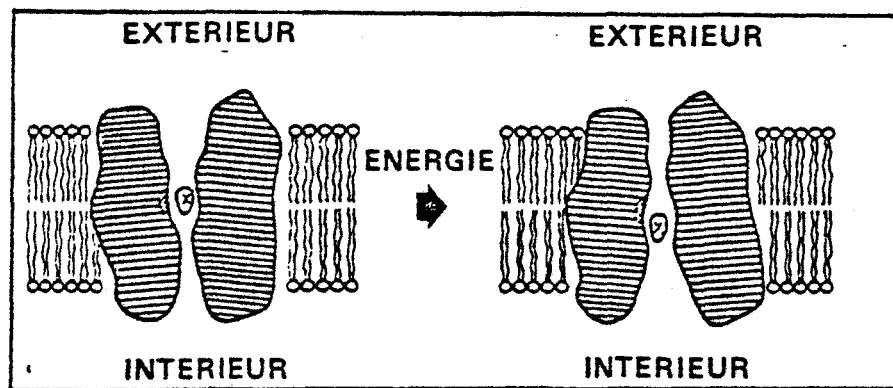
=====

La façon dont le couplage réception-réponse se fait pour ces récepteurs n'est pas non plus connue. Cependant, il est raisonnable de penser que la fermeture ou l'ouverture des canaux ionophores relèvent d'interactions entre les unités monomériques de base des ionophores et seraient favorisées par des interactions à l'intérieur de la matrice lipidique et par l'état plus ou moins fluide de la membrane (Figure 14).

Il est également difficile d'expliquer la double relation récepteur-ATPase-transport actif des ions. On ne peut invoquer dans le couplage "information/réponse" l'intervention de résidus oligosaccharidiques. En effet, les monomères, constitutifs des ATPases $\text{Na}^+ + \text{K}^+$

FIGURE 14

SCHEMA DE L'OUVERTURE ET DE LA FERMETURE DES CANAUX IONOPHORES



dépendantes, ne sont pas des glycoprotéines. Seule une régulation allostérique de l'enzyme par les lipides est envisageable (LAUF -164-).

Les travaux de FARIAS et coll. -73- ont permis de démontrer la régulation "cryptique" de l'activité des ATPases par les acides gras des lipides membranaires.

b3) Récepteurs couplés aux phénomènes de phagocytose

=====

Dans le cas de ce couplage fonctionnel, la participation de la membrane et de la matrice fluide est indéniable. Le mouvement de macromolécules au travers de la membrane ne peut s'envisager qu'avec le secours de la " malléabilité " de la membrane.

b4) Conclusion

=====

En conclusion nous présenterons le modèle proposé par CUATRECASAS et HOLLENBERG -55- dans l'exemple de la réception de la toxine cholérique par les membranes cellulaires (Figure n° 15). L'émission de la réponse dans ce modèle met en oeuvre :

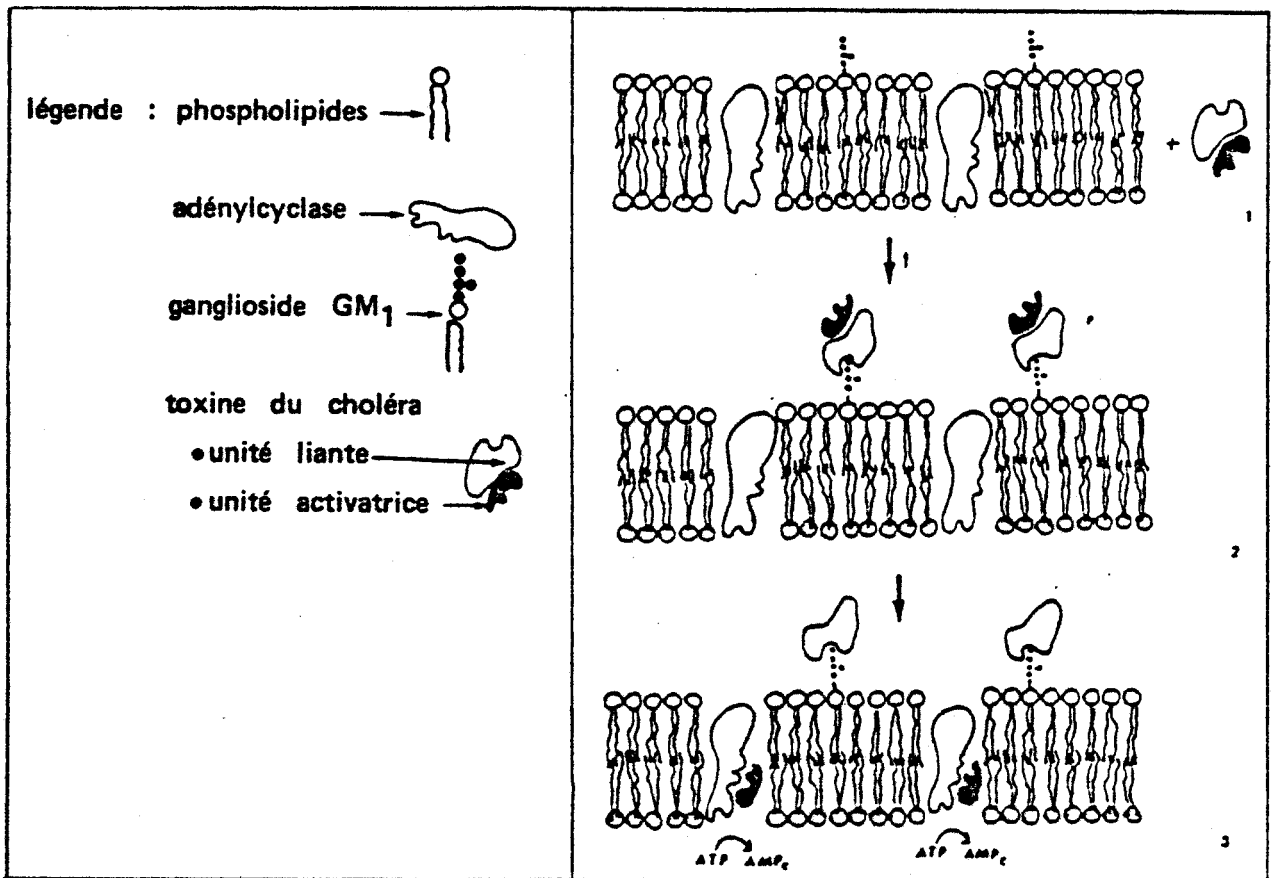
- la migration d'une molécule active se détachant du complexe et traversant la membrane,

- l'activation de l'adénylcyclase par le monomère actif.

Il en ressort que le couplage d'un récepteur avec la production de nucléotides ou avec la libération d'ions ou encore mettant en jeu des phénomènes analogues à l'endocytose ou phagocytose est schématique. De nombreuses interactions peuvent se produire au niveau de ces trois processus engendrant une réponse intracellulaire. De plus ce modèle met en évidence l'importance du caractère fluide et coopératif de la membrane et plus particulièrement de la matrice lipidique.

FIGURE 15

SCHEMA DU MECANISME D'ACTION DE LA TOXINE DU CHOLERA



Nous allons donc envisager les modalités du contrôle de la fluidité membranaire.

B - CONTROLE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE

La matrice lipidique est composée de phospholipides, de lipides neutres, de glycolipides et de stérol. Elle oscille entre deux états : un état cristallisé (ou solide) et un état liquide très fluide, sans jamais les atteindre. Le passage d'un état vers un autre, ou transition de phase est schématisé figure n° 16a . La transition de phase solide → liquide peut être artificiellement obtenue en augmentant la température ou la teneur en eau.

De nombreuses études physiques, dont nous ne donnerons pas de détails, ont permis de définir les paramètres responsables de ces transitions de phase.

Si on considère la matrice lipidique de la figure n° 16b, deux possibilités s'offrent aux membranes pour réguler leur fluidité :

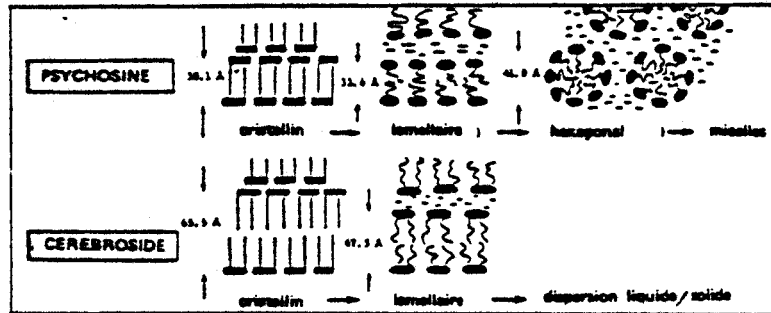
- ou optimiser la fluidité de ses chaînes hydrocarbonées aliphatiques : c'est la régulation viscotropique,
- ou réguler le comportement des groupements polaires dans la zone intermédiaire : c'est la régulation interfaciale.

a) Optimisation de la fluidité des chaînes aliphatiques

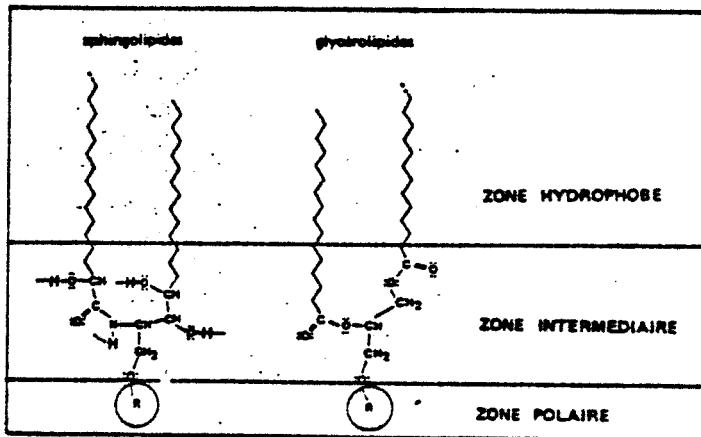
Divers facteurs réunis figure 16c, vont influencer la fluidité membranaire. Par exemple l'augmentation du degré d'insaturation et du taux d'acides gras branchés augmentent la fluidité membranaire et sont contrebalancés par l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrocarbonée, du nombre de groupements hydroxylés qui induisent eux un retour vers l'état cristallin organisé et non fluide.

FIGURE 16

A ILLUSTRATION SCHEMATIQUE D'UNE TRANSITION DE PHASE PAR ADDITION D'EAU A UN SYSTEME AQUEUX DE PSYCHOSINE OU DE CEREBROSIDE



B DIFFERENCE ENTRE SPHINGOLIPIDES ET GLYCEROLIPIDES



C CONTROLE DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE

PARAMETRES	FLUIDITE membranaire	
I - REGULATION VISCOTROPIQUE <ul style="list-style-type: none"> - température - longueur de la chaîne aliphatique des acides gras ou des sphingosines - degré de saturation - isoméris, position des doubles liaisons - nombre de groupes hydroxyles dans les acides gras ou les sphingosines - présence d'acides gras branchés - présence d'acides gras à nombre impair de carbones 		
II - REGULATION INTERFACIALE <ul style="list-style-type: none"> - taux de GSL neurales - taux de gangliosides - taux de stérols - nombre de résidus acides 		

BUS LILLE

Par exemple les membranes riches en acide palmitique (C16:0) ou stéarique (C18:0) présentent une transition de phase à relativement haute température (CALHOUN-SHIPLEY -37-).

b) Contrôle des ponts hydrogène dans la zone intermédiaire

Comme le montre la figure 16b, les glycosphingolipides diffèrent des glycérolipides par leur capacité à établir des ponts hydrogène. Les glycérolipides ne sont que des accepteurs d'hydrogène. Les GSL sont donneurs et accepteurs (PASCHER -241-, FRIEDMAN -83-, ABRAHAMSON et coll. -1-).

Comme la présence de groupements OH ou amide dans un composé lipophile augmente sa polarité et ses interactions avec l'eau, cela contrebalance défavorablement l'effet hydrophobe maintenu dans la matrice lipidique.

En effet, les constituants comme les GSL favorisent la formation de ponts hydrogène. Deux possibilités sont envisageables :

a) les ponts se font avec une molécule d'eau. Tout groupement hydroxyl additionnel augmente le contact lipide-eau soit en poussant la molécule en dehors de la double couche lipidique, soit en augmentant son "espace vital" dans l'interface membranaire. Cela provoque une baisse de stabilité membranaire en réduisant et/ou empêchant l'empilement serré des chaînes aliphatiques.

b) les ponts hydrogène se font latéralement à l'intérieur même de la matrice lipidique. Il s'en suit une augmentation de la stabilité de la membrane et de son imperméabilité. La stabilité et la perméabilité de la membrane ainsi que sa fluidité peuvent donc être régulées au moyen du turn-over lipidique pour s'adapter à des besoins particuliers. Ce contrôle de la fluidité membranaire est directement en relation

TABLEAU 9

PERTURBATIONS MEMBRANAIRES SURVENANT APRES LA LIAISON
D'UN LIGAND SUR SON RECEPTEUR (GREAVES, 1975)

- 1) REDISTRIBUTION DES RECEPTEURS A LA SURFACE CELLULAIRE
patching, clustering, capping
- 2) CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS
mesure de fluorescence
- 3) ALTERATION DE LA FLUIDITE MEMBRANAIRE
mesure de spin
- 4) AUGMENTATION DE L'ENTREE DES IONS ET DES METABOLITES
calcium, potassium, phosphore, etc.....
- 5) AUGMENTATION DU TURN-OVER DES PHOSPHOLIPIDES
et en particulier du phosphatidylinositol
- 6) ACTIVATION DES ENZYMES LIEES AUX MEMBRANES
ATPases, adenylcyclase



avec le métabolisme des phospholipides et des glycolipides (RESCH -248-),

Nous venons d'essayer de définir les modalités de la reconnaissance biologique et par là même de la discrimination soi-non soi.

Ce phénomène est restreint aux surfaces cellulaires et plus particulièrement aux membranes. La réception d'un ligand porteur d'une information sur un récepteur qui la décode induit dans la membrane une succession de perturbations dont les plus importantes sont répertoriées tableau n° 9.

La définition de la reconnaissance et de la discrimination relève de travaux et de résultats obtenus chez les animaux. Nous allons maintenant essayer de définir les modalités de la reconnaissance au niveau de la cellule végétale qui présente une surface cellulaire plus complexe que les cellules animales.

CHAPITRE III

ASPECT MOLECULAIRE DE LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE

CHEZ LES PLANTES

I - INTRODUCTION

Les plantes ne possèdent pas de systèmes immunologiques impliqués dans la production d'anticorps ou dans les phénomènes de rejet de greffe (MOORE -184-), ni aucun autre paramètre caractéristique de l'immunité cellulaire que l'on rencontre chez les animaux. En effet, il n'a pu être encore mis en évidence aucune immunoglobuline, ni aucun système d'histocompatibilité. Au lieu de produire des anticorps, les plantes peuvent produire des composés de faible poids moléculaire, les phytoalexines, qui inhibent la croissance des microorganismes infestants (virus, bactéries, mixomycètes) et assurent ainsi la défense du végétal.

Les plantes possèdent cependant des systèmes de reconnaissance précis, caractéristiques et dont la fonction est d'assurer l'efficacité de la reproduction sexuée. Les événements gouvernant la fertilisation sont complexes et reposent, au niveau du pollen et du pistil, sur des interactions entre cellules qui possèdent en plus de leur membrane plasmique une épaisse paroi.

Nous allons dans un premier temps définir la nature de l'enveloppe cellulaire végétale puis, dans un deuxième temps aborder les modalités éventuelles d'un mécanisme de reconnaissance cellulaire.

II - STRUCTURE DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE VEGETALE

La surface cellulaire, chez les végétaux, diffère de celle des animaux par le fait que la membrane plasmique est recouverte d'une

épaisse paroi. Ces deux enveloppes séparables par plasmolyse, sont fonctionnellement très connectées.

A - STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE

La paroi représente une sorte de tamis moléculaire hautement structuré, chargé électriquement, protégeant la membrane cellulaire et permettant des échanges sélectifs entre les milieux intra et extracellulaires.

Cependant il n'est actuellement plus possible de considérer la paroi de la cellule végétale comme une simple enveloppe externe dénudée de toute activité. Selon PRESTON -244-, elle est "le résultat d'un équilibre délicat" doué d'un rôle physiologique qui lui est propre. La paroi doit en effet s'adapter aux changements de taille et de fonction que subit une cellule au cours de son développement ; surtout lorsque ceux-ci sont en relation avec le rôle de squelette, de conduction ou de protection.

L'analyse structurale de la paroi primaire et secondaire des cellules végétales a été facilitée par l'amélioration des techniques de méthylation et de spectrométrie de masse. La structure des composés de la paroi est maintenant connue ainsi que l'architecture générale qu'ils constituent (PRESTON -244-).

Cette structure de la paroi, qui est par ailleurs interrompue par de nombreux pores (CARPITA -40-), varie considérablement en fonction de l'espèce végétale, du type cellulaire et de son état de différenciation. En général, elle est constituée de deux zones distinctes, de nature essentiellement polysaccharidique, soit :

- une phase discontinue microfibrillaire jouant le rôle de squelette,

- et une matrice amorphe ressemblant à un gel épais. Les études en diffusion de lumière laser ont montré que la densité fluctuait énormément, découvrant ainsi de larges espaces interstitiels entre les amas polysaccharidiques (MACKIE et coll. -191-).

Les molécules constitutives de ces deux phases interagissent simultanément lors des changements de taille et de forme pour maintenir les propriétés mécaniques et protectrices de la paroi.

Les polysaccharides du squelette correspondent à des β (1 \rightarrow 4) glucanes ou cellulose (TU -295-), des β (1 \rightarrow 3) xylanes et des β (1 \rightarrow 4) mannanes.

Les polysaccharides de la matrice sont le plus souvent des homopolymères de type β (1 \rightarrow 4) mannanes ou β (1 \rightarrow 4) xylane, ou encore des polymères branchés de type acide pectique (β 1 \rightarrow 4) rhamnogalacturonane par exemple (HAYASHI et coll. -108-).

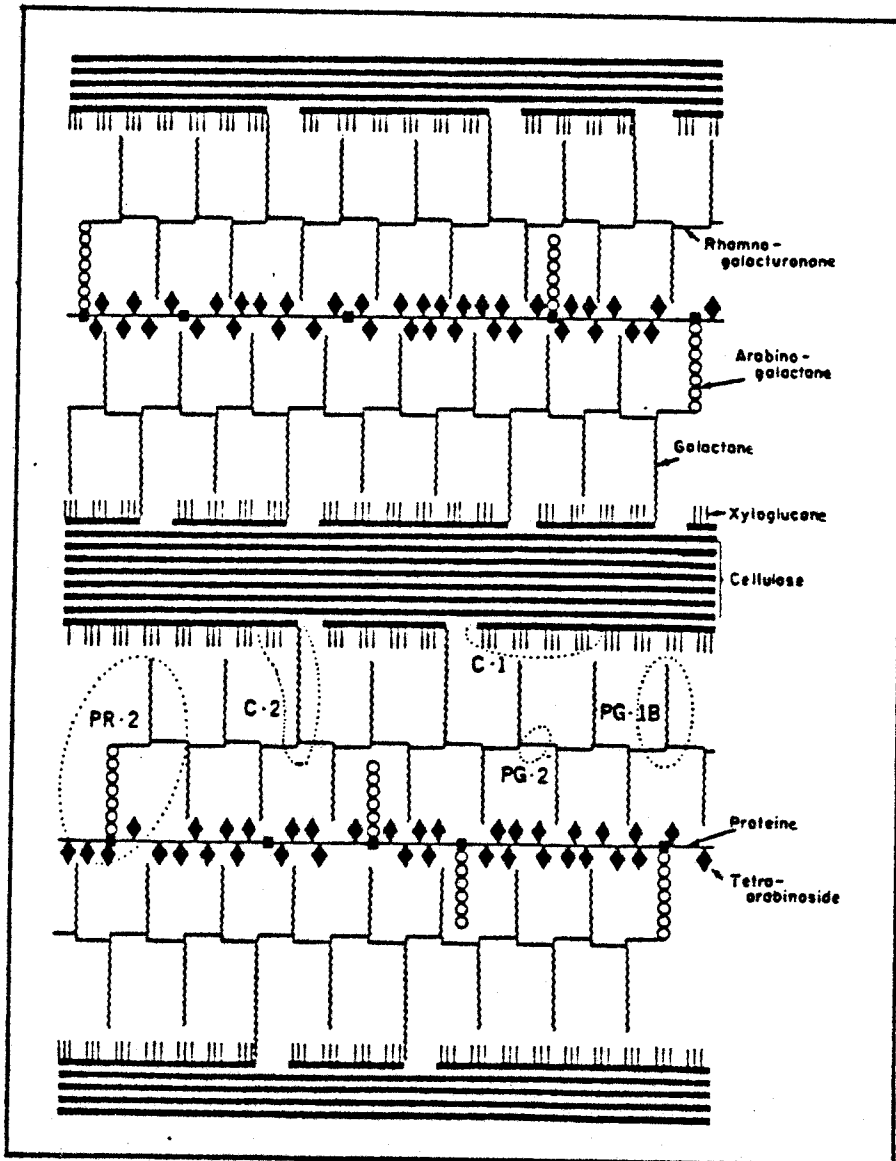
La conformation de ces polysaccharides est déterminée par le mode de liaison entre les unités osidiques, la présence ou l'absence de ramifications latérales, la présence d'eau et par les contraintes imposées par les molécules voisines (PRESTON -244-). Généralement les polymères de type β 1 \rightarrow 4 prennent une configuration en ruban, tandis que les polymères β 1 \rightarrow 3 adoptent spontanément une configuration hélicoïdale.

La synthèse et le dépôt des constituants pariétaux ont été étudiés (KAUSS -138-, VILLEMEZ -307-, NORTHCOTE -234-, LABAVITCH -160-). Des particules complexes associées aux membranes seraient impliquées dans la formation de microfibrilles de cellulose (SCHNEPF et coll. -269-, MUELLER et coll. -213-, GIDDINGS et coll. -91-).

La matrice contient également des glycoprotéines identifiables par leur taux respectif en hydroxyproline ou en sérine. Dans ces

FIGURE 17

STRUCTURE DE LA PAROI DES CELLULES VEGETALES (ALBERSHEIM, 1975)



glycoprotéines, l'hydroxyproline est reliée à la partie glycannique, par l'intermédiaire d'un arabinose, tandis que la sérine est couplée à un résidu de galactose (LAMPART -161-162-163-).

Ces protéines sont elles-mêmes rattachées à la trame polysaccharidique par des liaisons dont la nature et la distribution varient d'une plante à l'autre (PRESTON -244-). Il semblerait toutefois que les glycoprotéines pauvres en hydroxyproline soient fixées aux hémicelluloses par l'intermédiaire de leur galactane (TALMADGE et coll. -292-, SELVENDRAN -273-). Ces résultats sont cependant controversés (PRESTON -244-).

Quelques modèles de paroi ont été proposés (KEEGSTRA et coll. -139-, MORRIS et coll. -211-, ALBERSHEIM -2-, ROLAND et coll. -258-). Nous avons reporté figure 17 le modèle d'ALBERSHEIM, qui bien qu'imparfait rend compte des proportions relatives entre les divers composants et des liaisons covalentes existantes. Toutefois, les liaisons entre polysaccharides et glycoprotéines, ou encore entre Ca^{2+} et polyuronides n'apparaissent pas.

B - STRUCTURE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE

Il existe moins d'informations sur la nature chimique de la membrane plasmique végétale que sur celle des animaux. L'analyse de cette membrane est malaisée car il est difficile d'obtenir des préparations membranaires pures. En effet, le marqueur d'identification classique des membranes animales (la 5' nucleotidase) est totalement absent des végétaux. Cependant la membrane végétale est morphologiquement similaire à celle des animaux. Elle est également constituée de lipides, de protéines et de carbohydrates. Les proportions exactes de ces composés varient en fonction du type de membrane et de son degré de spécialisation (MORRE -209-, SITTE -283-).

Les lipides membranaires sont composés principalement de glycérophosphatides combinés à des stérols, des glycérides neutres, des sphingolipides et des glycolipides. Ces lipides possèdent une composition en acides gras très hétérogène, bien que cette distribution soit contrôlée avec une grande précision (MORRE -209-). Les membranes végétales diffèrent des membranes animales par leur relative pauvreté en glycosphingolipides, par contre elles possèdent les mêmes classes de phospholipides (HITCHCOCK-NICHOLS -117-, GALLIARD-MERCIER -88-, MAZLIAK -198-, MOREAU -205-).

Le spectre des protéines membranaires défini après électrophorèse en gel de polyacrylamide est également très large (MORRE -209-). Cependant, la majorité de ces protéines sont incomplètement identifiées. Comme dans le règne animal elles sont classées en fonction de leur activité enzymatique ou de leur position dans la membrane (intrinsèque, transmembranaire, etc...). La structure même de ces protéines (hydrophiles ou hydrophobes) définit leur degré d'association avec les lipides membranaires. L'organisation précise lipide-protéine est encore, comme pour les membranes animales, mal définie. Cependant, c'est le modèle de SINGER et NICOLSON qui est le plus généralement admis.

De plus récentes études (MORRE -209- et DAUWALDER -58-, MAZLIAK -198-) ont permis de montrer que la synthèse des membranes animales et végétales mettaient en oeuvre les mêmes processus de fabrication et de maturation de leurs composants. En effet, les protéines et lipides destinés à être intégrés dans les membranes plasmiques doivent traverser divers compartiments cellulaires avant d'atteindre leur ultime destination. Les mécanismes responsables du mouvement des composés membranaires sont définis sous le terme anglo-saxon de "membrane flow" ou encore recyclage des vésicules.

Les premières études au microscope de l'interconversion des membranes cellulaires (voir les revues de MORRE et coll. -210-, WAKSMAN et coll. -309-) ont montré que :

1) les composants des membranes dévient les uns des autres de la façon suivante : enveloppe nucléaire → réticulum endoplasmique rugueux → réticulum endoplasmique lisse → appareil de Golgi → vésicules de sécrétion → membrane plasmique. Cette filiation des membranes est la première caractéristique du "membrane flow".

2) il existe une continuité spatiale entre les différents compartiments cellulaires qui est soit directe (ex. : membrane nucléaire-réticulum endoplasmique), soit réalisée par l'intermédiaire de fins tubules qui relient par exemple l'appareil de Golgi aux membranes plasmiques.

3) quand il n'existe pas de continuité directe, des vésicules de transfert assurent le relais.

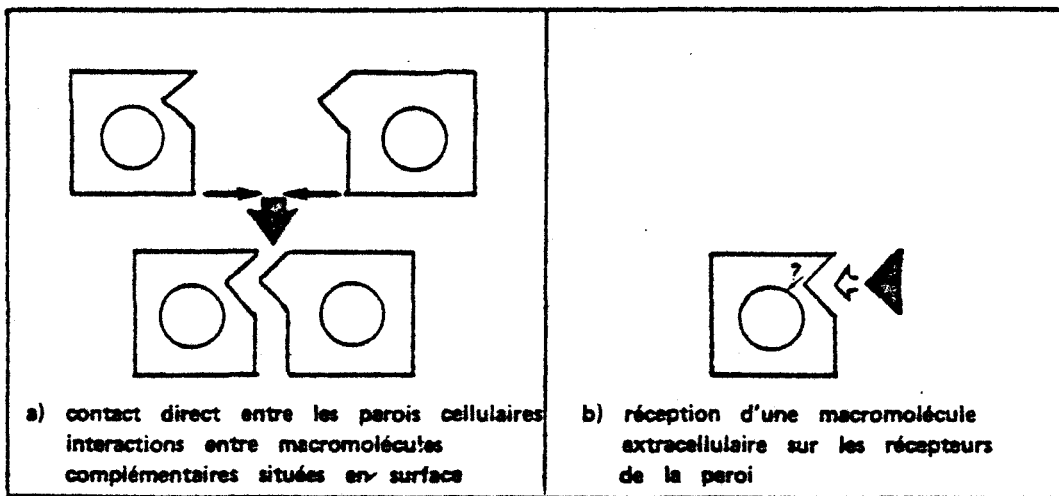
Les études biochimiques ont permis de souligner les différences de constitution existant entre ces diverses membranes intracellulaires (MORRE et coll. -210-).

La migration des constituants membranaires entre les territoires cellulaires adjacents suppose un phénomène de diffusion latérale dans la bicouche lipidique (WAKSMAN et coll. -309-). Cependant, ce concept primordial ne peut à lui seul expliquer toutes les facettes du "membrane flow". Au phénomène de diffusion se superpose un processus de recyclage des vésicules. Aux frontières entre les différents compartiments cellulaires, des vésicules transportant les composés membranaires bourgeonnent, et vont fusionner avec les membranes d'un autre compartiment et y déverser leur contenu pour finalement revenir vers leur compartiment d'origine. Ces mouvements reposent sur deux processus :

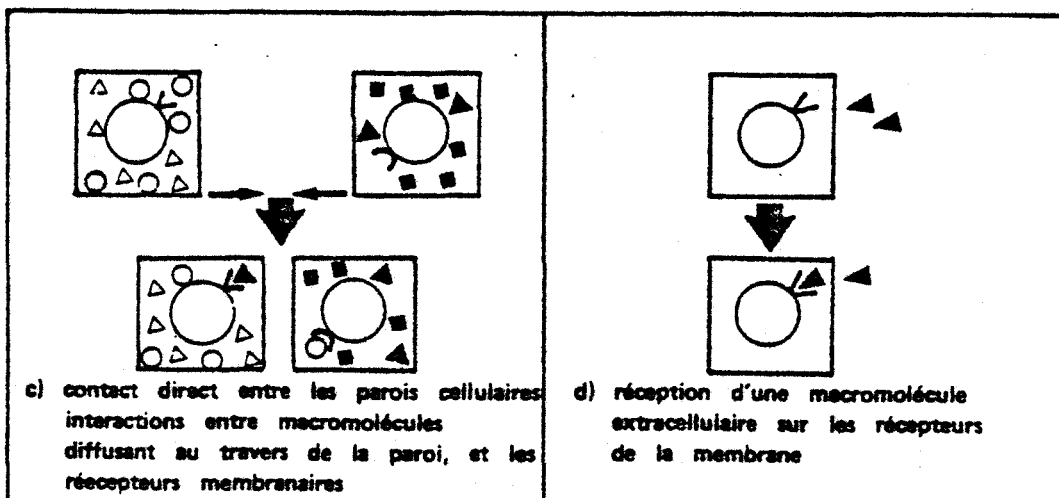
FIGURE 18

MECANISMES DE RECONNAISSANCE CELLULAIRE CHEZ LES VEGETAUX
(CLARKE ET GLEESON)

I) LA PAROI EST LE SITE DE RECONNAISSANCE



II) LA MEMBRANE PLASMIQUE EST LE SITE DE RECONNAISSANCE



1 - l'exocytose : transport et "décharge" de matériel intracellulaire dans l'espace extracellulaire par l'intermédiaire de vésicules,

2 - l'endocytose : la membrane plasmique s'invagine en captant ou non du matériel.

III - MODALITES D'UN EVENTUEL MECANISME DE RECONNAISSANCE CHEZ

LES VEGETAUX

C'est à CLARKE et coll. -46-48- que l'on doit l'analyse des modalités d'un éventuel mécanisme de reconnaissance chez les végétaux. Les diverses possibilités sont résumées figure n° 18 , et reposent sur la présence de plasmodesmes et sur le rôle passif ou non de la paroi.

A - COMMUNICATIONS AU NIVEAU DES PLASMODESMES

Les communications intercellulaires et donc éventuellement la discrimination soi - non soi peuvent transiter par les plasmodesmes : structures provenant apparemment d'extensions des membranes plasmiques dans la paroi et réalisant au travers de cette dernière, des connections entre les divers compartiments cytoplasmiques (ROBARDS -249-, CARPITA -40-). Ces plasmodesmes pourraient représenter des chemins possibles pour un échange d'informations via les membranes plasmiques. Cependant les mouvements à l'intérieur de ces canaux semblent restreints aux molécules de moins de 1000 daltons. Selon CLARKE -48-, les communications transitant par les plasmodesmes seraient importantes dans les échanges d'informations intercellulaires, mais ne seraient en aucun cas impliquées dans les systèmes de reconnaissance extracellulaire, ni dans la discrimination.

B - INTERACTIONS COMPLEMENTAIRES AU NIVEAU DE LA PAROI

CLARKE -48- émet l'idée que lors du contact entre "grain de pollen et cellule stigmatique" ou entre "tube pollinique et cellule stylaire", l'accolement des parois cellulaires est à l'origine d'une sorte de "réorganisation ou déformation" des composants de la paroi qui transmettrait un signal à la membrane plasmique, qui à son tour, l'induirait au compartiment cytoplasmique (Figure n° 18).

Seuls les composés de type oligosaccharidique pourraient être impliqués dans ce type de réaction car ils possèdent un pouvoir de discrimination.

Une interaction complémentaire entre les polysaccharides pariétaux des cellules induirait des perturbations du gel matriciel. De telles interactions affectant ainsi les propriétés de gel de la paroi ont été reportées (MORRIS et coll. -211-). Cependant, les connaissances encore trop fragmentaires sur les associations intermoléculaires et l'organisation de la paroi ne permettent pas de définir plus en détail le rôle des constituants pariétaux.

Une variante à ce mécanisme peut être proposée (CLARKE -48-). Un signal extracellulaire est reçu à la surface de la paroi, puis transmis à la membrane plasmique par un mécanisme impliquant perturbations de la paroi ou émission d'un second messenger.

Ces modèles reposent sur un rôle actif joué par la paroi.

C - TRANSMISSION PASSIVE DU SIGNAL DE RECONNAISSANCE DE LA

PAROI VERS LA MEMBRANE PLASMIQUE

Un autre mécanisme peut être envisagé dans lequel la paroi joue un rôle passif de tamis. Il se peut en effet que le signal moléculaire issu d'une cellule donnée diffuse directement au travers de la paroi et se fixe sur les récepteurs membranaires spécifiques. En effet, les

molécules de diamètre inférieur à 5 nm (équivalent pour une protéine globulaire à un pm de 17000) peuvent diffuser librement au travers de la paroi (CARPITA et coll. -40-) de sorte que cette transmission passive d'un signal est envisageable (Figure n° 18).

Malgré le peu de données précises sur le phénomène de la reconnaissance chez les plantes, il semblerait que ce processus de transmission passive du signal au travers de la paroi, soit à la base de la discrimination self - non self (CLARKE -48-) et en particulier dans les interactions hôte-parasite du soja et de *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. En effet leurs interactions ne peuvent s'expliquer que par la diffusion de polysaccharides de faible poids moléculaire issus de la paroi du champignon vers les récepteurs complémentaires de la membrane plasmique de l'hôte (ALBERSHEIM-VALENT -5-). Il existe de nombreux autres cas de ce type (CLARKE-KNOX -47-, ALBERSHEIM et coll. -3-, LIENER -174-, CALLOW -38-, SEQUEIRA -274-, SCHMIDT -268-).

D - CONCLUSION


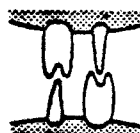



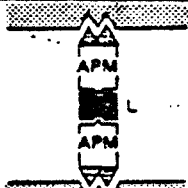
Il semble donc que des récepteurs semblables à ceux rencontrés chez les animaux puissent jouer un rôle dans les phénomènes de discrimination " soi - non soi " qui président à la fertilisation chez les plantes.

La réception de l'information peut être envisagée en terme de liaison entre un ligand porteur d'un message et un récepteur spécifique capable de décoder le message.

L'émission d'une réponse intra-cytoplasmique consécutive à l'étape de reconnaissance peut également se concevoir comme résultant :

FIGURE 19

MODELES DE RECONNAISSANCE CELLULAIRE

	1 WEISS	2 BURGER	3 BALSAMO ET LILIEN
A) RECONNAISSANCE UNILATERALE			
B) RECONNAISSANCE MUTUELLE BILATERALE			
C) RECONNAISSANCE IMPLIQUANT UN FACTEUR D'AGREGATION			

- de l'activation d'enzymes périphériques impliqués soit dans le transport actif des ions, soit dans la production de nucléotides cycliques (cAMP-cGMP),

- ou encore de l'internalisation de la totalité ou d'une partie d'une macromolécule biologiquement active, mettant en jeu des éléments contractiles du cytoplasme.

L'existence de la paroi végétale ne nuit en rien aux modalités de la reconnaissance telle qu'elle est envisagée dans la cellule animale. Elle peut se comparer au glycolemme de ces cellules animales, sorte de manteau cellulaire composé de protéoglycannes (DOLJANSKI -66-).

Ainsi la discrimination issue du contact entre pollen et pistil peut se concevoir, à l'instar des cellules animales (revue de GREAVES -97-), comme résultant (Figure n° 19).

- d'une reconnaissance unilatérale (modèle de WEISS),
- d'une reconnaissance bilatérale (modèle de BURGER et coll.),
- d'une reconnaissance faisant intervenir un troisième élément le "spacer" anglo-saxon ou liant intermédiaire plus ou moins complexe (modèle de BALSAMO et LILIE).

IV - MOLECULES IMPLIQUEES EVENTUELLEMENT DANS LA DISCRIMINATION

" SOI - NON SOI " DES VEGETAUX

Nous venons d'envisager les diverses modalités de la reconnaissance chez les végétaux, ainsi que l'éventualité d'interactions moléculaires impliquant les surfaces cellulaires.

Ces interactions se font par l'intermédiaire de macromolécules caractérisées par leur position périphérique et leur aptitude à nouer des liaisons spécifiques.

En plus des protéines, et des glycoconjugués identiques à ceux décrits pour la cellule animale, il convient d'envisager l'éventuelle

participation de composés typiquement végétaux. En effet, peuvent être également considérés comme ligand (messager) ou comme récepteur des molécules telles que les lectines, les arabinogalactanes, les arbinoxylanes ou encore les allergènes et les phytoaléxines.

A - LES LECTINES

Les lectines ou agglutinines, sont des protéines ou des glycoprotéines sans activité enzymatique, capables de se fixer spécifiquement à certains oligosaccharides. D'abord mises en évidence chez les plantes (LIS-SHARON -185-), les lectines peuvent également être extraites de virus, de bactéries, de champignons ainsi que d'invertébrés ou de vertébrés (SHARON-LIS -276-, BARONDES -19-).

Les propriétés agglutinantes des lectines dépendent de leur liaison sur des glycoconjugués de surface spécifiques. Il semble actuellement que les récepteurs des lectines soient des oligosaccharides branchés très complexes. Le site de combinaison impliquerait plusieurs résidus osidiques, dont la séquence d'enchaînement déterminerait la spécificité.

Bien que les lectines soient dotées d'un pouvoir de discrimination, leur rôle et leur participation dans les processus de reconnaissance ne sont pas encore clairement définis (MARX -194-).

Il se pourrait que certaines lectines encore inconnues, réagissant avec des oses tels que rhamnose, arabinose ou acides uroniques, et donc non détectables par des tests d'hémagglutination, soient impliquées dans les processus de reconnaissance chez les végétaux. En effet, les lectines sont rattachées aux membranes par les résidus osidiques, et peuvent jouer un rôle capital dans les phénomènes de contact et de fusion membranaire (CLARKE-KNOX -46-).

D'autres rôles leurs sont également attribués. Les lectines pourraient servir d'anticorps chez les végétaux, assurer le transport ou le stockage des sucres, protéger la plante contre les invasions fongiques ou encore être impliquées dans l'organisation des systèmes multienzymatiques de nature glycoprotéique (ALBERSHEIM et coll. -3-, LIENER -174-). Le contrôle de la germination, de la division cellulaire, des relations symbiotiques, des interactions plantes-agents pathogènes sont autant de processus dans lesquels les lectines peuvent avoir leur importance (CLARKE-KNOX -46-).

B - LES PHYTOALEXINES

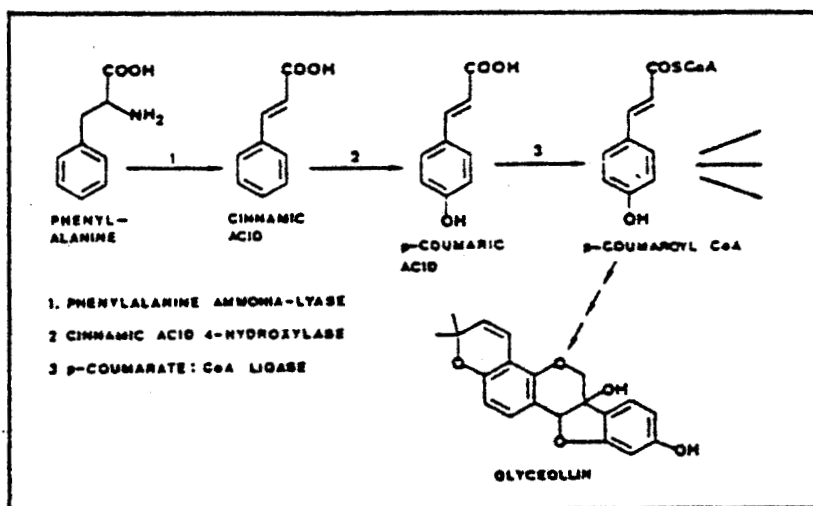
Les plantes réagissent à l'invasion par les virus, les bactéries ou les champignons par la production de phytoalexines qui inhibent leur croissance. Ces phytoalexines sont produites même si le micro-organisme n'est pas pathogène. Les mécanismes qu'utilisent les organismes compatibles pour inhiber l'effet des phytoalexines ne sont pas connus.

Les molécules ou "elicitor" capables de produire l'accumulation de phytoalexines sont toutes des β 1-3 glucanes substitués en position 6 (KEEN -140-, ALBERSHEIM et coll. -4-). L'elicitor le plus petit, capable d'induire la synthèse de phytoalexines telles que la glycéoline présentée figure n° 20, est composé de 8 résidus osidiques.

Ces composés, par leur capacité à reconnaître et à fixer certaines molécules étrangères peuvent donc être impliqués dans les processus de reconnaissance.

FIGURE 20

SYNTHESE D'UNE PHYTOALEXINE : LA GLYCEOLLINE



C - LES COMPOSANTS DE LA PAROI CELLULAIRE

a) Les arabinogalactanes

Ces composants de la paroi cellulaire pourraient également être associés aux processus de reconnaissance. En effet, leur localisation à la surface cellulaire et leur capacité à fixer d'autres molécules telles que l'antigène artificiel présenté figure n° 21a, en font des candidats potentiels.

Leur structure, présentée figure n° 21b, a été déterminée par ANDERSON et coll. -222-. Ils sont composés d'un polymère principal d'unités galactosyl reliées par des liaisons osidiques en β 1-3, sur lequel viennent se brancher des polymères de galactose (liaison β 1-6) substitués par des résidus d'arabinose. Le rattachement à la partie protéique est assuré par une liaison de type osidique entre hydroxyproline et galactose.

Cette structure branchée complexe peut définir une certaine stérosspécificité nécessaire au processus de reconnaissance.

b) Les arabinoxylanes

Autres composants de la paroi, les arabinoxylanes possèdent également une capacité potentielle de reconnaissance. Ils sont agglutinants pour les hématies, au même titre que la concanavaline A (CLARKE-KNOX -46-).

D - LES ALLERGENES

Les allergènes induisent une réponse allergique chez l'homme, et interagissent avec des immunoglobulines spécifiques : les IgE. La fixation des allergènes sur une cellule réceptrice provoque la libération d'amines actives dont résultent les symptômes allergiques.

Le plus souvent, les allergènes sont des protéines ou glycoprotéines acides dont les poids moléculaires s'échelonnent entre 5000 et 40000. Leur localisation est restreinte à la paroi du pollen.

Leurs propriétés antigéniques et leur capacité à se lier aux IgE en font des candidats potentiels pour les processus de reconnaissance.

E - LES DETERMINANTS CELLULAIRES

Le terme de déterminants cellulaires désigne l'ensemble des glycoconjugués de surface qu'ils soient de nature lipidique ou protéique. La définition des déterminants ou marqueurs cellulaires a été plus difficile dans les cellules végétales que dans les cellules animales de par la présence même de la paroi. Cependant, il a été possible de produire des anticorps dirigés contre des extraits tissulaires. La preuve de l'existence de déterminants cellulaires chez les végétaux découle des travaux sur les greffes (MOORE -203-).

Puisqu'il est établi que glycoprotéines, glycolipides, lectines, phytoalexines ou arabinogalactanes peuvent prendre part aux processus de reconnaissance, nous nous proposons d'évaluer leur participation dans les interactions pollen-pistils.

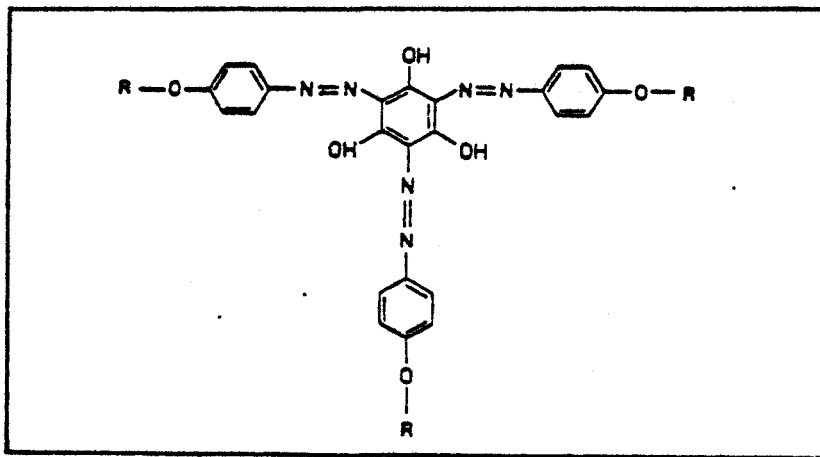
V - NATURE DES COMPOSES IMPLIQUES DANS LA RECONNAISSANCE POLLEN-PISTIL

Jusqu'à ces dernières années, il n'existe pas ou peu de travaux concernant la participation des glycolipides, arabinoxylanes ou phytoalexines dans les processus de discrimination soi - non soi qui président à la fertilisation.

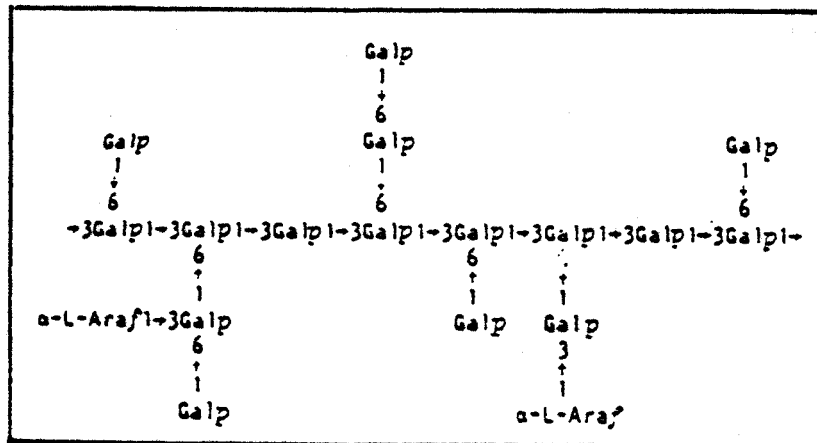
Seules les lectines, arabinogalactanes et les protéines ont été étudiés.

FIGURE 21

A STRUCTURE D'UN ANTIGENE ARTIFICIEL SE FIXANT SUR LES ARABINO GALACTANES



B STRUCTURE D'UN ARABINO GALACTANE ISOLE DE STYLES DE GLADIOLUS



A - LES LECTINES

Une lectine a été isolée du stigmate et du style de *Primula* qui possède un système sporophytique d'autoincompatibilité. Cette lectine inhibe *in vitro* la croissance du tube pollinique incompatible et favorise celle du tube pollinique compatible. Lorsque cette lectine est adsorbée sur des préparations de membranes érythrocytaires, elle perd toute activité hémagglutinante ou sur la croissance du pollen (GOLYNSKAYA et coll. -95-). Cependant, c'est le seul résultat reliant lectine et incompatibilité.

B - LES ARABINOGALACTANES

Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal, et ils ont été mis en évidence également dans les sécrétions stylaires de *Lilium* (LOEWUS et coll. -186-, CLARKE-GLEESON -48-), ainsi qu'au niveau du pollen (KIND et coll. -144-).

Mais le rôle précis de ces arabinogalactanes dans le processus d'autoincompatibilité n'est pas encore défini (CLARKE et GLEESON -48-). En effet, bien que ces composés possèdent des séquences oligosaccharidiques spécifiques, il semble que leur trop large distribution dans la plante, ne puisse coïncider avec un rôle régulateur dans la fertilisation. Leur rôle serait de servir de gomme adhésive au moment de la pollinisation et/ou de milieu nutritionnel. Ils ne joueraient que le rôle passif de matrice de germination (LABARCA-LOEWUS -158-159-, CLARKE-GLEESON -48-).

C - LES PROTEINES ET LES GLYCOPROTEINES

Très rapidement l'analyse de l'autoincompatibilité de fécondation s'est orientée vers la recherche du produit du gène S d'incompatibilité.

La plupart des résultats ont été obtenus par localisation cytochimique ou par utilisation d'antisérums dirigés contre des extraits végétaux ; deux techniques dont la valeur est limitée sinon discutable (CLARKE-GLEESON -48-).

Les résultats obtenus seront exposés en fonction du système de pollinisation.

a) AIS et protéines de surface

Le système le plus simple à analyser correspond à l'autoincompatibilité sporophytique de fécondation. En effet, les interactions se limitent au grain de pollen et à la papille stigmatique. Nous exposerons donc les résultats obtenus chez *Brassica*.

a1) Protéines de la papille stigmatique

=====

Par différentes techniques immunologiques et électrophorétiques, NASRALLAH et coll. -218-219-220-221-222- ainsi que SEDGELEY -272- mettent en évidence la présence de protéines antigéniques spécifiques d'allèles S chez *Brassica*. De même, en utilisant des techniques d'électrofocalisation NISHIO et HINATA -228-229-230-231-232- démontrent la présence de glycoprotéines spécifiques d'allèles S dans des homogénats stigmatiques de *Brassica* (HINATA-NISHIO -116-).

Cependant, rien ne prouve que ces protéines ou glycoprotéines trouvées dans les homogénats de *Brassica* soient impliquées dans la réaction de reconnaissance (ROBERTS et coll. -253-).

Les stigmates immatures ne possèdent pas de systèmes d'incompatibilité. Un composé nouveau est acquis avec la maturité du pistil. L'apparition d'une seule glycoprotéine coïncidant avec le développement de la réponse autoincompatible aurait été significative (ROBERTS et

coll -252-, STEAD et coll. -285-). Malheureusement, cette glycoprotéine n'a jamais pu être identifiée.

Il semble cependant qu'un glycoconjugué fixant la concanavaline A (Con A) apparaisse lors de la maturité florale (KNOX et coll. -150-). Par contre, il n'existe aucune liaison entre les jeunes boutons floraux et la Con A. De plus le nouveau complexe "glycoconjugué stigmatique-Con A" inhibe l'entrée du tube pollinique dans la papille stigmatique soit en masquant un glycoconjugué spécifique soit en provoquant un encombrement stérique néfaste.

a2) Protéines du pollen

=====

De nombreuses revues générales ont été consacrées aux constituants de la paroi pollinique (HOWLETT et coll. -122-123-, MASCARENHAS -195-, LUNDEN -188-). La paroi pollinique présente une architecture bien adaptée au stockage de macromolécules.

Un nombre impressionnant de protéines douées ou non d'activités enzymatiques est décelé (KNOX et coll. -146-148-149-) et l'électrofo-calisation d'un homogénat de pollen peut révéler jusqu'à trente bandes protéiques (NISHIO-HINATA -230-). Cependant, aucune différence électrophorétique ou antigénique n'est reportée en fonction des allèles S d'incompatibilité (NASRALLAH et coll. -218-).

Pourtant "l'effet mentor" semble prouver qu'une information relative au comportement compatible ou incompatible est contenue dans le pollen. L'effet mentor désigne le rôle joué par un pollen compatible tué, qui mélangé à un pollen incompatible vivant, permet la croissance normale de ce pollen sur un stigmate incompatible. Cet effet mentor du pollen a été interprété comme la diffusion d'un facteur porteur d'une information spécifique et perturbant la reconnaissance du pollen incompatible (KNOX et coll. -147-, RANGLU et coll. -237-).

Il semblerait que cette impossibilité à mettre en évidence des protéines spécifiques du gène S soit due à la présence de lipides dans la paroi pollinique (ROGGEN -255-). Leur extraction nécessiterait l'emploi de détergents tel le Triton X-100.

Après électrofocalisation, ces extraits réalisés en présence de Triton, se décomposent en bandes protéiques dans la zone correspondant aux pH 8-9. Ces macromolécules seraient codées par le sporophyte parental (DICKINSON et coll. -63-) et pourraient être impliquées dans le contrôle de la fécondation (ROBERTS et coll. -253-). Cependant, ici encore rien ne le prouve.

b) AIG et protéines de surface

Les interactions, nous l'avons vu, sont beaucoup plus complexes dans les systèmes où le contrôle de la reproduction repose uniquement sur le gamétophyte. Elles procèdent du contact entre grain de pollen ou tube pollinique et cellules stigmatiques ou stylaires.

La même recherche d'un produit du gène S de nature protéique a été entreprise au niveau du pollen et des différentes parties du pistil dans les espèces à AIG.

b1) Protéines du pistil

=====

La première question qui s'est posée, pour les espèces à AIG : est celle de la participation du stigmate à la réaction d'incompatibilité. Comme la réaction d'auto-rejet est localisée exclusivement dans le style, l'éventualité d'une participation active du stigmate semblait problématique.

D'après les travaux de KONAR-LINSKENS -151- le facteur spécifique du gène S est absent du stigmate considéré comme neutre. Les

récentes manipulations microchirurgicales réalisées sur *Lilium* (LAWSON et coll. -165-) ont montré que le stigmate ne participait pas à la réaction d'incompatibilité dans les systèmes d'AIG. Selon ASCHER -15-, le gamétophyte mâle ne serait en contact avec le produit du gène S qu'au niveau du style.

La recherche d'un produit de nature protéique codé par le gène S a été entreprise pour de nombreuses plantes. Il a été possible de mettre en évidence des protéines spécifiques du gène S dans le style de *Petunia* (LINSKENS -176-, VANDERDONK -301-), de *Prunus* (CLARKE et GLEESON -48-), de *Lycopersicum* (De NETTANCOURT et coll. -224-), de *Nicotiana* (BREDEMEIJER et coll. -27-) et de *Lilium* (DICKINSON et coll. -65-).

Récemment, BREDEMEIJER et coll. -27- ont également mis en évidence l'existence de protéines codées par le gène S au niveau du stigmate mature de *Nicotiana*, suggérant ainsi l'existence d'un contrôle unique de la reproduction. De plus, il semblerait qu'après 12 heures d'autopollinisation, il y ait synthèse de polypeptides particuliers (FRANKEL et coll. -80-).

Cependant, comme pour les systèmes d'AIS, il n'existe aucune preuve, ni démonstration de la participation de ces protéines dans les phénomènes de reconnaissance et de discrimination.

b2) Protéines du pollen

=====

Il a été possible également de corréler présence de protéines spécifiques et génotype d'incompatibilité dans le pollen des plantes à AIG. Nous ne citerons que les travaux pionniers de LEWIS sur *Oenothera* -170-, ainsi que les nombreuses revues générales (BRIS -35-,

MASCARENHAS -195-, HOWLETT -122-123-). Le problème majeur est donc de définir précisément le rôle de ces protéines spécifiques du pollen et également du pistil, qui curieusement apparaissent lors de la maturité florale et qui sont tout aussi curieusement strictement localisées dans le stigmate ou le style et qui éventuellement doivent jouer un rôle dans la reconnaissance.

Cependant, aucune preuve de leur participation aux phénomènes de reconnaissance n'a été à ce jour avancée.

VI - CONCLUSION

Un grand nombre d'hypothèses concernant la mise en place et le mécanisme de contrôle de l'autoincompatibilité ont été proposées (LEWIS -168-172-, NASRALLAH et coll. -220-, PANDEY -239-, ASCHER -10-, KROES -155-, LINSKENS -178-, HESLOP-HARRISSON -113-, VANDERDONK -301-, FERRARI-WALLACE -75-, CLARKE-GLEESON -48-). Nous n'entrerons pas dans les détails de ces modèles (voir pour revue BRIS et coll. -35-).

Aucun modèle n'a été unanimement accepté. Ils postulent tous l'existence d'une reconnaissance entre le pollen et le stigmate.

Pour HESLOP-HARRISSON -113- et VANDERDONK -301- les récepteurs seraient localisés dans le pistil (stigmate en AIS, style en AIG), le pollen n'apporterait que le ligand spécifique de l'allèle d'incompatibilité. Inversement PANDEY -239- et FERRARI -75- confèrent aux structures polliniques le rôle de récepteur, le pistil apportant le ligand spécifique.

La localisation du récepteur est importante étant donné le double rôle qu'il joue dans la réception et l'analyse d'une information, ainsi que dans l'induction d'une réponse intra-cytoplasmique.

Par contre, tous sont unanimes sur la nature protéique du couple récepteur-ligand. Or, la mise en évidence de protéines spécifiques n'est pas une règle générale. De plus, l'existence de protéines spécifiques dans le pollen et dans le pistil n'a pu être réalisée que pour *Petunia hybrida* (CLARKE-GLEESON -48-), et rien ne prouve qu'elles participent vraiment à la réaction de reconnaissance.

L'analyse des systèmes d' AIS et d' AIG nous a conduit à envisager un double contrôle de l'incompatibilité et la participation des glycolipides.

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

HYPOTHESE DE TRAVAIL

I - INTRODUCTION

Les faits les plus importants qui permettent de distinguer les deux types de contrôle de l'autoincompatibilité (AIS-AIG) ont trait :

- au temps qui s'écoule entre le moment où un grain de pollen arrive sur la papille stigmatique et le moment où s'effectue la réaction d'auto-rejet (très court pour les systèmes d'AIS, très long pour les systèmes d'AIG);

- aux corrélations frappantes existant entre la cytologie du pollen ou du stigmate et la localisation dans le temps et l'espace de la réaction d'auto-rejet,

- au contrôle génétique lui-même, avec l'intervention ou non d'un contrôle sporophytique parental par l'intermédiaire des matériaux contenus dans la paroi pollinique.

Le contrôle sporophytique de l'incompatibilité est très brutal et dépend d'un grain de pollen trinuéclé dont le noyau a effectué toutes ses divisions. Le contrôle gamétophytique s'installe plus lentement et dépend d'un grain de pollen binuéclé auquel manque un cycle de division qu'il achèvera en temps que tube pollinique dans les tissus du style.

De plus trois facteurs semblent importants dans l'installation de la réaction d'autoincompatibilité, ce sont la maturité du pistil et du pollen, ainsi que l'adhérence du pollen sur le stigmate.

A - IMPORTANCE DE LA MATURETE DU PISTIL

Le phénotype incompatible du pistil s'exprime à la maturité flo-

rale. En effet, les mécanismes responsables de l'AIS ou de l'AIG sont moins (sinon pas) efficaces quand les organes floraux sont immatures ou trop âgés. Cette évolution de la réponse incompatible en fonction de l'âge du pistil a été utilisée pour surmonter les barrières à la fécondation.

Ainsi la méthode de pollinisation au stade de bouton floral ("Bud-pollination") a été employée avec succès sur des systèmes à AIG comme à AIS (LEWIS -169-, ASCHER-PELOQUIN -11-, BREDEMEIJER -26-).

De même ASCHER et PELOQUIN -11- ont démontré que les styles autopollinisés de *Lilium* donnaient un certain nombre de graines "illégitimes" et donc que l'âge induisait une perte progressive de la capacité de reconnaissance.

Il existe donc une corrélation entre l'âge du bouton floral et le degré d'inhibition du tube pollinique (LINSKENS -177-).

B - IMPORTANCE DE LA MATURITE DU POLLEN'

SHIVANNA et coll. -279- ont démontré que l'âge du pollen ne modifie pas la réaction d'auto-rejet chez *Petunia axillaris*, plante à AIG.

Par contre, dans le cas de l'AIS, une méthode pour lever les barrières d'incompatibilité consiste à prélever des jeunes microspores qui n'ont pas encore subi leur maturation et de la leur faire achever en milieu artificiel ou sur des anthères de génotypes S différents. Les pollens ainsi "maturés" artificiellement peuvent germer sur des stigmates qui leur étaient auparavant incompatibles (De NETTANCOURT -225-).

De plus, à bien des égards, le grain de pollen trinuéclé semble mature et possède tout un lot de protéines pré-synthétisées. Selon

FERRARI et WALLACE -75- les facteurs de reconnaissance sont déjà présents. Leur dépôt s'est fait, sous le contrôle du sporophyte parental, lors de la maturation du grain de pollen dans l'anthere.

Le grain de pollen binucléé semble lui immature. Peut-être acquiert-il sa totale maturité lors de la dernière division de son noyau dans le style.

Cette différence de maturité entre ces deux types de grains de pollen pourrait être à la base de l'AIS et de l'AIG.

C - IMPORTANCE DE L'ADHESION

La rapidité avec laquelle le système d'AIS s'installe, confère une importance particulière aux événements précédant la germination du tube pollinique (ROBERTS et coll. -253-). Ces événements consistent en la capture du grain de pollen, son adhésion sur la papille stigmatique, les interactions pollen stigmate, ainsi que l'hydratation du grain de pollen.

ROGGEN -256- a pu mettre en évidence des différences entre l'adhérence d'un pollen compatible et celle d'un pollen incompatible. Pendant les 15 premières minutes qui succèdent à son dépôt sur le stigmate, le grain de pollen incompatible adhère moins bien à la papille que le grain compatible (STEAD et coll. -285-). Deux heures après, il n'est plus possible de faire la distinction entre pollen compatible ou non. Leur adhérence à la papille stigmatique est alors identique.

Selon STEAD et coll. -286-, les protéines de la papille stigmatique sont responsables de cette adhérence du grain de pollen. Une digestion par la pronase de la surface stigmatique empêche l'adhésion des grains de pollen. Cependant, le stigmate retrouve en 90 minutes ses propriétés adhésives. Le turn-over des protéines de surface est

très rapide et comparable à celui des protéines de surface animales (VERNAY et coll. -305-).

L'adhésion d'un grain de pollen sur une papille stigmatique est donc un phénomène important dans la séquence d'évènements conduisant à la croissance du pollen compatible. Cette séquence se subdivise en 4 temps (ROBERTS et coll. -252-253-).

a) après 10-15 minutes de pollinisation, le pollen adhère au stigmate, sa paroi se gélifie ;

b) puis il s'hydrate. Ce processus est facilité par un changement dans les propriétés physiques de sa paroi ;

c) il germe et perfectionne sa liaison avec le stigmate ;

d) une cutinase est activée qui permet la pénétration de la papille stigmatique.

Les trois dernières étapes correspondent à l'expression d'une induction. La reconnaissance cellulaire doit avoir lieu en même temps ou peu après la fixation du pollen sur la papille stigmatique.

Une question se pose : adhésion et reconnaissance sont-elles un seul et même phénomène ? ou procèdent-elle d'une double reconnaissance ?

D - EXEMPLE D'UNE DOUBLE RECONNAISSANCE

Il existe chez les animaux des processus où une double reconnaissance est nécessaire pour que l'induction d'une réponse soit possible. C'est ainsi que certains aspects de la structure des systèmes d'histocompatibilité et leur association avec les membranes cellulaires ont permis de comprendre la séquence complexe d'évènements participant à la discrimination.

Les antigènes d'histocompatibilité (HL-A pour l'homme, H₂ pour la souris) sont des glycoprotéines de surface présentant un polymorphisme génétique considérable. Leur présence et celle d'antigènes

viraux sont indispensables à l'expression de la cytotoxicité des lymphocytes T (ZINKERNAGEL et coll. -320-, SCHRADER et coll. -270-). La réponse cytotoxique dépend d'une double reconnaissance de l'antigène H₂ et de l'antigène viral (Figure n° 22a).

Ces différents points : maturité du pollen, adhérence à la papille stigmatique, ainsi que l'existence dans la nature d'une double reconnaissance nous ont conduit à proposer l'analyse du contrôle de l'autoincompatibilité comme hypothèse de travail pour l'étude des glycoconjugués.

II - HYPOTHESE D'UN DOUBLE CONTROLE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE

A - COMPOSANTES DU MODELE

Notre hypothèse est basée sur le fait que l'expression de l'AIS comme de l'AIG est la conséquence d'interactions et de discrimination, entre organes mâles et femelles, situées à deux niveaux fonctionnels.

- au niveau de l'adhésion pollen-stigmate,

- au niveau de la sélection des gamètes propres à la fécondation ;

ce second système d'interactions étant le plus restrictif.

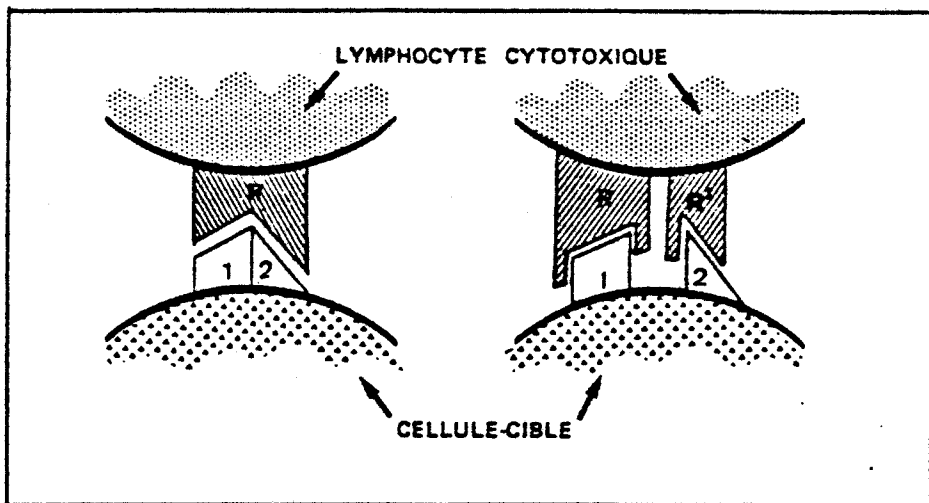
Ces deux systèmes font intervenir les glycoconjugués situés à la surface cellulaire.

a) Régulation de l'adhésion : système RA

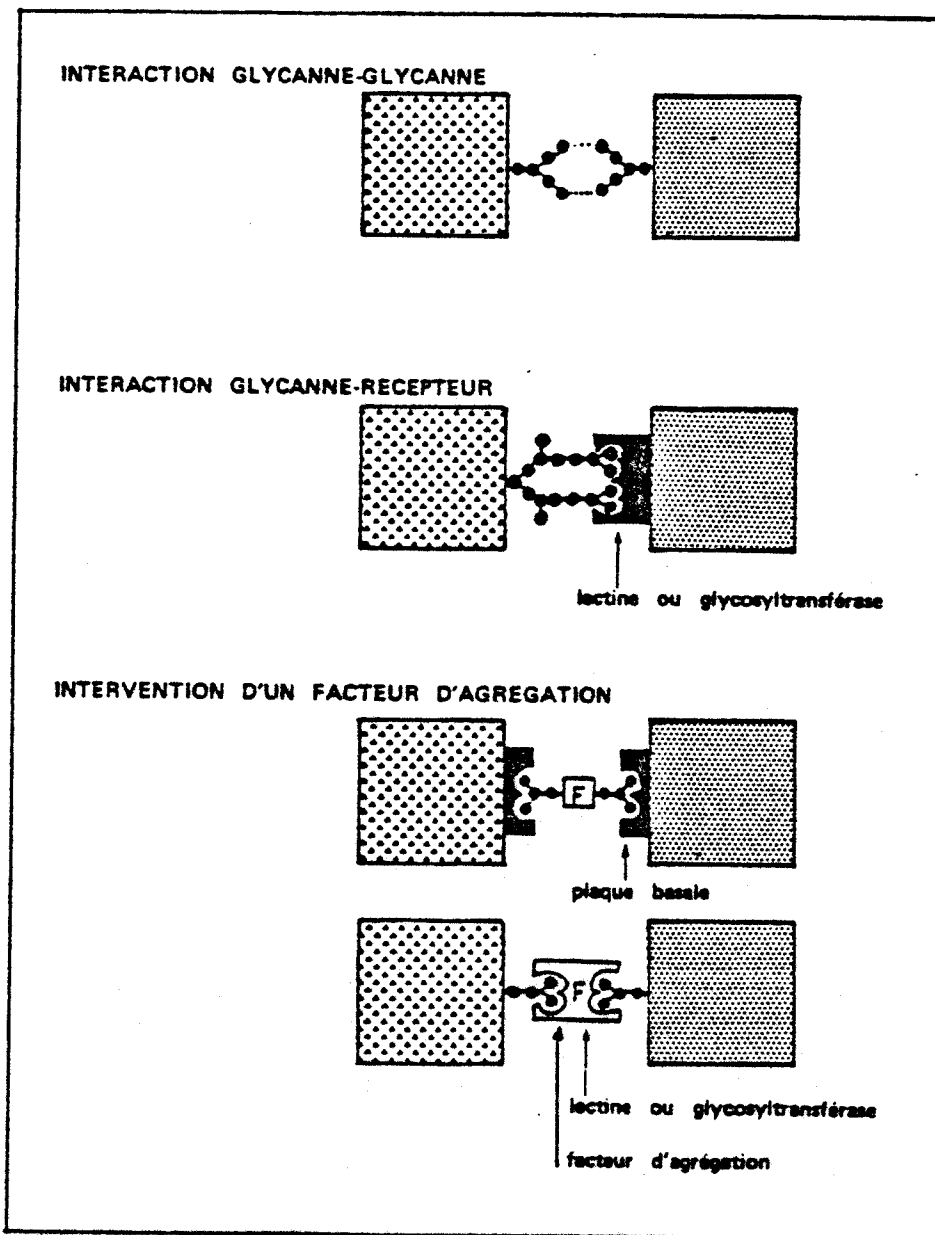
Un premier système régulerait l'adhésion du pollen sur la papille stigmatique (système RA).

Généralement les glycoconjugués sont impliqués dans les processus d'adhésion mais les mécanismes exacts ne sont pas élucidés (HUGHES -124-). En effet, les résultats obtenus ne permettent pas à ce jour une explication unique du phénomène. Les divers concepts sont résumés figure n° 22b.

A EXEMPLES DE DOUBLE RECONNAISSANCE : LES SYSTEMES D'HISTOCOMPATIBILITE DE LA SOURIS



B DIFFERENTES HYPOTHESES CONCERNANT LE ROLE DES GLYCOCONJUGUES MEMBRANAIRES DANS LA RECONNAISSANCE DES CELLULES EUCARYOTES



La possibilité de formation de ponts hydrogène entre deux glycanes a été avancée (JONES -129-), de même que la formation d'un complexe stéréospécifique entre un glycanne et un récepteur. Dans ce cas, le récepteur peut être soit une ectosyltransférase (ROSEMAN -259-, ROTH et coll. -261-), soit une lectine (FRAZIER-GLASER -82-).

La dernière possibilité fait intervenir un facteur d'agrégation comme l'ont montré OPPENHEIMER -238 ou TURNER et BURGER -296-.

Il semblerait, d'après les expériences "d'effet mentor" que l'hypothèse d'un facteur d'agrégation puisse convenir aux systèmes RA. Ce facteur d'agrégation diffusible pourrait être une molécule spécifiée par le sporophyte parental par exemple.

Une reconnaissance positive au niveau de ce récepteur RA entraînerait une adhésion rapide du grain de pollen sur la papille et des modifications de la perméabilité membranaire de part et d'autre.

b) Régulation de la sélection du gamétophyte : système RSG

Le second système serait, pour sa part, adapté à la discrimination self - non self proprement dite et à la sélection des gamétophytes compatibles, propres à la fertilisation.

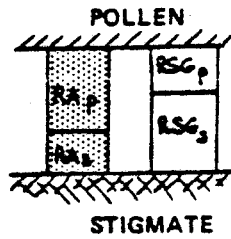
Le ligand, comme le récepteur, serait spécifique et codé par le gène d'incompatibilité. Le récepteur spécifique d'un allèle S serait porté par le pollen et les cellules du pistil apporteraient le ligand également spécifique d'un allèle S.

L'interaction fonctionnelle du couple ligand-récepteur permettrait la mise en route de systèmes de synthèses nécessaires à la progression rapide du tube pollinique.

La localisation du ligand serait restreinte à la surface stigmatique (AIS) ou diffuse dans le pistil (AIG).

FIGURE 23

MODALITES DE LA RECONNAISSANCE DANS LES SYSTEMES D'INCOMPATIBILITE



BARRIERES INTERSPECIFIQUES



BARRIERES INTRASPECIFIQUES

	AUTOPOLLINISATION	XENOPOLLINISATION
A I S	<p>pas d'adhésion ni de reconnaissance PAS DE CROISSANCE</p>	<p>double reconnaissance CROISSANCE</p>
A I G	<p>pas d'adhésion spécifique croissance du tube pollinique pas de reconnaissance SELECTION</p>	<p>adhésion spécifique croissance du tube pollinique reconnaissance SELECTION</p>

c) AIS ou AIG = maturation des déterminants de surface

La différence entre les deux systèmes AIS et AIG se ferait
au niveau des systèmes RSG ou RA (Figure n° 23).

Dans le cas des plantes à AIS tous les déterminants des deux systèmes RA et RSG sont présents au niveau du stigmate mature, comme au niveau du pollen. Une double reconnaissance est possible.

Dans le cas des plantes à AIG, tous les déterminants de stigmate existent. Par contre, le gamétophyte mâle possède les déterminants du système RA mais pas ceux du système RSG qu'il n'acquerra qu'en se développant dans les tissus stylaires.

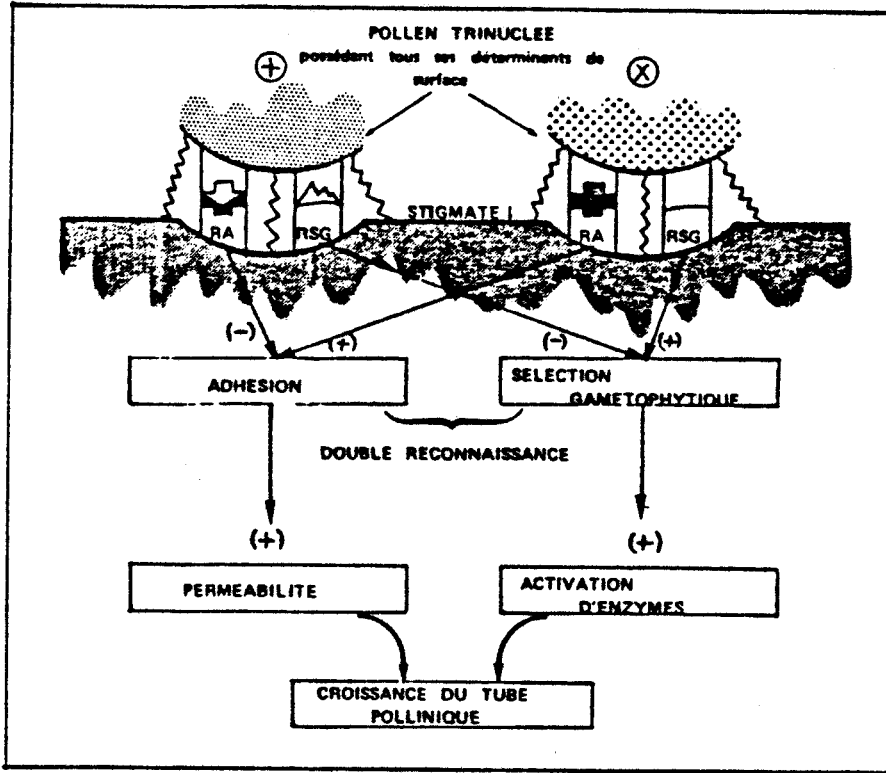
B - MODALITES DU CONTROLE DE L'AIS : RECONNAISSANCE SIMULTANEE

Comme le pollen, déjà mature, possède à sa surface les éléments cognitifs des deux systèmes de régulation RA et RSG (acquis au cours de sa maturation dans l'anthère) ; la reconnaissance se fait très rapidement et simultanément au niveau des deux systèmes.

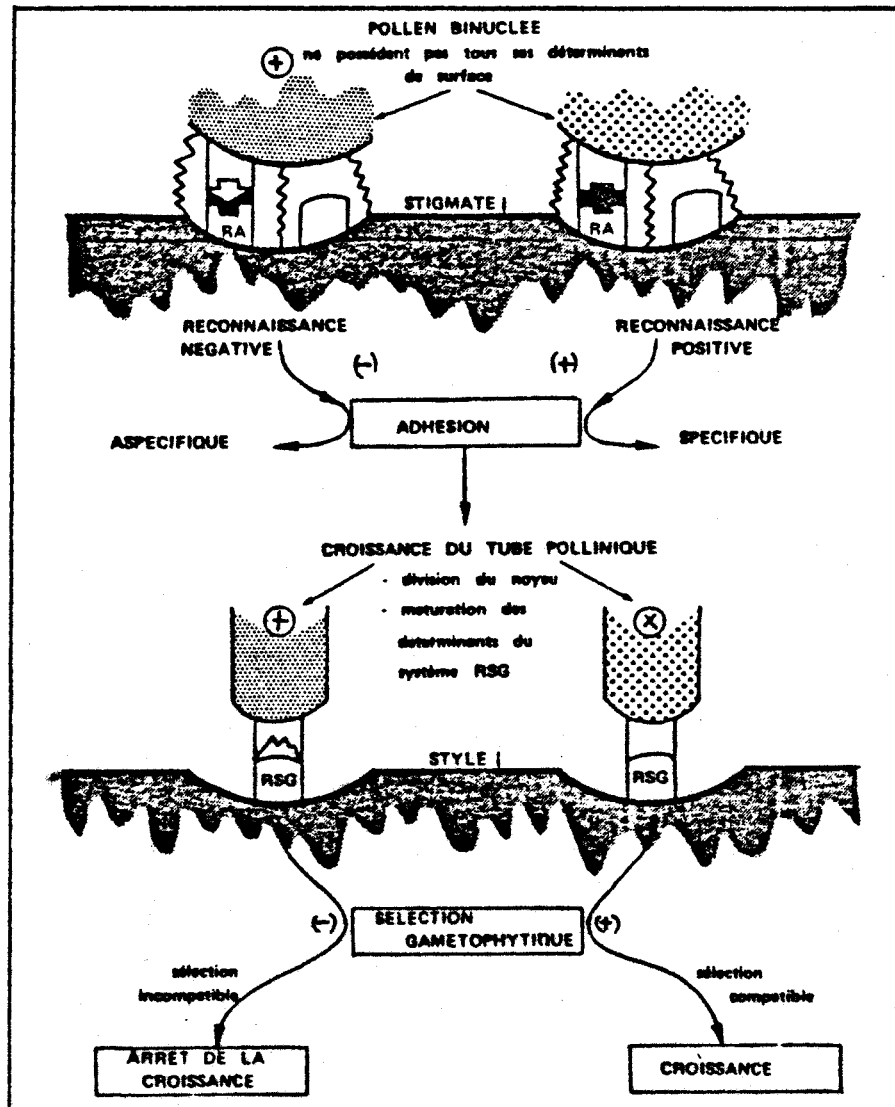
Dans le cas d'une pollinisation compatible les deux récepteurs sont le siège d'interactions positives simultanées qui aboutissent, dans les deux cas, à l'émission d'une réponse intracytoplasmique spécifique. Le résultat est la mise en jeu de divers contrôles : de la perméabilité, des mouvements d'eau et de l'activation de systèmes enzymatiques nécessaires à la germination, à la pénétration et à la croissance du tube pollinique (Figure n° 24a). La réponse à la double reconnaissance peut être la mise en route d'un système de régulation complexe comme celui proposé par FERRARI et WALLACE -75-.

Dans le cas d'un croisement incompatible, la double reconnaissance ne peut se faire. Aucun des deux systèmes ne peut fonctionner. Le

SCHEMA HYPOTHETIQUE D'UN CONTROLE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE GAMETOPHYTIQUE



B SCHEMA HYPOTHETIQUE D'UN CONTROLE DE L'AUTOINCOMPATIBILITE GAMETOPHYTIQUE



BUSILLE

pollen ne peut donc pas germer sur la papille trop sèche du stigmate, le contrôle des mouvements d'eau n'ayant pas été induit. De même les systèmes enzymatiques contrôlés par le récepteur RSG ne peuvent fonctionner.

C - MODALITES DE CONTROLE DE L'AIG : RECONNAISSANCE SEQUENTIELLE

Le contrôle de l'AIG repose également sur une double reconnaissance au niveau des récepteurs RA et RSG. Seulement les interactions cellulaires ne sont pas immédiates à cause de la nécessité d'une maturation des systèmes polliniques.

- a) Interaction séquentielle : nécessité d'une maturation des

déterminants polliniques

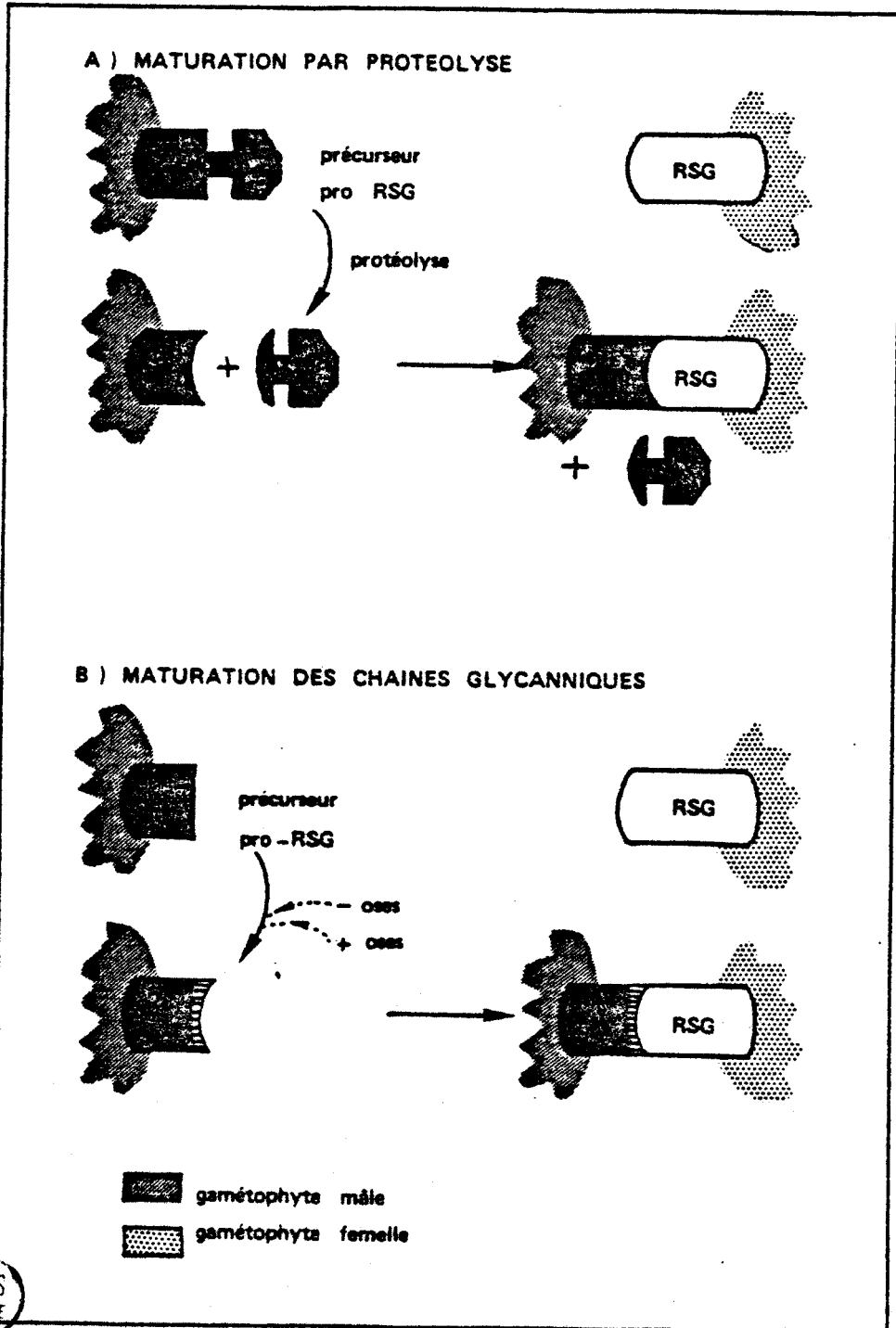
Quelle que soit la pollinisation (compatible ou non) (Figure 24b), l'adhérence du grain de pollen se fera. Elle résultera d'interactions positives dans le cas d'une pollinisation compatible, soit d'interactions non spécifiques dans le cas d'une pollinisation incompatible.

De même l'hydratation et la germination du pollen se feront, dans les deux cas (d'une façon active pour la xéнопollinisation ou passive pour l'autopollinisation), car en règle générale le stigmate des espèces à AIG est suffisamment humide pour servir de matrice de germination. Puis le tube pollinique croît dans les tissus stylaires.

Ce début de croissance du tube pollinique se fait au détriment des réserves du pollen et permet l'apparition des déterminants spécifiques du second système RSG. Dès leur apparition à la surface du tube pollinique, les déterminants du système RSG rencontrent leurs homologues stylaires. Le système RSG peut alors fonctionner.

FIGURE 25

SCHEMA DE MATURATION DES PRECURSEURS DES DETERMINANTS DE SURFACE



Si la pollinisation est compatible, il y aura activation des voies métaboliques nécessaires à la progression du tube pollinique.

Par contre, si le croisement est incompatible, il y aura accumulation d'erreurs au niveau des chaînes métaboliques intracellulaires ce qui conduira à l'arrêt de la croissance du tube pollinique. Les deux perturbations les plus importantes étant le dysfonctionnement du contrôle de la perméabilité et celui de la biosynthèse des glycoconjugués.

b) Modalités de la maturation d'un déterminant

L'apparition d'un déterminant peut se faire de deux manières par synthèse du déterminant définitif ou par maturation d'un précurseur.

L'évolution d'un déterminant pré-existant déjà à l'état de précurseur peut se faire soit par clivage protéolytique de ce précurseur, soit par maturation de ses chaînes glycaniques (RUTISHAUSER et coll. -263-).

b1) Clivage protéolytique d'un précurseur

=====

Le précurseur ne peut intervenir dans la reconnaissance. Il n'exprime aucune spécificité. Le fractionnement du précurseur par des enzymes protéolytiques par exemple fait apparaître le déterminant proprement dit (figure n° 25a), le contact devient alors possible.

Ainsi les interactions cellulaires peuvent être contrôlées par les déterminants qui naissent de la destruction partielle ou séquentielle de glycoprotéines plus grosses.

Des contrôles de ce type ont été découverts dans les cellules embryonnaires de rétine de Poulet (EDELMAN -71-). Il est possible

qu'une cascade de clivages affine le degré de spécificité d'un déterminant. Les enzymes hydrolytiques impliqués seraient des contrôles clefs.

b2) Maturation des chaînes glycaniques

=====

Bien qu'une modulation par protéolyse des déterminants de surface puisse être nécessaire dans l'établissement des interactions cellulaires, il semble que la maturation des glycanes des glycoconjugués soit extrêmement importante. Elle est règle générale dans la cellule animale.

Cette maturation se fait, dans la cellule végétale comme dans la cellule animale, par soustraction et/ou addition de résidus osidiques impliquant hydrolases et transférases (Figure n° 25b).

De toute manière, quelle que soit la façon dont elle s'est produite, la maturation des signaux biologiques et des récepteurs est sous un contrôle génétique très strict.

D - MODALITES DE LA REponse INCOMPATIBLE

Peu de choses sont connues sur le fonctionnement du récepteur, sinon que d'une interaction ligand-récepteur naît une réponse intracytoplasmique spécifique. Ainsi un croisement incompatible provoque une accumulation de déviations métaboliques (telles le dépôt de callose) et l'arrêt de la croissance du tube pollinique. Il est difficile de croire que cette accumulation d'erreurs dans les chaînes de biosynthèse soit l'effet du hasard. Le problème de la signification biologique du dépôt de callose ou des perturbations de la perméabilité membranaire est donc posé.

a) Dépôt de callose : sa signification

Le dysfonctionnement du récepteur du système RSG provoque des perturbations du métabolisme glucidique qui se traduisent par le dépôt de callose.

Des lectines, jouant le rôle hypothétique de transporteurs de résidus osidiques pourraient être impliquées dans cette déviation du métabolisme.

De plus la callose, qui est un β 1-3 glucane, pourrait servir d'effecteur dans un système analogue au système des phytoalexines. Sa mise en route provoquerait l'arrêt de la croissance du tube pollinique.

L'hypothèse proposée par DUMAS-GAUDE -67- d'une callose signal de reconnaissance d'un système de contrôle de la croissance du tube pollinique est représentée figure n° 26.

b) Modification de la perméabilité : sa signification

Les modifications de la perméabilité membranaire semblent être directement en relation avec le contrôle de la croissance du tube pollinique.

Pour PICTON et STEER -242-, le calcium représente un facteur important dans l'extension du tube pollinique où il joue un double rôle :

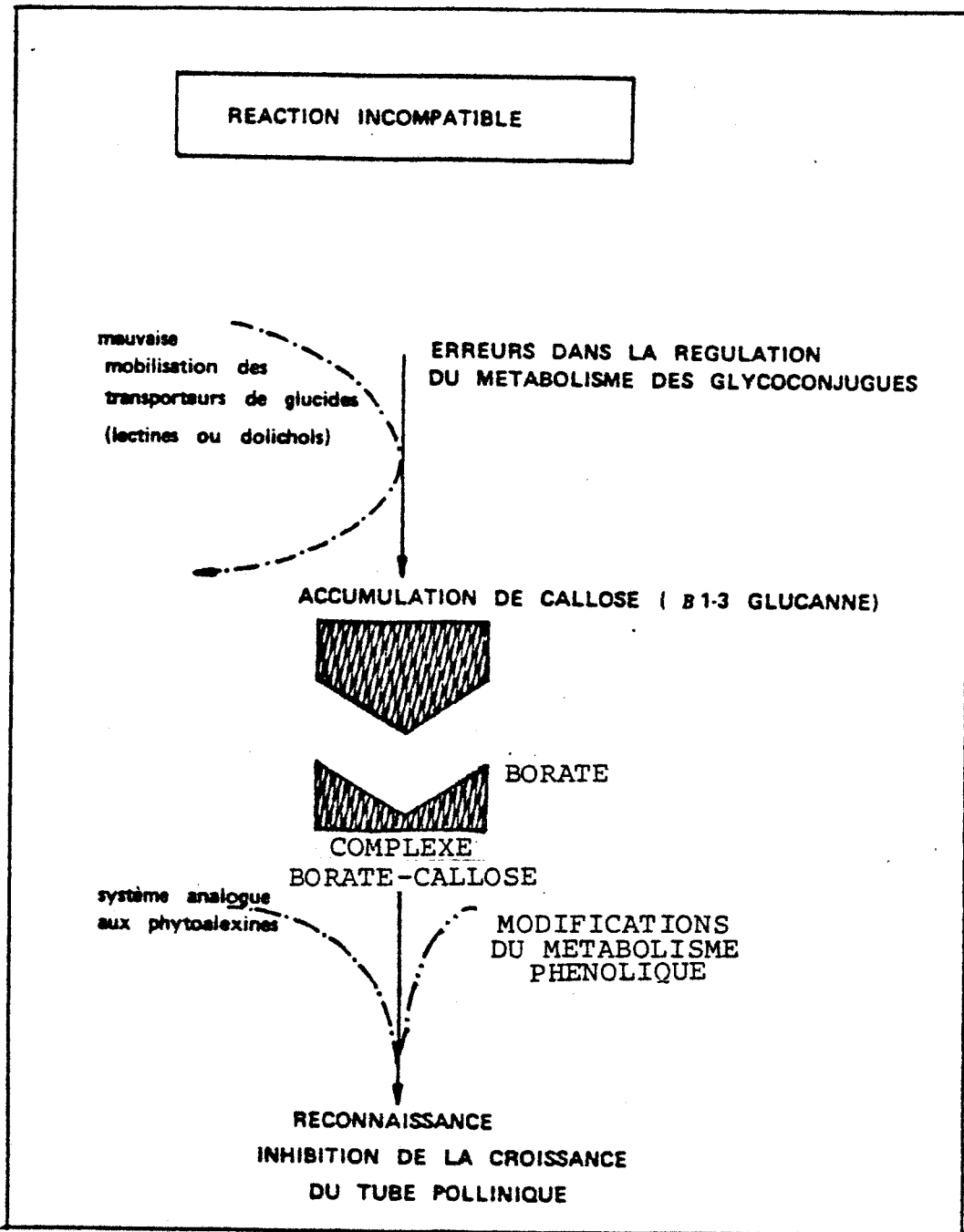
(a) sur le réseau fibrillaire qu'il stabilise ou non en fonction de sa concentration,

(b) sur les microfilaments dont dépend la fusion des vésicules (amenant les constituants membranaires) avec la membrane plasmique apicale du tube.

La croissance du tube pollinique reposerait sur deux processus

FIGURE 26

SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DES DEPOTS DE CALLOSE



ne possédant pas les mêmes besoins en Ca^{2+} ; le premier étant inhibé quand l'autre est activé.

Il est possible que le dysfonctionnement du système RSG, lors d'une pollinisation incompatible, provoque une modification du transport actif des ions par l'intermédiaire des ATPases.

Selon De NETTANCOURT et coll. -224-, HERRERO-DICKINSON -111-, l'inhibition de la croissance du tube incompatible s'accompagne fréquemment d'un épaissement de sa paroi, ce qui traduit une inhibition du processus d'extension et une accélération du dépôt des constituants pariétaux, dues à de fortes concentrations intra-cytoplasmiques en Ca^{2+} .

III - CONCORDANCE AVEC LES RESULTATS PRECEDENTS

Cette hypothèse basée sur une double reconnaissance et impliquant la nécessité d'une maturation des déterminants polliniques pour les systèmes à AIG permet d'expliquer la lenteur ou la brutalité de la réaction d'auto-rejet dans l'AIG et l'AIS.

La localisation de la réaction de rejet dans les plantes à AIG s'expliquerait par le temps mis par le tube pollinique pour effectuer la maturation de ses déterminants.

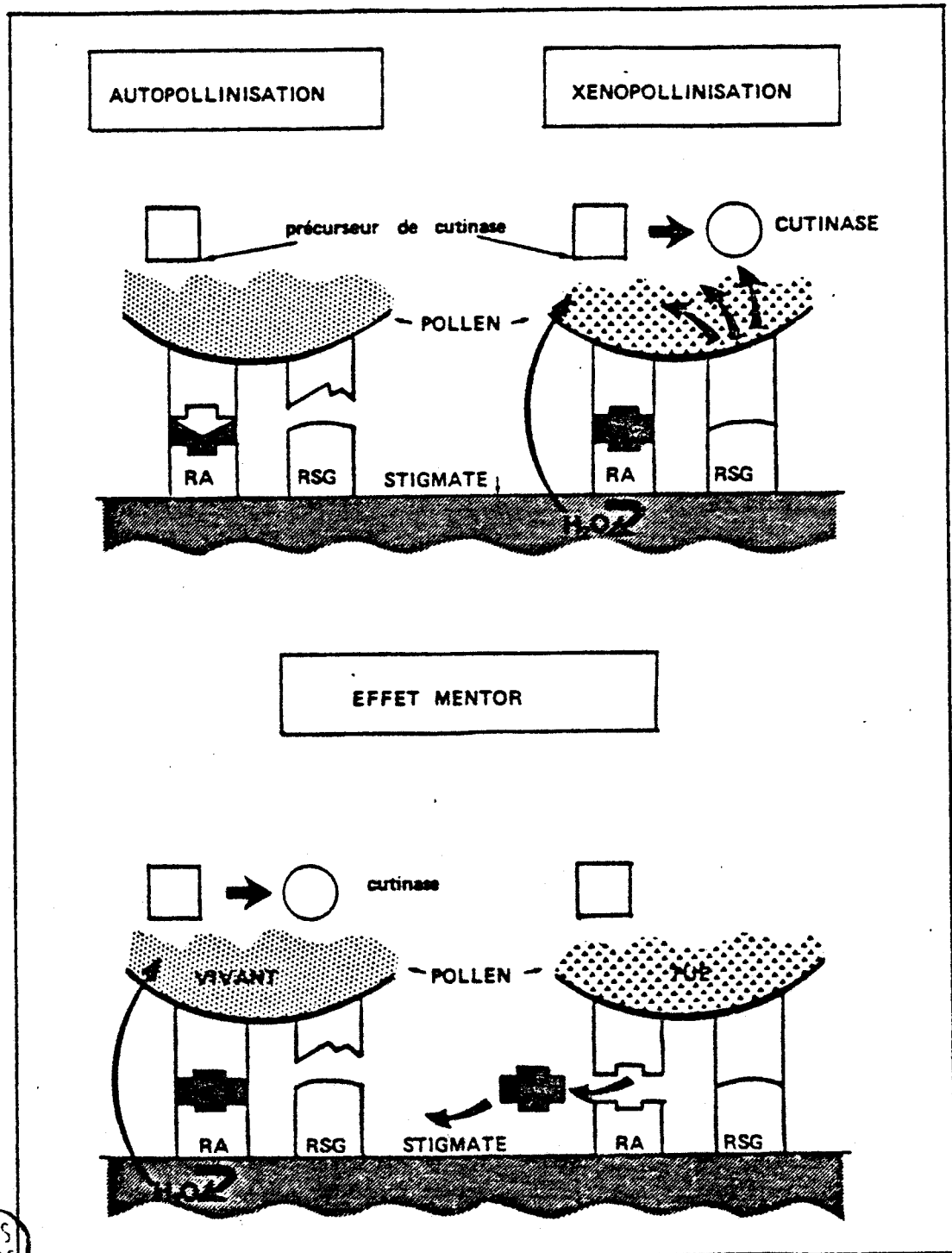
Une telle hypothèse n'infirme en rien les modèles d'ASCHER -10-, PANDEY -239-, LEWIS -168-172- ou de FERRARI -75-, elle les complète. De plus il existe une certaine concordance avec les résultats déjà obtenus.

A - ADHESION ET HYDRATATION

Le fait que le pollen incompatible adhère moins bien à la

FIGURE 27

SCHEMATISATION DE L'EFFET MENTOR



papille stigmatique (ROBERTS et coll. -253-) est en faveur d'une reconnaissance spécifique impliquant ligand et récepteur.

Après deux heures de pollinisation, le grain incompatible finit par adhérer à la surface stigmatique. Cette adhérence serait due à des phénomènes non spécifiques comme ceux utilisés par le pollen compatible pour parfaire sa fixation au stigmate et pourrait faire intervenir les arabinogalactanes. De plus elle n'est en aucun cas suivie de l'hydratation et de la germination du pollen.

Pour les espèces à AIS, l'hydratation du pollen semble être la conséquence d'une reconnaissance spécifique ; les stigmates secs ne permettant pas une hydratation passive du pollen.

Par contre les stigmates humides des plantes à AIG ne permettent pas de distinguer ces deux types d'hydratation. Le pollen incompatible peut s'hydrater facilement sur le stigmate.

B - CONCORDANCE AVEC CERTAINES EXPERIENCES DE LEVEE D'INCOMPATIBILITE

FAISANT INTERVENIR L'EFFET MENTOR OU L'AGE DU POLLEN

Cette hypothèse permettrait d'expliquer l'impossibilité de lever les barrières d'autoincompatibilité en jouant sur "l'effet mentor", pour les espèces à AIG. Cet effet mentor n'est efficace que pour les plantes à AIS. Elle peut se comprendre (Figure n° 27) par la diffusion du facteur d'agrégation du pollen tué compatible vers le récepteur du pollen incompatible permettant ainsi l'hydratation et la germination du pollen incompatible. Une fois dans le stigmate le tube pollinique ne rencontre plus aucun obstacle à sa progression.

Par contre, l'effet mentor des plantes à AIG n'est pas efficace, car s'il permet une hydratation plus active du pollen, il ne peut empêcher la maturation des déterminants de surface du tube pollinique

ni leur rencontre avec les déterminants du style. La sélection se fera quand même.

L'absence de confusion lors de pollinisation réalisée avec du pollen compatible et incompatible vivant, peut être due au fait que le facteur d'agregation ayant une utilité fonctionnelle ne peut plus diffuser à la surface stigmatique.

Cette hypothèse coïncide également avec les travaux de SHIVANNA et coll. -279- démontrant que, contrairement au pollen des espèces à AIS, l'âge du pollen des plantes à AIG ne modifiait pas la réaction d'auto-rejet. En effet, ce n'est pas au cours de son évolution dans l'anthere que le pollen acquiert sa maturité.

C - LEVEE DES BARRIERES D'INCOMPATIBILITE

Les barrières d'incompatibilité peuvent être partiellement levées pour *Brassica* (AIS) par modifications des conditions environnementales ou par traitement chimique. Ainsi le fait de placer les stigmates dans une atmosphère très humide, ou très chargée en CO₂, ou de les traiter à l'hexane ou au chloroforme affecte le degré d'incompatibilité (ROGGEN -255-, NAKANISHII-HINATA -216-, CARTER et coll. -41-42-, OCKENDON -237-).

Le premier traitement apporte suffisamment d'eau pour que le pollen puisse germer sans qu'il y ait besoin d'activer les systèmes de perméation.

Les autres traitements, hexane ou chloroforme, affectent la surface du stigmate en solubilisant les composés lipidiques, la rendant ainsi plus perméable.

Ces traitements sont inefficaces dans les plantes à AIG.

D - EFFET MUTAGENE

La maturation des déterminants se réalise sous le contrôle étroit d'un programme génétique et grâce à l'intervention de protéines enzymatiques.

Toutes les mutations induites, causant le plus souvent des délétions au niveau du DNA, conduisent à la production de protéines et de glycoprotéines non fonctionnelles. Ces protéines peuvent faire partie du récepteur lui-même ou être impliquées dans la maturation des déterminants de surface.

E - EFFET DE LA TEMPERATURE

La maturation des marqueurs de surface ainsi que l'émission d'une réponse intracellulaire, dépendent d'activités enzymatiques. Tous changements de température perturberont la vitesse des réactions enzymatiques et modifieront l'installation du contrôle de la reproduction comme l'ont décrit différents auteurs (TOWNSEND -294-, LINSKENS -184-, ASCHER et coll. -13-).

F - RESULTATS DE L'ANALYSE DES PROTEINES

Cette hypothèse concorde également avec les résultats de VANDERDONK -301- sur *Petunia hybrida*. La pollinisation induit la synthèse, dans le style de *Petunia*, de polypeptides spécifiques de l'allèle S. Ces polypeptides pourraient représenter les sous-unités d'un complexe membranaire impliqué dans la discrimination.

Trois heures après la pollinisation, les premières différences entre auto et xéнопollinisation apparaissent. La synthèse de polypeptides se prolonge uniquement dans les croisements compatibles. Ces polypeptides pourraient correspondre à l'induction d'une réponse

cytoplasmique.

Cette hypothèse coïncide également avec les résultats de LINSKENS et coll. -180- montrant que l'incompatibilité de fécondation s'accompagne de la perte ou de l'absence de synthèse de certaines glycoprotéines de haut poids moléculaire.

IV - POURQUOI UNE ANALYSE DES GSL DANS LES SYSTEMES

L'hypothèse de travail que nous avons proposée pour définir l'autoincompatibilité repose sur la combinaison de divers phénomènes de surface tels que :

- adhésion cellulaire,
- contrôle de la croissance du tube pollinique,
- contrôle de la mitose pollinique,
- contrôle de la différenciation et de la maturation des marqueurs de surface,
- contrôle de la perméabilité membranaire.

Ils supposent tous la participation de glycoconjugués tant lipidiques que protéiques.

Les résultats très discordants obtenus sur les protéines et les glycoprotéines, ainsi que l'impossibilité de mettre en évidence - et notamment pour *Brassica* - de protéines spécifiques d'allèles, nous ont conduits vers l'analyse des glycolipides et à envisager leur participation dans le processus d'autoincompatibilité de fécondation.

A - ROLE DES GLYCOCONJUGUES

Les glycolipides sont impliqués, au même titre que les glycoprotéines, dans divers phénomènes vitaux pour la cellule et se déroulant à sa surface. En effet, ces glycoconjugués sont des marqueurs de

surface qui peuvent jouer un rôle dans l'adhésion, dans le contrôle de la croissance ou de la mitose. Nous allons également envisager ces différents aspects de leur participation.

a) Rôle dans l'adhésion cellulaire

Les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'adhésion cellulaire sont mal connus, et mises à part quelques exceptions, la nature des ligands spécifiques n'est pas encore définie. Pourtant il semble que les glycoprotéines sont impliquées dans ce phénomène (BARONDES et coll. -18-, MERRELL et coll. -200-). En effet, l'inhibition de la synthèse protéique diminue les propriétés de cohésion des surfaces cellulaires. Cette adhésion cellulaire est un processus étrangement dépendant de la température (UMBREIT-ROSEMAN -297-). Une interprétation possible est l'existence d'une relation entre adhésion et état physique de la matrice lipidique ; cependant encore aucun argument ne le prouve (MOYA et coll. -212-). Il a également été soulevé l'éventualité d'une participation des GSL dans ce processus (CRITCHLEY-VICKER -53-).

b) Rôle dans le contrôle de la croissance

Selon CRITCHLEY et VICKER -53- les glycolipides seraient des récepteurs pour des substances normalement présentes dans le milieu cellulaire, et inhibant la croissance cellulaire ou stimulant l'expression de fonctions particulières. Les cellules transformées sont incapables de répondre aux signaux régulateurs de croissance, et coïncidence frappante, ne possèdent pas de glycolipides complexes. De même la corrélation entre GSL et l'inhibition de contact suggère que ces glycolipides représentent des facteurs de régulation de croissance (HAKOMORI -103-).

c) Rôle dans le déclenchement de la mitose

Le rôle des glycoconjugués dans le déclenchement de la mitose est lui aussi assez mal connu.

Toutefois, la liaison de certains ligands sur les glycoconjugués de surface, ou la modification chimique de ces dernières, induisent la transformation blastique et la mitose dans le lymphocyte. Le récepteur peut être un anticorps de surface, une glycoprotéine ou encore un glycolipide. Ainsi pour VITETTA et UHR -309- la liaison IgD - antigène déclenche la transformation blastique et la mitose des lymphocytes B. De même la limuline (lectine de *Limulus polyphemus*) exerce un effet mitotique sur les lymphocytes périphériques humains en se fixant sur des séquences osidiques de type Neu NAc → Gal → Glc NAc → Man.

Il semble que les GSL puissent également intervenir dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Trois types d'approche ont été réalisés : addition de GSL exogènes, application d'anticorps anti-GSL et évaluation des GSL après addition d'inducteurs de différenciation. Ainsi une mitogénèse induite par des lectines s'accompagne d'une synthèse accrue en triglycosylcéramide (TG Cer) et d'un changement dans la composition des gangliosides (NARIMSHAM et coll. -217-).

d) Rôle dans la différenciation cellulaire

Nous avons déjà vu que la différenciation cellulaire et tissulaire s'accompagnait d'une maturation des signaux biologiques et des récepteurs. Cette évolution des ligands et des récepteurs est parfaitement définie par un contrôle génétique. Nous allons prendre comme exemple la transformation oncogénique et la tumorigénèse. Dans ces deux cas, l'apparition de nouveaux glycolipides coïncide avec l'apparition de propriétés cellulaires différentes.

Ainsi la transformation des cellules par des virus ou par des agents chimiques s'accompagne de modifications dans le couple fonctionnel ligand-récepteur. Les informations émises changent, le comportement social de la cellule également. La transformation s'accompagne d'une synthèse de GSL nouveaux (HAKOMORI -102-, BRADY-FISHMAN -24-, CRITCHLEY-VICKER -53-). Les changements enregistrés au niveau des GSL après transformation sont répertoriés tableau n° 10 et correspondent soit à des synthèses incomplètes et à l'accumulation du précurseur (1 à 4), soit à la production de GSL totalement nouveaux.

La tumorigénèse se reflète également au niveau des glycolipides. La corrélation entre répartition des GSL, activités enzymatiques et comportement tumoral d'une cellule a été démontrée pour l'hépatome du rat (TAKI et coll. -291-). L'évolution du taux de GM₃ (ganglioside) coïncide parfaitement avec ce phénomène de tumorigénèse.

Ces deux processus témoignent de l'évolution que peuvent subir les déterminants de surface. De même au cours de l'embryogénèse, les marqueurs cellulaires subissent une maturation qui conditionne le comportement social de la cellule embryonnaire et sa différenciation. Les glycoconjugués et en particulier les glycolipides y jouent un rôle primordial (HAKOMORI -103-).

e) Contrôle de la perméabilité cellulaire

Si les glycoconjugués ne sont pas impliqués directement dans les phénomènes de perméabilité, il semble que le transport actif de certains ions soit contrôlé par certains glycoconjugués.

Ainsi le transport actif du Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ chez les végétaux dépend étroitement de l'activité d'ATPases qui requièrent la présence de sulfolipides pour être actives. Le rôle de co-facteur joué par

TABLEAU 10

TRANSFORMATION ONCOGENIQUE ET CHANGEMENTS DANS LES GLYCOSPHINGOLIPIDES

TYPE I	↘ GM ₃ et GD ₃
TYPE II	↘ GT ₁ et GD _{1a,b} + ↗ GM ₃ , GM ₂ ou GM ₁
TYPE III	} accumulation du noyau désialylé absent normalement
TYPE IV	
TYPE V	↘ GM ₃ et GM ₂ + ↗ GD et GT
TYPE VI	nouvelles synthèses

les sulfatides a été démontré par KARLSSON -136- et KUIPER -156-.

B - EVENTUELLE PARTICIPATION DES LIPIDES DANS L'AIG

Ainsi les glycoconjugués peuvent jouer un rôle prépondérant dans l'installation de l'AIG et dans son contrôle.

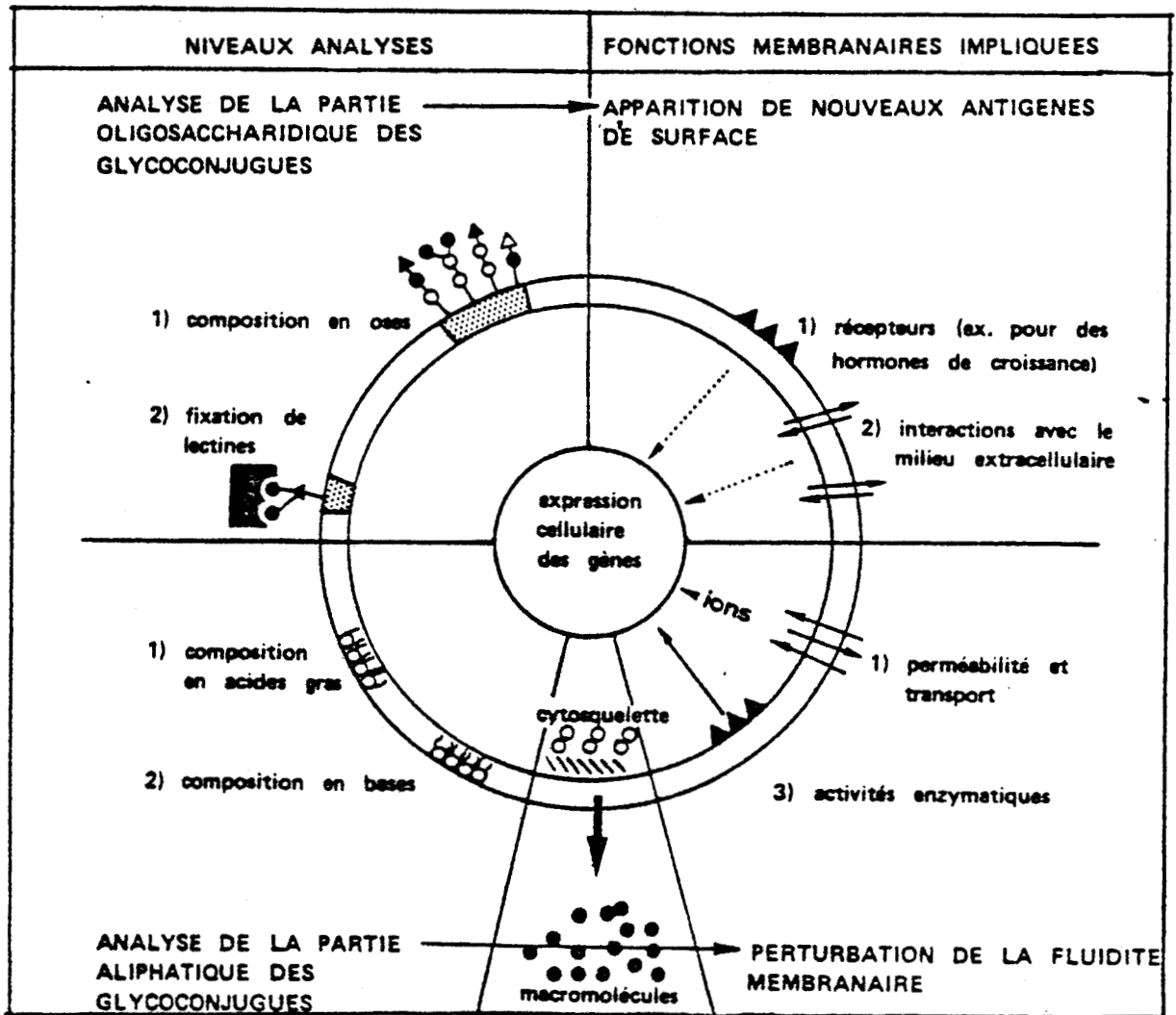
Jusqu'à présent les travaux sur les protéines n'ont pas permis la caractérisation de déterminants de surface impliqués dans la réaction d'incompatibilité. Il se peut que les méthodes d'extraction des protéines utilisées jusqu'à ce jour ne puissent pas solubiliser les marqueurs de surface insérés dans la matrice lipidique. Seuls les traitements aux détergents seraient efficaces. De plus, la plupart du temps, ces extraits protéiques ont servi à la fabrication d'anticorps spécifiques. L'utilisation de tels immunosérums peut ne pas permettre la caractérisation des déterminants de surface. Il se peut également que le déterminant soit de nature lipidique.

Divers travaux nous ont également orientés vers l'étude des lipides.

Les travaux de WHIPPLE et MASCARENHAS -314- ont permis de démontrer que les enzymes nécessaires aux synthèses lipidiques pré-existent dans le pollen de *Tradescantia* (plante à AIG). Ceux de ROGGEN -257- ont montré la participation des substances lipidiques dans la réaction d'autoincompatibilité chez *Brassica*. Les extraits de tryphine (lipides et carbohydrates) affectent la réaction d'incompatibilité (ROBERTS et coll. -251-). De même la levée de l'incompatibilité chez *Brassica* par traitement des stigmates par l'hexane (OCKENDON -237-) ou le chloroforme implique une participation des lipides et des glycolipides dans le phénomène de discrimination.

FIGURE 28

CONSTITUANTS ET FONCTIONS MEMBRANAIRES ANALYSES EN FONCTION DU
PROCESSUS DE FECONDATION



Ces résultats ainsi que le fait que la prise d'eau nécessaire à la germination du pollen se fait au travers de la matrice lipidique nous ont orienté vers l'étude des glycolipides afin de définir la participation des membranes dans le processus d'autoincompatibilité.

Nous avons donc entrepris l'analyse de la structure des glycolipides en tant :

- qu'éventuels marqueurs ou récepteurs cellulaires,
- que composants de la matrice lipidique.

Cette double approche est résumée figure n° 28 et s'est traduite par :

- l'analyse des glycoconjugués afin de déterminer la présence ou l'apparition de déterminants cellulaires impliqués dans la réaction de discrimination ou dans le contrôle de la croissance et de la maturation du tube pollinique,

- l'analyse de la matrice lipidique afin d'élucider son rôle au cours d'un processus de reconnaissance. Nous avons donc entrepris l'analyse de la composition en acides gras et en base de type sphingosine des GSL. De même une étude succincte des glycérides et des phospholipides a été réalisée afin de préciser le rôle de la matrice lipidique en général,

- l'analyse d'enzymes liés aux membranes et dont les co-facteurs sont des glycolipides acides.

Ce sont ces divers résultats que nous allons développer dans les chapitres suivants.

CHAPITRE II

MATERIEL D'ETUDE

Nous avons retenu pour l'étude de l'autoincompatibilité de fécondation deux espèces : *Petunia hybrida* et *Oenothera missouriensis* pour les raisons suivantes :

- ces deux plantes présentent un système d'autoincompatibilité de fécondation de type gamétophytique (A.I.G.). Seuls les allèles d'incompatibilité S des gamètes interviennent dans le contrôle du processus de fécondation.

- le contrôle génétique de l'incompatibilité est bien connu pour ces deux plantes. Des clones porteurs d'allèles d'incompatibilité S définis ont été isolés et mis en culture. Ainsi *Petunia hybrida* provient des serres de NIMEGUE (HOLLANDE) et est mis à notre disposition par le Professeur H.F. LINSKENS ; *Oenothera missouriensis* est cultivé à l'Université de LILLE I et mis à notre disposition par Monsieur B. BRIS.

- la localisation de la réaction de rejet est connue. En effet, selon les plantes, la réaction de rejet peut avoir lieu dans différentes parties du pistil et à des temps variables de la phase progamique. Dans le cas de notre matériel, le tube pollinique issu de la germination du pollen incompatible à la surface stigmatique, traverse le stigmate et pénètre le style. Pour *Oenothera missouriensis* l'arrêt de la croissance du tube pollinique s'effectue dès l'entrée dans le style. Pour *Petunia hybrida* le tube pollinique voit sa croissance bloquée au milieu du style.

CHAPITRE III

ANALYSE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES NEUTRES

I - INTRODUCTION

L'analyse des GSL neutres au cours de la réaction incompatible s'est déroulée en deux temps et comporte :

- une étude de l'évolution dans le temps des taux de GSL après pollinisation compatible ou non,

- une étude des variations de la structure de ces GSL en fonction des mêmes paramètres (durée et type de pollinisation).

Cette analyse des GSL neutres a nécessité tout d'abord une extraction quantitative des glycolipides (Fiche technique T2). Après une hydrolyse alcaline douce qui respecte les sphingolipides et détruit les glycérolipides (Fiche T4), les GSL ont été purifiés par chromatographie d'adsorption ou d'échange ionique (Fiches T5, 6, 7, 8 et 9).

L'étude de l'évolution des GSL a exigé la mise au point d'un dosage spécifique et très sensible. Notre choix s'est fixé sur un dosage fluorimétrique de la sphingosine (Fiche T10).

L'analyse structurale des GSL repose sur l'étude de la composition en acides gras (Fiches T11, T12, T13, T14, T15) après hydrolyse acide des GSL (fiche T11).

II - DISTRIBUTION DES GSL

Nous avons analysé :

- l'évolution des GSL totaux dans les organes reproducteurs (pollen et pistil de *Petunia hybrida*) avant et après pollinisation compatible ou incompatible,

- puis l'évolution de chaque classe de GSL neutres dans des conditions identiques de pollinisation.

A - EVOLUTION DES GSL TOTAUX (publication n°1)

La comparaison entre extraits polliniques et extraits de styles vierges a permis de souligner l'extraordinaire richesse en lipides du pollen. En effet les résultats observés ne peuvent être attribués à une différence d'hydratation entre pollen et style, car cette étude a été réalisée sur du matériel lyophilisé.

L'analyse de l'évolution des GSL totaux à partir de styles auto et xénopollinisés a mis en évidence des différences de comportement fondamentales en fonction de la pollinisation. Ainsi, les taux de GSL évoluent peu ou pas en xénopollinisation. Les valeurs trouvées après 8 et 24 heures de pollinisation compatible sont sensiblement identiques à celles des styles vierges. Par contre l'autopollinisation s'accompagne d'une diminution très marquée des teneurs en GSL : elle atteint en effet, environ 34 et 20% après respectivement 8 et 24 heures de pollinisation incompatible.

B - EVOLUTION DES DIVERS GSL NEUTRES (publication n° 1)

Dans le but de mieux définir les perturbations métaboliques issues de la pollinisation, nous avons entrepris l'étude de chaque classe de glycolipides neutres. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes volontairement limité, pour des raisons techniques, à l'étude des GSL neutres simples contenant moins de 5 résidus osidiques dans leur séquence glycannique.

Après un fractionnement en céramide, mono, di, tri et tétragly-

céramides (*) (présenté fiche T3 à T9), nous avons étudié en fonction du temps, l'évolution de la répartition de ces divers GSL, ainsi que les modifications provoquées par la pollinisation (compatible ou incompatible).

Il convient tout d'abord de souligner l'importance pondérale des Cer (48%) et MGCer (38%) par rapport aux autres fractions réunies (14%). Ce schéma de répartition est général, qu'il s'agisse d'extraits stylaires ou polliniques. Cependant, une légère modulation dans la distribution des GSL oppose ces deux types d'extrait. Le pollen est généralement beaucoup plus riche en GSL fortement glycosylés (DGCer, TGCer, TRGCer) que le style.

La xéнопollinisation entraîne, au bout de huit heures, une baisse très légère des Cer (- 12%) et des MGCer (- 5%) contrebalancée par une très nette accumulation des autres GSL plus polaires. Après 24 heures, l'effondrement du taux des Cer se poursuit et atteint - 58%, mais il est associé à une augmentation des MGCer (+ 55%) et à des taux encore relativement élevés en GSL complexes bien que ces derniers soient en très légère régression.

Par contre, la réaction d'autoincompatibilité est caractérisée après 8 heures de pollinisation par des pertes énormes en Cer (- 50%) et en MGCer (- 40 %) non contrebalancées par la très légère accumulation des DGCer et TGCer ni par le doublement du taux des TRGCer. Après 24 heures d'autopollinisation, le taux des Cer et MGCer

(*) Abréviations : Cer = Céramide
MGCer = Monoglycosylcéramide
DGCer = Diglycosylcéramide
TGCer = Triglycosylcéramide
TRGCer = Tétraglycosylcéramide

réaugmente légèrement, tandis que les autres GSL (et en particulier les TRGCer) rediminuent.

Une évolution générale des GSL en fonction de la pollinisation se dessine donc à travers les résultats obtenus pour les temps-clefs de 8 et 24 heures.

a) la première phase (point clef : 8 heures) est caractérisée par la baisse des Cer et MGCer et l'augmentation des autres GSL. Des modulations apparaissent entre auto et xénopollinisation et concernent :

- l'amplitude des variations toujours plus accusées en autopollinisation,

- la nature du glycolipide s'accumulant (TRGCer) en autopollinisation, DGCer et TGCer en xénopollinisation.

b) la seconde phase (point clef : 24 heures) est caractérisée par des taux toujours très faibles en Cer, mais surtout par la réaugmentation des MGCer et une légère baisse des GSL polaires. L'opposition entre auto et xénopollinisation est très nette. Il semble que l'autopollinisation se traduise par un simple retour aux valeurs initiales (pour les MGCer et TRGCer). Par contre en xénopollinisation, le métabolisme des GSL a fortement évolué : les teneurs en céramides diminuent (- 58%) tandis que les MGCer augmentent (+ 55%).

C - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE

a) 24 heures de pollinisation

L'interprétation des résultats obtenus après 24 heures de pollinisation est relativement simple. En xénopollinisation la distribution des GSL caractérisée par l'extraordinaire accumulation de MGCer, est typique des cellules en croissance (HAKOMORI -103-, CRITCHLEY-VICKER -53-). En effet, une cellule en croissance comme le tube pollinique suppose une synthèse membranaire active et rapide,

incompatible avec l'incorporation dans cette membrane de GSL hautement glycosylés. Il y a donc intégration dans la matrice lipidique de GSL tels que les MGCer dont la synthèse est relativement rapide.

La maturation des glycoconjugués membranaires se poursuivra *in situ*.

Après 24 heures d'autopollinisation, le tube pollinique a depuis longtemps cessé de croître dans les tissus stylaires. Cela se répercute sur la répartition des GSL qui ne témoigne plus d'une croissance cellulaire, mais d'un retour à la normale et à une répartition type "style vierge". Cela est particulièrement illustré par le comportement des MGCer et des TRGCer.

b) 8 heures de pollinisation

La signification biologique de la répartition des GSL après 8 heures de pollinisation est moins évidente. C'est pendant ces 8 premières heures que s'installe ou non la réaction d'auto-rejet. L'évolution des teneurs des GSL complexes (DGCer, TGcer et TRGCer) a retenu notre attention, car leur taux est en général doublé ce qui pose le problème de leur signification biologique.

En effet, pendant ces huit heures, la croissance du tube pollinique, compatible ou incompatible est en pleine extension et l'accumulation de GSL hautement glycosylés semble en contradiction avec cette croissance active. Des études similaires ont été entreprises sur *Oenothera missouriensis* et des résultats identiques ont été obtenus (BRIS et coll. -32-33-).

Il semble donc que la xéнопollinisation s'accompagne de deux phénomènes se contrebalançant mutuellement. Par contre, l'autopollinisation montre une répartition des GSL qui se rapproche énormément

de celle trouvée dans les processus de différenciation cellulaire.

Dans ce processus en effet, une maturation séquentielle des lipides se traduisant par une glycosylation progressive des glyco-conjugués est relatée. Ainsi lors de leur différenciation, les cellules de l'épithélium intestinal sont caractérisées par des taux extrêmement bas en glucosylcéramide (Glc Cer), en lactosylcéramide (Lac Cer) et par l'apparition de GSL plus complexes (GLICKMAN et coll. -94-, BOUHOURS et coll. -23-).

De même la différenciation érythrocytaire correspond également à des perturbations similaires au niveau de la répartition des glycolipides (HAKOMORI -103-). De plus lors de la régression d'un état mature vers un état moins différencié par tumorigénèse, il apparaît à la surface cellulaire des GSL immatures, moins glycosylés.

Il semblerait donc que la répartition des lipides après 8 heures de pollinisation soit le reflet d'une étape de différenciation et de maturation du tube pollinique.

Différenciation et maturation se traduisent, bien que la cellule soit en pleine croissance, par l'apparition de GSL complexes spécifiques et cela quel que soit le type de croisement. Ceci est particulièrement net en autopolinisation où l'on observe en même temps une baisse des teneurs en MGCer et l'apparition des glycolipides plus complexes.

D - CONCLUSION

Ainsi l'étude de la répartition des GSL après pollinisation nous a permis de définir deux phases distinctes :

- une première étape de croissance marquée très nettement par la différenciation des marqueurs de surface,

- et d'une seconde étape de croissance très active dans le cas de la xéнопollinisation se traduisant par de nouvelles synthèses et par

l'incorporation massive de MG_Cer dans les structures membranaires.

Il reste donc à définir la signification biologique de ces GSL complexes qui apparaissent lors de la maturation des surfaces cellulaires. Ont-ils un rôle à jouer dans la détermination de la réaction d'auto-rejet? Leur accumulation est-elle consécutive à l'apparition d'un "blocage" dans les chaînes de biosynthèse ou de celles de dégradation? On sait que la maturation des déterminants de surface est sous l'étroite dépendance d'hydrolases et de transférases, elles-mêmes contrôlées strictement par un programme génétique pré-établi: s'il s'agit d'une maturation, pourquoi ne s'arrête-t-elle pas au même moment en xénopollinisation (3 résidus osidiques) ou en autopollinisation (4 résidus osidiques ou moins)?

C'est dans le but de répondre à ces questions que nous avons entrepris l'analyse structurale des GSL.



III - COMPOSITION EN OSES

L'analyse de la composition en oses a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur FOURNET et s'est révélée décevante.

Les MG_Cer représente environ 30 à 40% des glycosphingolipides neutres totaux ; ils sont essentiellement composés de glucose pour les extraits de pollens, de styles (vierges, auto- et xénopollinisés) indépendamment du génotype pollinique utilisé lors de la pollinisation (compatible et incompatible).

La composition en oses des DG_Cer est plus hétérogène ainsi que témoigne le tableau n° 11. Quatre oses sont identifiés : glucose, mannose, rhamnose et arabinose. La recherche d'osamines a été négative. Le glucose représente 80% des résidus osidiques des DG_Cer. Trois autres oses tels que le rhamnose, l'arabinose et le mannose apparaissent également mais en très faible quantité. Des résultats similaires ont

TABLEAU 11

ANALYSE DE LA COPULE OSIDIQUE DES DIGLYCOSYLCERAMIDES

ose analysé croisement analysé	Rhamnose	Arabinose	Glucose	Mannose	Total
Styles vierges W166K	1,93	1,47	91,63	4,96	99,98
W166K.W166K 8 heures	3,04	1,41	93,97	1,56	99,98
W166K.T2U 8 heures	1,75	0,84	95,58	1,82	99,99
W166K.W166K 24 heures	13,04	11,19	72,89	2,87	99,99
W166K.T2U 24 heures	9,56	7,70	80,49	2,23	99,98
T2U.T2U 24 heures	1,73	3,01	91,90	3,35	99,99
T2U.W166K 24 heures	2,68	3,17	80,13	14,00	99,98
Pollen W166K	46,00	37,85	13,77	2,37	99,99
Pollen T2U	38,78	33,36	25,23	2,62	99,99



été obtenus par BRIS sur *Oenothera missouriensis* (non publiés). Le glucose représente toujours l'ose majeur (sinon le seul) des glycolipides. Les extraits polliniques se distinguent des extraits stylaires par leur richesse en rhamnose et en arabinose. La pollinisation est marquée par une incorporation relativement importante de rhamnose et d'arabinose, ce qui témoigne de l'existence de synthèses dirigées par le gamétophyte mâle. Il convient également de souligner la présence significative du mannose : on sait depuis longtemps qu'il peut conférer aux molécules de glycolipides dans lesquelles il est intégré, certaines propriétés de reconnaissance.

La composition en oses des divers GSL n'a pu être réalisée entièrement. En effet, les quantités trop faibles de TGCer et TRGCer ainsi que la présence de 80% de glucose rendent les diagrammes ininterprétables.

Aussi au terme de cette analyse il ne nous a pas été possible de définir la composition en oses des divers GSL et de confirmer leur rôle de déterminants de surface spécifiques. Comme des altérations dans le degré de glycosylation des GSL survenaient en fonction de la pollinisation et témoignaient des modifications de métabolisme survenues dans les styles, il était tentant de spéculer sur une participation éventuelle des GSL dans les phénomènes de reconnaissance ou de régulation de croissance. Cependant l'étude de la composition en oses ne nous a pas conduit vers la caractérisation de GSL spécifiques d'allèles d'incompatibilité. Leur implication comme récepteurs reste donc hypothétique.

IV - COMPOSITION EN ACIDES GRAS

L'étude de la composition en acides gras a été réalisée pour les GSL neutres totaux et pour chaque classe de GSL. Les techniques utilisées sont décrites en détails fiches T11 à T14 et les résultats obtenus correspondent aux publications 1, 2, 3 et 5.

TABLEAU 12

EVOLUTION DE LA REPARTITION DES ACIDES GRAS
DANS LES GSL NEUTRES APRES POLLINISATION

	AUTOPOLLINISATION			XENOPOLLINISATION		
	acides gras courts	acides gras longs	oléate linoléate	acides gras courts	acides gras longs	oléate linoléate
0-8 h	↘	↗	↘	↘	↗	↗
8-24 h	↘	↗	↘	↗	↘	↗



A - COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES GSL NEUTRES TOTAUX

(publication n° 1)

Les styles vierges se sont révélés posséder des glycolipides très saturés, alors que le pollen est caractérisé par la présence d'acides gras polyinsaturés.

Des variations dans la répartition des acides gras sont enregistrées après pollinisation. Deux phases peuvent être distinguées :

- la première se définit après 8 heures de croisement et se caractérise par la diminution des acides gras courts et l'augmentation des acides gras longs. C'est uniquement au niveau des acides polyinsaturés en C18 que se différencient les deux pollinisations. L'autopollinisation coïncide avec un effondrement des taux d'acide oléique (C18 : 1) et linoléique (C18 : 2).

- la seconde période se définit après 24 heures de croisement. En autopollinisation, le profil de répartition de 8 heures ne fait que s'accroître, par contre, en xéнопollinisation, une brusque inversion dans le profil de répartition s'installe (tableau n° 12).

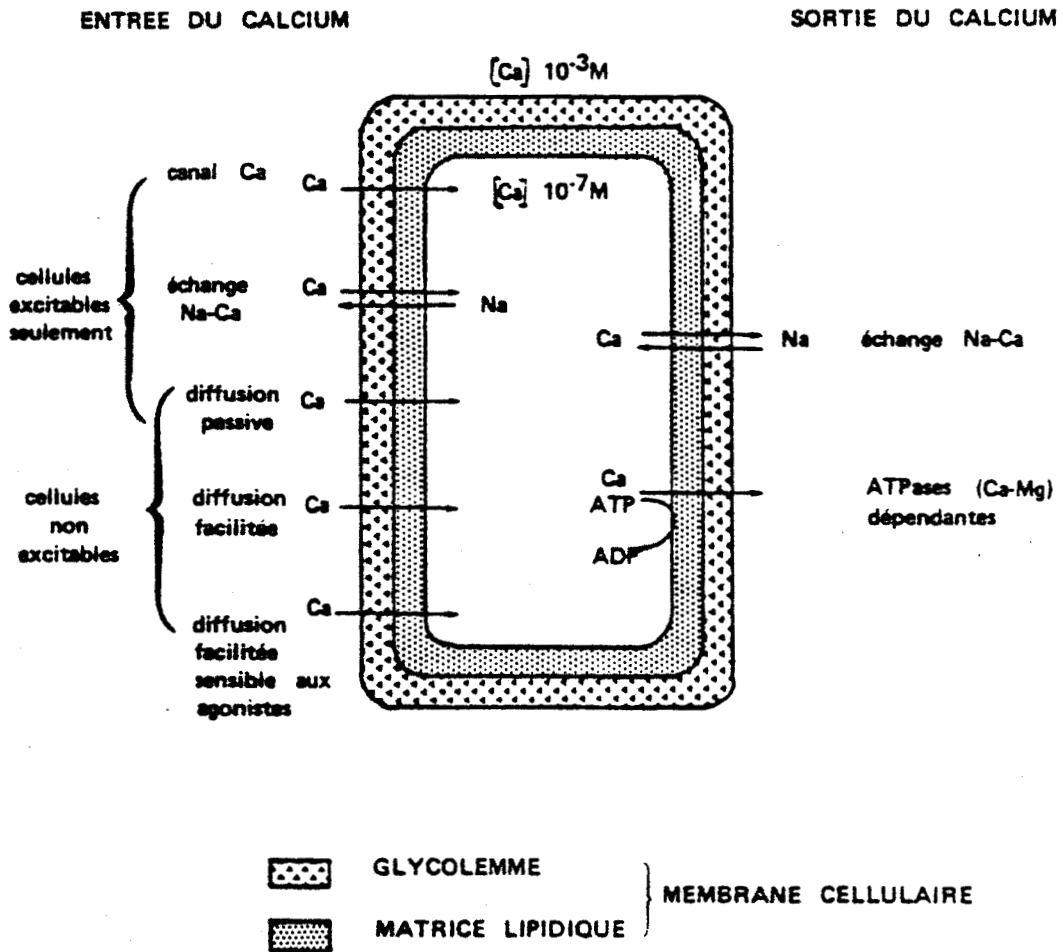
B - COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES DIVERS GSL (publications n° 2 et 3)

Les analyses de la composition en acides gras des Cer, MGCer, DGCer, TGCer et TRGCer conduisent à peu près aux mêmes conclusions.

En effet, les mêmes variations sont retrouvées au niveau des céramides et des monoglycosylcéramides qui représentent à eux seuls 63 à 86% des glycosphingolipides neutres. Ainsi la composition en acides gras de ces deux glycosphingolipides (Cer, MGCer) imprimera donc le sens de répartition des acides gras au niveau des glycosphingolipides totaux. Ce profil de répartition n'est cependant pas général et ne coïncide pas avec celui des DGCer et TGCer et TRGCer en particulier .

FIGURE 29

MECANISMES D'ENTREE ET DE SORTIE DES IONS CALCIUM AU TRAVERS DE LA MEMBRANE



Il convient donc de différencier les deux types de réponses : l'une, enregistrée au niveau des Cer et MGCer et qui, en raison de la rapidité de leur turn-over, va refléter l'état métabolique du stylet et du tube pollinique au moment de l'analyse ; l'autre, correspondant aux glycolipides plus complexes qui sont les témoins du métabolisme lipidique présent peu de temps auparavant. La signification biologique de ces variations de la matrice lipidique est donc posée.

C - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE

Les récents travaux ont attribué aux acides gras un rôle important dans le contrôle de la physiologie membranaire (FRIEDMAN -83-). C'est en effet sur eux que reposent les transitions de phases qui régulent la fluidité membranaire (HAINES -99-). De plus, le contrôle de la perméabilité aux ions, qu'elle soit passive ou active (faisant intervenir les ATPases), ne peut se concevoir sans une régulation de la fluidité membranaire (KUIPER -156-). Cependant, d'autres fonctions, moins évidentes, leurs sont également attribués, telles :

a) - contrôle de la croissance ou de l'adhésion cellulaire (HORWITZ et coll. -121-), de la division des cellules lymphoïdes, des interactions mitogène-lymphocyte et de l'immuno-suppression (MEADE-MERTIN -199-), de la réactivité des antigènes et des anticorps (ALVING)RICHARDS -6-).

b) - régulation ou modulation des enzymes allostériques liés aux membranes (FARIAS et coll. -73-) ou du potentiel de membrane (FRIEDMAN -83-).

Il est difficile, avec les éléments dont nous disposons et sans études physiques, d'évaluer l'état fluide de la membrane. Un schéma général se dégage cependant de ces analyses de la composition en acides gras des GSL.

En effet, la fluidité membranaire semble évoluer différemment après auto- ou xénopollinisation. A l'autopollinisation correspond l'apparition de GSL complexes fortement hydroxylés et d'acides gras saturés, ce qui a pour conséquence de diminuer la fluidité membranaire. Par contre, la répartition entre acides gras longs et courts, l'accumulation d'acides oléique et linoléique ne fait que rendre les membranes plus fluides après xénopollinisation.

Une relation particulière existe également entre l'altération de la composition en acides gras et le changement de la perméabilité aux ions et des activités enzymatiques liées aux membranes (HASLAM et coll. -107-, DAVIS et coll. -57-, WOJTCZAK -316-).

Les mécanismes de transport, passif ou actif, liés à la présence d'enzymes, sont influencés par le contenu en acides gras des membranes. Par exemple, la perméabilité des ions potassium dans les liposomes augmente parallèlement à l'accroissement du degré de désaturation des acides gras (VAN DEENEN -299-, DAVIS et SILBERT -57-). Le transport actif des ions au niveau des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique est également en relation avec la présence d'acides gras désaturés (HASLAM -107-).

Nous insisterons particulièrement sur le rôle des acides oléique (C18 : 1) et linoléique (C18 : 2). En effet, ces deux acides gras ainsi que l'acide arachidonique (C20 : 4) sont de puissants régulateurs des ATPases et en particulier des ATPases Ca²⁺ dépendantes. Si leur concentration augmente ne serait-ce que de 1%, il s'ensuit une inhibition de l'influx du Ca, et une stimulation de sa libération (Figure n°29) (SCHALZING-KUTSCHERA -267-, CHEAH -45-). Or ces acides gras ne sont pas intégrés dans les GSL après autopollinisation, et de plus, ils sont

retrouvés à l'état libre dans le pollen (BRIS -34-). Ainsi les fluctuations de la concentration du milieu intracellulaire en oléate-linoléate pourraient réguler l'importation et l'exportation du Ca^{2+} qui est responsable, selon PICTON et STEER -242-, du contrôle de la croissance du tube pollinique.

Une autre coïncidence est frappante ; elle concerne le rôle de stimulateur de croissance de ces mêmes acides gras (HORWITZ et coll. -121-).

Les perturbations dans la répartition des acides gras coïncident avec des différences de propriétés électriques de ces membranes ainsi modifiées. Cela se traduit en particulier par des modifications de la résistance ou du potentiel d'action membranaire. Ces changements sont observés quand on augmente le pourcentage d'acides gras saturés dans une membrane, car on accélère également la transition de phase du cristal "solide-liquide" dans le sens d'une fluidité plus faible.

Ces changements de propriétés physiques des membranes cellulaires, sont détectables *in vivo* par des techniques électrophysiologiques (FRIEDMAN -83-). LINSKENS et coll. -182- ont également appliqué ces mêmes techniques chez *Petunia hybrida*. Des variations d'amplitude du potentiel d'action sont décelées entre le stigmate et la base de l'ovaire, en relation avec la pollinisation compatible et incompatible.

D - CONCLUSION

Au terme de cette analyse sur la composition en acides gras des GSL neutres, il a été possible de mettre en évidence une mobilisation active des acides gras en fonction de la pollinisation. Cette mobilisation est contrôlée par le gamétophyte mâle, puisque certains acides gras typiques des extraits polliniques sont retrouvés dans les extraits de styles pollinisés.

TABLEAU 13

EVOLUTION DE LA REPARTITION DES SPHINGOSINES
DANS LES CERAMIDES APRES POLLINISATION

	AUTOPOLLINISATION			XENOPOLLINISATION		
	degré de désaturation	BLC courtes	BLC longues	degré de désaturation	BLC courtes	BLC longues
0-8 h	↘	↘	↗	↗	↘	↗
8-24 h	↘	↘	↗	↗	↗	↘

abréviation : BLC base à longue chaîne de type sphingosine



Il semble que la physiologie membranaire soit déterminante dans la réaction d'autoincompatibilité. Un fait bien connu est à rapprocher de ces résultats. L'autoincompatibilité ne s'exprime pas à basse température. Divers phénomènes, dont la fluidité membranaire, sont modifiés par l'abaissement thermique ainsi que par l'intervention d'autres paramètres tels que les variations de pH.

A ces changements de profils de répartition des acides gras correspondent des perturbations dans les propriétés membranaires qu'elles soient électriques, enzymatiques ou autres ; l'ensemble de ces modifications de structure et de contrôle sont à la base même de la régulation du processus d'auto-rejet.

V - ANALYSE DE LA COMPOSITION EN BASES DE TYPE SPHINGOSINE

L'analyse de la composition en base à longue chaîne (BLC), telle la sphingosine, a été réalisée pour les divers GSL neutres. Les détails des techniques utilisées sont consignés fiches T11 et T15. Les résultats obtenus correspondent aux publications 2 et 4.

A - COMPOSITION EN BASES DE TYPE SPHINGOSINE (publications n° 2 et 4)

Les pollens sont uniformément caractérisés par une extraordinaire richesse en heptadécasphinganine (d17 : 0) et phytosphingosine (t18 : 0). Les styles sont d'une manière moins constante, caractérisés par la présence de sphingosine (d18 : 1).

D'une manière générale, l'autopollinisation affecte le degré de saturation des bases à longue chaîne en le réduisant constamment comme cela a été rencontré pour les acides gras.

De plus, au niveau des céramides on retrouve la même évolution du profil de répartition des bases (tableau n ° 13) :

- dans un premier temps (0-8 heures) auto- et xénopollinisation s'accompagnent d'une augmentation des teneurs en bases dont la chaîne aliphatique contient plus de 18 atomes de carbone et de la baisse des bases à chaîne hydrocarbonée plus courte . L'opposition entre auto- et xénopollinisation s'exprime au niveau du degré de saturation.

- puis dans un second temps comme pour les acides gras, on assiste à une inversion du profil de répartition après 24 heures de xénopollinisation. Par contre, l'autopollinisation ne fait qu'accentuer le profil précédent.

Cette évolution est retrouvée en partie au niveau des MGCer, mais pas au niveau des GSL complexes pour lesquels l'évolution des bases en fonction de la longueur globale des chaînes est pratiquement nulle.

Il faut également souligner combien l'étude de la répartition des bases s'est révélée précieuse, notamment dans l'analyse du contrôle qu'exerce le gamétophyte mâle sur la synthèse des GSL. Ce fait a déjà été constaté. Puisque pollen et styles ne possèdent pas les mêmes déterminants, une origine pollinique ou styloïde pourra être attribuée aux diverses bases ce qui permettra, dans les études ultérieures, de suivre l'évolution du métabolisme des GSL en fonction du temps et du type de pollinisation.

Dans un premier temps on assiste à l'incorporation des bases de type pollinique dans les GSL après auto- ou xénopollinisation. Puis, dans un second temps, on constate que cette incorporation ne persiste qu'en xénopollinisation ce qui traduit le contrôle du gamétophyte mâle sur les synthèses membranaires.

B - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE

Les chaînes aliphatiques des bases de type sphingosine sont impli-

quées, au même titre que les acides gras, dans la régulation des propriétés physiques des membranes et en particulier sur leur état de fluidité.

Les bases à longue chaîne contrôlent la fluidité membranaire au moyen de leur degré de saturation et par la présence de groupements hydroxylés. Il est difficile d'évaluer la participation des bases à l'évolution de la fluidité membranaire. Cependant, comme pour les acides gras, l'autopollinisation coïncide avec une augmentation de la saturation des bases, et par conséquent, avec une perte de fluidité de la matrice.

Outre cette implication dans la définition de l'architecture membranaire et dans son état de fluidité, les bases possèdent des rôles qui leur sont propres. En effet, la longueur de la chaîne aliphatique des sphingosines est un facteur déterminant dans l'agré- gation des gangliosides de la membrane synaptique (YOHE et coll. -318-).

Ainsi la longueur des chaînes carbonées des bases et leur degré de saturation influenceront la fluidité membranaire dont découleront les propriétés de perméabilité et l'orientation des récepteurs.

VI - CONCLUSION

Au terme de cette étude sur les GSL neutres, il apparaît primordial de définir plus précisément les relations entre pollinisation et perméabilité cellulaire.

Nous avons donc abordé cette définition avec l'étude des enzymes et cofacteurs impliqués dans le contrôle de la perméabilité chez les végétaux, c'est-à-dire ATPases et sulfolipides.

TABLEAU 14

EVOLUTION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES ACIDES EN FONCTION
DE LA POLLINISATION

Types d'extraits	GSL ACIDES TOTAUX		
	nmoles/g tissu	relatif/croisement compatible	relatif / styles vierges
Styles vierges W166K	48,74		1,000
Pollen W166K	42,56		
Pollen T2U	55,82		
W166K.W166K 8 heures	43,64	2,00	0,895
W166K.T2U 8 heures	21,83	1,00	0,447
W166K.W166K 24 heures	27,83	0,81	0,571
W166K.T2U 24 heures	34,47	1,00	0,707



CHAPITRE IV

ANALYSE DES SULFOLIPIDES

I - INTRODUCTION

Il nous a semblé important de définir la participation des GSL acides, et plus particulièrement des sulfolipides (SL) aux fonctions membranaires.

L'étude des SL a été réalisée avec *Petunia hybrida* et comporte l'analyse :

- quantitative (taux des SL),
- qualitative (évolution de la distribution des acides gras et des sphingosines en fonction de la pollinisation).

Pour cela les sulfolipides ont été extraits et purifiés (Fiches-T2 à T9), dosés (Fiche T10), hydrolysés (Fiche T11). L'étude des compositions en acides gras et en sphingosine a été réalisée comme pour les GSL neutres (Fiches T12 à 15).

II - RESULTATS

A - POLLINISATION ET SULFOLIPIDES (publication n° 1)

Il nous a paru intéressant de doser les glycosphingolipides acides et neutres afin de comparer leur importance relative dans les pollens et dans les styles vierges, auto- et xéнопollinisés. Ce dosage a été effectué selon la méthode fluorimétrique décrite par NAOI et telle que nous l'avons précédemment appliquée aux glycosphingolipides totaux (Fiche T10).

Les résultats concernant les dosages des glycosphingolipides acides sont consignés dans le tableau n° 14.

L'examen du tableau précédent est intéressant. Nous constatons en effet qu'au niveau des dosages des sulfatides, les styles vierges

(W166K) sont relativement plus riches que le pollen de même génotype. Le pollen T2U est lui caractérisé par sa richesse en sulfatides.

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

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

B - DISTRIBUTION DES ACIDES GRAS DES SULFOLIPIDES

Ces résultats n'ayant pas encore été publiés sont consignés

tableau n° 15.

Les profils de répartition des acides gras dans les SL des deux pollens se ressemblent énormément ; acides palmitique et stéarique en sont les acides gras majeurs.

On les retrouve également en très forte quantité dans les styles vierges. Cependant, il convient de souligner la présence d'un troisième acide gras majeur : l'acide oléique (C18:1) qui confère aux styles un degré de saturation plus faible.

La caractéristique la plus surprenante de ces trois distributions est l'extraordinaire degré de saturation des chaînes aliphatiques. Cependant, il semble que ce soit un trait général des sulfolipides qui présentent, quel que soit le règne (animal ou végétal), un degré de saturation plus élevé, des chaînes aliphatiques plus longues que les

glycérolipides (HANSSON -105-). Ce trait est plus marqué chez les plantes où les lipides généralement très saturés sont très riches en acide palmitique (C16 : 0) (KUIPER -156-). Les SL des organes reproducteurs de *Petunia hybrida* n'y font pas exception. Cependant la raison de cette opposition entre les SL et les glycérolipides n'est pas encore connue.

L'évolution du profil de répartition des acides gras dans les SL après pollinisation est relativement complexe. Nous envisagerons donc comme pour les GSL neutres :

- l'évolution du degré de saturation,
- l'évolution des acides gras "courts" : c'est-à-dire dont la chaîne aliphatique comporte moins de 18 atomes de carbone,
- l'évolution des acides gras "longs".

Ainsi après 8 heures de pollinisation compatible, l'ensemble des acides gras saturés diminuent à l'exception de l'acide stéarique (C18 : 0) ; soit une augmentation de 20% du degré d'insaturation. Ces 8 heures de pollinisation sont également marquées par une augmentation générale des acides gras à longues chaînes au détriment des acides gras à chaînes courtes. Ensuite après 24 heures, seuls les acides gras à chaînes courtes réaugmentent tandis que les autres diminuent. Cette évolution du profil de répartition des acides gras dans les SL est à rapprocher de celle des GSL neutres. En effet, la distribution des acides gras dans les GSL neutres et acides (SL) suit les mêmes lois.

Inversement l'autopollinisation s'accompagne d'une saturation de plus en plus grande des chaînes aliphatiques. Après 8 heures de pollinisation, les acides gras à chaînes courtes diminuent légèrement contrairement aux acides gras à chaînes longues. Ensuite, après 24 heures, on enregistre une inversion de profil caractérisée par l'effondrement des taux d'acides gras à chaînes longues.



TABLEAU 15

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES SULFATIDES DE PETUNIA HYBRIDA

	pollen T2U	pollen W166K	styles vierges W166K	W166K.W166K 8 h	W166K.T2U 8 h	W166K.T2U 24 h	W166K.W166K 24 h
C14:0	4,76	4,00	6,66	5,22	3,75	9,33	1,00
C15:0	3,69	3,03	3,15	3,76	2,81	4,17	0,77
C16:0	47,41	55,01	34,34	37,72	23,71	47,82	48,87
C16:1	1,53	1,41	4,66	1,22	3,83	1,28	0,92
C17:0	1,99	1,09	2,14	0,90	0,71	2,01	1,37
C18:0	21,74	22,37	30,80	32,17	35,00	25,36	25,69
C18:1	3,54	2,80	12,18	4,33	19,12	3,28	0,48
C18:2	1,20	2,10	1,89	0,70	2,97	1,25	0,26
C18:3	-	-	-	-	2,05	-	0,09
C20:0	5,14	2,51	4,17	5,39	2,49	2,63	8,84
C20:1	-	-	-	-	3,55	-	-
C22:0	5,35	3,04	-	5,50	-	1,58	8,64
C24:0	3,64	2,63	-	3,08	-	1,28	3,06

Ces résultats ont été également retrouvés pour *Oenothera missouriensis*, surtout en ce qui concerne la xénopollinisation (DELBART et coll. -59-).

Il semble donc que la xénopollinisation s'accompagne d'un ensemble cohérent de modifications dans l'architecture membranaire du moins en ce qui concerne la répartition et l'intégration des acides gras, allant dans le sens d'une optimisation de la fluidité et de la perméabilité, conditions essentielles pour la croissance du tube pollinique.

C - DISTRIBUTION DES SPHINGOSINES DANS LES SULFOLIPIDES

Les résultats de l'analyse de la répartition des sphingosines dans les sulfolipides sont reportés tableau n° 16.

La répartition des bases dans les sulfolipides d'extraits polliniques varie énormément en fonction du clone analysé. Par contre, ils s'opposent par leur degré d'insaturation aux SL des extraits stylaires. Ces derniers sont plus saturés.

Les SL stylaires se caractérisent également par des sphingosines à très longue chaîne (20 atomes de carbone).

Il convient aussi de souligner un fait curieux concernant les bases trihydroxylées telles que la phytosphingosine (t18 : 0) qui ne sont pas ou peu incorporées dans les SL. Ce fait a été retrouvé pour les SL d'Oenothères (DELBART et coll. -59-) il semble que ceci soit une règle générale pour les sulfolipides des tissus animaux (HANSSON et coll. -105-).

La xénopollinisation s'accompagne d'abord d'une augmentation du taux d'insaturation. De plus, on assiste à la perte de l'incorporation des sphingosines des extraits stylaires (d18 : 0, d20 : 0) au profit des bases possédant des chaînes carbonées plus courtes. Après 24 heures, le profil de distribution s'inverse.

TABLEAU 16

COMPOSITION EN BASES A LONGUES CHAINES DES SULFATIDES DE PETUNIA HYBRIDA

ald.	parent probable	pollen W166K	pollen T2U	styles vierges W166K	W166K.W166K 8 h	W166K.T2U 8 h	W166K.W166K 24 h	W166K.T2U 24 h
C14:0	d16:0-t17:0	3,21	11,02	0,59	2,53	4,02	pas dosé	5,65
C14:1	d16:1-t17:1	5,40	9,30	12,48	2,25	16,08	pas dosé	2,38
C15:0	d17:0-t18:0	21,00	4,72	2,66	1,20	2,88	1,70	3,07
C15:1	d17:1-t18:1	5,26	4,92	2,96	1,65	5,88	1,95	2,52
C16:0	d18:0-t19:0	6,68	13,90	16,86	5,71	10,15	19,71	8,34
C16:1	d18:1-t19:1	6,34	18,62	1,70	2,18	7,60	6,13	6,48
C17:0	d19:0-t20:0	11,07	7,05	4,72	4,80	19,27	29,70	6,13
C17:1	d19:1-t20:1	7,20	8,96	2,16	3,28	10,66	9,00	7,05
C18:0	d20:0-t21:0	8,66	11,67	42,40	62,83	10,38	23,08	35,71
C18:1	d20:1-t21:1	25,17	9,83	13,46	13,56	13,07	8,72	22,66
Insaturé		49,37	51,63	32,76	22,92	53,29	24,80	41,09
Saturé		50,62	48,36	67,23	77,07	46,70	75,19	58,90

L'autopollinisation s'accompagne de façon très classique maintenant d'une saturation exagérée et s'oppose à la xéнопollinisation par la mobilisation des bases à très longue chaîne aliphatique.

III - INTERPRETATION DES RESULTATS

A - SULFOLIPIDES ET TRANSPORT ACTIF DES CATIONS

Les sulfolipides sont en général associés au transport actif du Na^+ et K^+ chez les plantes. Ils sont considérés comme les cofacteurs essentiels des ATPases Na^+ , K^+ dépendantes. Il semblerait que ces SL, par leurs charges négatives, attirent les cations et ce, quel que soit le règne étudié (KARLSSON -135-).

Ils sont également considérés comme les cofacteurs des ATPases Ca^{2+} dépendantes, au même titre que la phosphatidylcholine (KUIPER -156-).

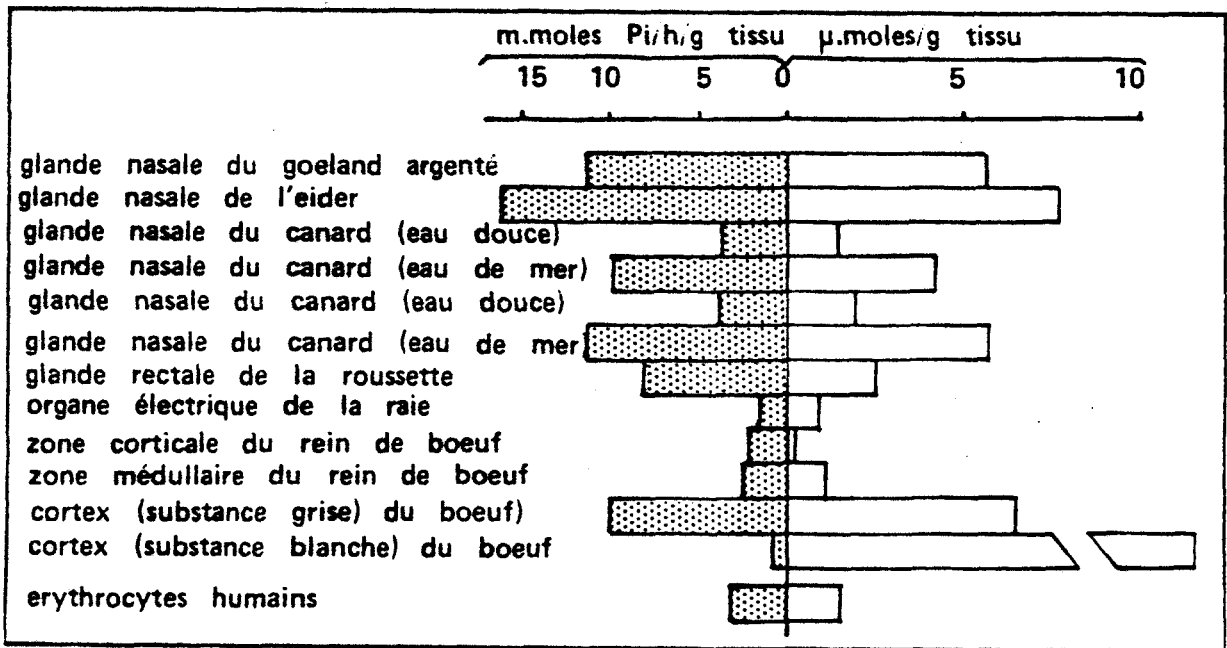
Les travaux de KARLSSON et coll. -135-136- ont permis de mettre en évidence une relation stoechiométrique entre les concentrations tissulaires en SL et l'activité des ATPases Na^+ , K^+ dépendantes, enzymes qui sont considérés comme impliqués spécifiquement dans la translocation du Na^+ et du K^+ . Cette relation (Figure n° 30) ne se retrouve pas uniquement pour les tissus caractérisés par un transport sodique élevé.



Une discussion sur le rôle des lipides dans le transport de l'eau et des ions commence par la question suivante : les lipides, sont-ils oui ou non essentiels à ces transports d'eau et d'ions au travers des membranes biologiques ?

En fait, le maintien d'un état liquide cristallin de la matrice lipidique est indispensable pour permettre les changements conformationnels que doit subir l'enzyme afin d'assurer le transport actif des ions.

FIGURE 30

RELATIONS ENTRE SULFATIDES ET (Na^+K^+) -ATPases DANS DIVERS TISSUS ANIMAUX (KARLSSON et coll. 1980)



 SULFATIDES
 (Na^+K^+) -ATPases

Il semblerait que les SL ne soient pas impliqués dans la translocation des ions Na^+ (KARLSSON -136-). Par contre, ils seraient nécessaires à l'hydrolyse de l'ATP, et également à la translocation des ions K^+ . En l'absence de SL la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ devient électrogénique. Selon le modèle proposé par KARLSSON -136-, les SL sont disposés en anneau autour de l'unité de transport des cations. La figure n° 31 résume de façon très schématique le rôle des SL dans la translocation des ions K^+ .

La question qui se pose, dans notre cas précis, est celle de la participation des SL à l'évolution de la perméabilité dans les pistils après pollinisation. Les SL peuvent agir sur ce processus de plusieurs façons :

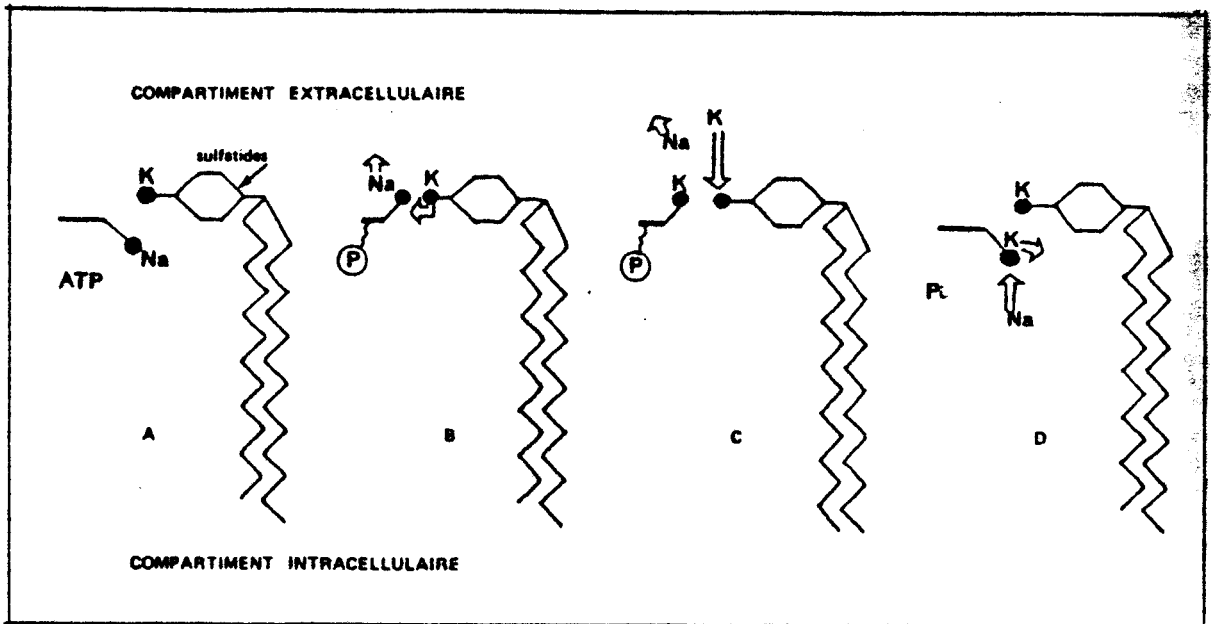
- en exerçant une classique régulation viscotropique au moyen des chaînes aliphatiques des acides gras et des sphingosines,
- en influençant le nombre de site de transport ; leur taux étant alors directement impliqué dans ce contrôle.

B - REGULATION VISCOTROPIQUE DE LA PERMEABILITE AUX IONS

L'éventualité d'une régulation viscotropique de la perméabilité membranaire est probable. La composition en acides gras et en bases varie au cours de la xénopollinisation dans le sens d'une augmentation de la fluidité, et donc de la perméabilité. En effet, cette pollinisation s'accompagne principalement d'une amélioration du degré d'insaturation au niveau des GSL neutres comme au niveau des sulfolipides. On assiste à un ensemble de perturbations dans l'architecture membranaire qui va conditionner l'optimisation de la perméabilité membranaire dans le cas d'une pollinisation compatible. Ce phénomène n'est pas perceptible en autopollinisation.

FIGURE 31

ROLE DES SULFATIDES DANS LA TRANSLOCATION DES IONS SODIUM ET POTASSIUM



BUS
LILLE

C - REGULATION DU NOMBRE DE SITES TRANSPORTEURS

L'interprétation de l'effondrement des taux de SL surtout après xénopollinisation est plus délicate. Si la perméabilité membranaire augmente par régulation viscotropique dans le cas de la pollinisation compatible, elle s'accompagne d'une baisse très nette des sites de translocation des ions K^+ . Il semble qu'une diminution du taux des SL n'affecte que le transport des ions K^+ , mais pas celui des ions Na^+ (KARLSSON -136-). La pompe Na^+/K^+ devient électrogénique. Dans cette éventualité, on peut se demander quelle relation unit le taux de SL, le fonctionnement de la pompe et la réaction d'incompatibilité.

Si la baisse des SL rend la pompe électrogénique, un courant électrique traversera la pompe et constituera une mesure directe du taux de transport des ions.

Les travaux de WEISENSEEL et JAFFE -313- ont effectivement démontré que de forts courants électriques traversaient les tubes polliniques de *Lilium longiflorum* (de l'ordre de 100 pico Ampères). Ces courants électriques diminuent en même temps que s'effondre le taux en ions K^+ dans le milieu extérieur. Or ces variations dans la concentration en ions K^+ ont des effets immédiats sur la vitesse d'élongation et le diamètre du tube pollinique.

En tenant compte du fait que les protons doivent être expulsés du tube pollinique, que le potentiel de membrane du pollen de *Lilium* en germination est de -120 mV et correspond exactement au potentiel de diffusion des ions K^+ , ces auteurs ont émis l'hypothèse suivante : la mise en route d'une pompe K^+/H^+ assurerait l'expulsion des protons et en même temps le contrôle de la croissance du tube pollinique.

En effet, si la concentration en ions K^+ diminue dans le milieu extérieur du tube pollinique, ceci entraîne une hyperpolarisation de

la membrane ce qui à son tour empêche l'entrée des ions Ca^{2+} , il s'en suit une perte d'activité pour les vésicules acheminant les précurseurs membranaires. L'entrée des ions Ca^{2+} dans le tube pollinique, et donc le contrôle de sa croissance, dépend directement et immédiatement des concentrations du milieu extérieur en ions K^+ . Or, dans les conditions physiologiques normales, le milieu extérieur au tube pollinique est représenté par les tissus du pistil.

Après 8 heures de xénopollinisation on assiste donc à un effondrement des SL d'origine stylaire, comme le prouvent la perte des sphingosines de type stylaire et l'incorporation de bases de type pollinique. Faute de translocateurs (SL), l'ion K^+ n'entre plus dans les cellules stigmatiques ou stylaires, et vient enrichir le milieu extérieur au tube pollinique. La pompe à proton de ce dernier peut fonctionner, le calcium entrer et l'élongation se poursuivre.

En autopollinisation, les SL ont peu évolué (légère baisse à peine significative, et persistance de sphingosine de type stylaire). Les sites de translocation du K^+ sont présents et actifs. L'ion K^+ entre dans les cellules du pistil et n'est pas accessible au tube pollinique. La pompe H^+/K^+ de ce dernier fonctionne mal ou pas du tout, sa membrane s'hyperpolarise, la croissance est perturbée.

Après 24 heures de pollinisation compatible, l'augmentation des SL correspond à des synthèses nouvelles dans le pistil et dans le tube pollinique comme le prouve l'évolution de la composition en bases. Chaque cellule régule activement son propre transport ionique.

IV - CONCLUSION

Ainsi au terme de cette étude sur les SL de *Petunia hybrida*, il est possible de postuler que le contrôle de la perméabilité membranaire

doit se réaliser à deux niveaux :

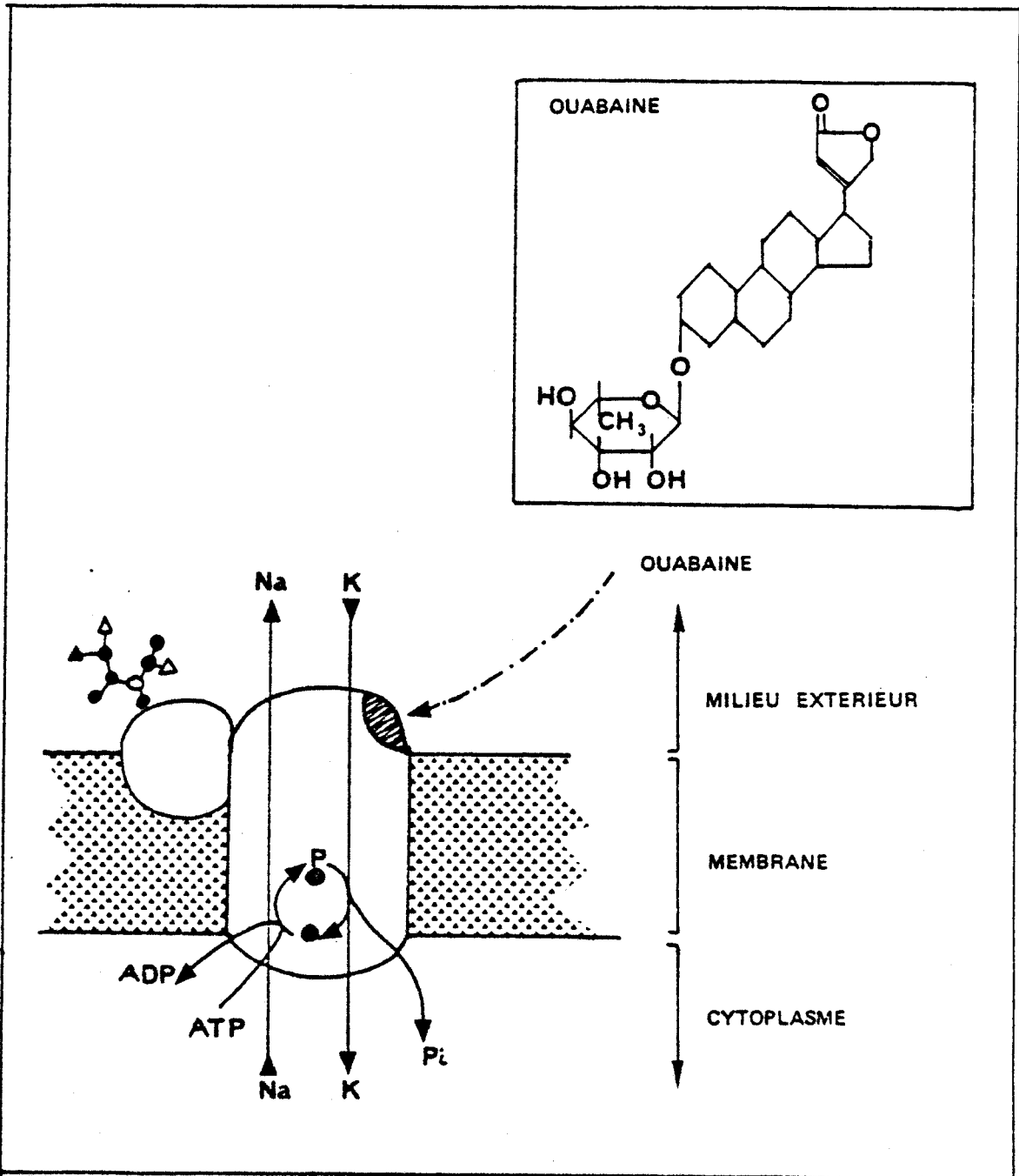
- les taux particulièrement bas des SL stylaires favorisent en xénopollinisation le maintien d'un gradient en ions K^+ élevé dans le milieu extérieur au tube pollinique. Ceci favorise le fonctionnement d'une pompe à protons dépolarisant la membrane du tube pollinique. L'ion Ca^{2+} peut entrer facilement et jouer son rôle de régulateur de croissance,

- les membranes sont suffisamment fluides pour optimiser le processus de translocation des ions.

Il nous a semblé important de définir plus précisément ce phénomène de perméabilité aux ions. C'est dans ce but que nous avons entrepris le dosage de l'activité des $(Na^+ + K^+)$ ATPases après pollinisation compatible ou non.

FIGURE 32

ROLE DE LA $(Na^+ + K^+)$ -ATPase DANS LE TRANSPORT ACTIF DU SODIUM ET DU POTASSIUM



CHAPITRE V

TRANSPORT ACTIF ET ACTIVITE DES Na^+ , K^+ ATPases

I - INTRODUCTION

Comme nous venons de le souligner dans les précédents chapitres, l'architecture membranaire se modifie énormément après pollinisation. Ainsi en xénopollinisation compatible, elle est très fluide et sa perméabilité est accrue. Par contre, elle est moins fluide et par conséquent plus imperméable en autopollinisation. Il nous a donc semblé important de vérifier ce fait au travers d'une analyse du transport actif des ions Na^+ et K^+ .

Le transport actif des ions Na^+ et K^+ est assuré par un enzyme : l'ATPase Na^+ et K^+ dépendante. Cette ATP-phosphohydrolase (EG 3,6,1,3) est une protéine intégrée, qui dans des conditions physiologiques précises, hydrolyse l'ATP pour assurer le transport du Na^+ vers le milieu extracellulaire tout en faisant pénétrer le K^+ dans la cellule contre un gradient de concentration défavorable. Selon certains auteurs, 3 Na^+ sont expulsés, tandis qu'entrent 2 K^+ et qu'est hydrolysée une molécule d'ATP. Cette pompe Na^+ - K^+ est inhibée par l'ouabaine dans le compartiment extracellulaire et par le Ca^{2+} dans le cytoplasme.

Le transport actif des ions implique un cycle de phosphorylation/déphosphorylation. L'expulsion du Na est liée à une étape de phosphorylation, le flux de K^+ à une étape de déphosphorylation. Il semblerait que l'hydrolyse de l'ATP soit nécessaire aux changements conformationnels que subissent les protéines de la pompe et qui sont grands consommateurs d'énergie (Figure n° 32).

Nous avons donc analysé en fonction du temps et de la pollinisation, l'activité de (Na^+ + K^+) ATPase. Mais cette étude a dû être

réalisée non pas sur *Petunia hybrida*, mais sur *Oenothera missouriensis* car dès leur pollinisation dans les serres de Nimègue, les styles de *Petunia hybrida* sont lyophilisés. Cependant comme *Petunia* et *Oenothera* se ressemblent à bien des égards, nous avons choisi d'utiliser le matériel frais que représente *Oenothera*. Ce sont ces résultats que nous présentons.

II - RESULTATS

Les résultats obtenus sur *Oenothera missouriensis* ont été soumis pour publication à *Phytochemistry* et sont reportés à la suite (publication n° 6) et fiche technique T17.

Divers critères ont été définis afin de caractériser la $(Na^+ + K^+)$ ATPase des pistils d'Oenothères. L'activité de cet enzyme varie en fonction des concentrations en Na^+ et K^+ . L'ouabaine est fortement inhibitrice.

Ainsi, nous avons pu localiser la présence de $(Na^+ + K^+)$ ATPase dans les organes floraux d'*Oenothera*.

De plus, l'activité de cet enzyme évolue de façon tout à fait remarquable après pollinisation.

La translocation des ions Na^+ et K^+ est stimulée après xénopollinisation et atteint dans les stigmates un maximum après deux heures de croisement compatible, puis on assiste à une légère diminution. Cependant, les valeurs sont toujours fort élevées. Dans les styles, l'activité enzymatique ne fait qu'augmenter en fonction du temps.

Après autopollinisation, une légère augmentation de l'activité des ATPases est enregistrée. Elle est maximum après 1 heure de croisement incompatible, puis régresse aux valeurs initiales dans les stigmates comme dans les styles.

Il nous semble donc que les modifications enregistrées concernent l'activation des ATPases du tube pollinique.

III - INTERPRETATION DES RESULTATS

A - $(Na^+ + K^+)$ ATPase ET CROISSANCE DU TUBE POLLINIQUE

L'augmentation de l'activité des $(Na^+ + K^+)$ ATPases témoigne de la croissance du tube pollinique dans les stigmates et dans les styles.

En effet, après un croisement compatible, le tube pollinique traverse la papille stigmatique et poursuit sa croissance dans le stigmate puis dans le style jusqu'à l'ovaire et l'ovule, site de la syngamie. Cette croissance implique l'établissement d'échanges métaboliques. Selon WEISENSEEL et JAFFE -313- la croissance du tube pollinique repose sur une régulation harmonieuse des entrées du K^+ et des sorties de protons, c'est-à-dire sur ses relations avec l'installation et le développement d'un transport actif des ions.

Il semble que les ATPases Na^+ et K^+ dépendantes puissent jouer un rôle important dans la régulation des flux ioniques.

En effet, en pollinisation compatible, l'activité enzymatique augmente avec la progression du tube pollinique dans le pistil. Quand l'extrémité du tube pollinique est encore localisée dans le stigmate, l'activité des ATPases est maximale, puis au fur et à mesure que le tube croît dans le style, l'activité enzymatique évaluée au niveau du stigmate diminue alors que celle qui est enregistrée dans le style ne fait qu'augmenter.

En croisement incompatible, le tube pollinique traverse le stigmate et sa croissance est bloquée peu après son arrivée dans le style. Les ATPases ne sont, dans ce cas, actives que 2 heures avec

un maximum d'activité après 1 heure de pollinisation.

B - COMPOSITION EN ACIDES GRAS ET REGULATION DE L'ACTIVITE

ENZYMATIQUE

L'altération de l'activité des enzymes liés aux membranes, et c'est le cas des ATPases, résulte des perturbations dans la distribution des acides gras. Un nombre considérable de travaux tendent à montrer que les acides gras libres ou intégrés aux membranes sont des modulateurs puissants des fonctions membranaires (FARIAS et coll. -73-, SCHMALZING et coll. -267-, KATZ et coll. -137-, BOLDYREV -21-, CHEAH -45-). Ce contrôle des fonctions membranaires par les acides gras se fait par :

- une action viscotropique sur la fluidité essentielle à "la translocation" des ions Na^+ et K^+ au travers de la membrane,
- et une régulation directe. Les acides gras sont activateurs ou inhibiteurs d'enzymes liés aux membranes.

La régulation des ATPases par les acides gras est très intéressante. Ainsi à basse température (10° C) l'acide oléique (C18 : 1) stimule ces enzymes et les inhibe à 37°C (SCHMALZING et coll. -267-).

Ces résultats indiquent que les perturbations membranaires facilitent les changements conformationnels des ATPases.

Lorsque ces perturbations deviennent trop importantes les contraintes latérales qu'exercent normalement les lipides sur les protéines intégrées sont inefficaces et l'enzyme n'est plus maintenu dans une configuration active.

Pour *Oenothera* comme pour *Petunia*, la xénopollinisation s'accompagne d'un accroissement de la perméabilité membranaire via une augmentation de l'intégration des acides oléique et linoléique

(C18 : 1, C18 : 2). Les ATPases Na^+ et K^+ dépendantes sont activées, le transport actif est maximal.

L'autopollinisation s'accompagne d'une rigidité structurale de la membrane, d'une faible intégration des acides oléique et linoléique dans les lipides membranaires, d'une déviation faible ou nulle des ATPases. Le transport actif des ions est faible sinon nul.

C - (Na^+ + K^+) ATPases ET TURN-OVER LIPIDIQUE

De plus, lorsque le taux de K^+ diminue à l'intérieur des cellules, il s'en suit une accumulation de phospholipides et de sulfolipides (STUIVER et coll. -290-).

Après un croisement incompatible les ATPases n'assurent pas le transport actif du K^+ vers le compartiment intracellulaire. De plus, l'analyse des sulfolipides d'*Oenothera missouriensis* a permis de mettre en évidence, après 15 heures d'autopollinisation, un accroissement net de ces lipides dans les styles (DELBART et coll. -59-), en relation semble-t-il avec l'installation d'un processus de diffusion passive des ions.

IV - CONCLUSION

Ainsi, au terme de cette analyse, il a été possible de mettre en évidence des différences d'intensité dans le transport actif en fonction de la pollinisation.

Ces résultats coïncident particulièrement avec ceux de l'analyse des lipides. Les ATPases impliquées dans ce transport actif sont régulées par la fluidité membranaire et par les acides gras constitutifs des glycolipides.

Un désordre dans l'architecture membranaire causé par la réaction d'autoincompatibilité inhibe ces enzymes ; leur dysfonctionnement entraîne en retour une accumulation des sulfolipides.

CHAPITRE VI

ANALYSES DES GLYCEROLIPIDES

I - INTRODUCTION

De nombreuses fonctions cellulaires, comme les processus de transport, les transferts d'énergie ou la transmission de signaux dépendent de :

- l'architecture moléculaire des membranes biologiques,
- l'orientation vectorielle des constituants membranaires --
(distribution asymétrique dans le plan latéral et transversal).

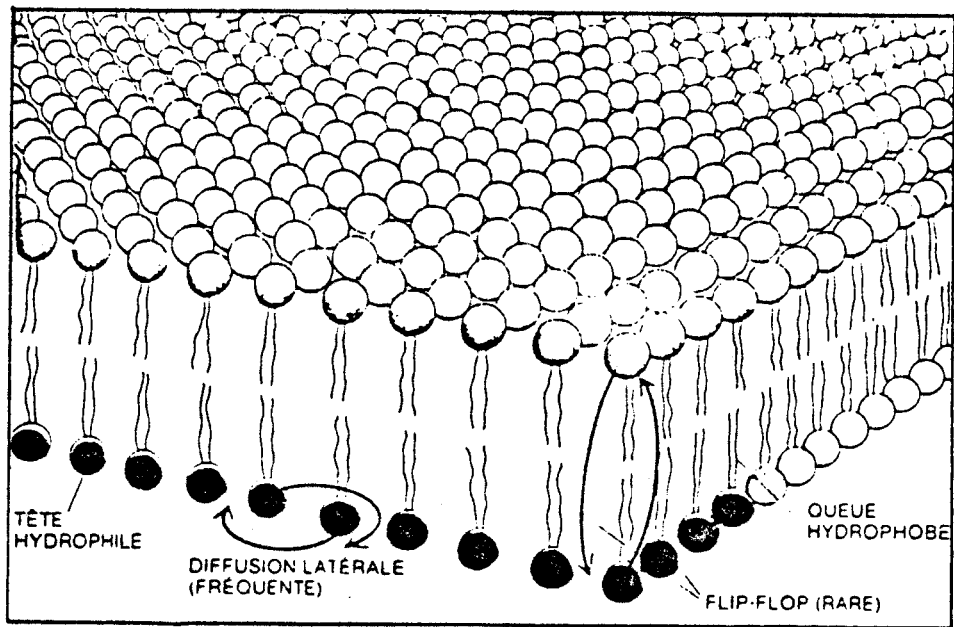
En effet, la membrane qui entoure une cellule vivante est plus qu'une simple enveloppe ou qu'une frontière. Non seulement elle définit les limites de la cellule, mais elle contribue également à maintenir une différence entre le milieu intérieur de la cellule et l'extérieur. Nous en voulons pour exemple le transport actif des ions.

Pour créer et maintenir certains gradients de concentration en ions, il est absolument nécessaire que la membrane délimite un espace clos, sinon toute substance absorbée à travers la membrane ressortirait immédiatement. De plus, les surfaces interne et externe d'une membrane doivent se comporter différemment. Sinon un ion ou molécules absorbés en un point pourraient être expulsés en un autre point, avec à chaque passage une dépense en énergie. Les propriétés fondamentales des membranes résultent de leur asymétrie fonctionnelle qui reflète leur asymétrie structurale sous-jacente.

Comme nous l'avons déjà vu, les protéines intégrées ou associées aux membranes possèdent une orientation déterminée ; les molécules de phospholipides, plus petites, qui participent à l'élaboration de la matrice de la membrane possèdent aussi une distribution asymétrique

FIGURE 33

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MOUVEMENTS DES PHOSPHOLIPIDES
DANS LA MATRICE MEMBRANAIRE



(VAN DEENEN et coll. -299-, KREBS -154-) illustrée par la figure n° 33. Elles conditionnent l'asymétrie des autres composants membranaires.

En réalité c'est l'ensemble des lipides qui confère à la membrane sa structure car chaque molécule lipidique est amphipathique. Aussi les deux parties d'un lipide membranaire ayant des solubilités différentes, les molécules lipidiques s'arrangent spontanément en un double feuillet fait de deux couches de molécules. De cette manière la partie hydrophobe de chaque molécule est protégée du milieu aqueux tandis que les têtes hydrophiles y sont immergées.

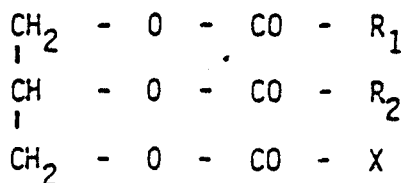
Dans toutes les membranes, les lipides ont la même organisation : deux surfaces hydrophiles que sépare une zone centrale hydrophobe. De plus ce feuillet bimoléculaire n'est pas statique. Au contraire, chaque couche monomoléculaire constitue un fluide à deux dimensions. Les molécules lipidiques peuvent s'y déplacer latéralement dans un mince film liquide. Elles échangent leurs positions environ un million de fois par seconde. Par contre, dans la troisième dimension, la mobilité des lipides est très restreinte. Pour qu'une molécule lipidique passe d'une couche à l'autre (mouvement lent appelé flip-flop) la tête polaire doit franchir la zone centrale hydrophobe de la membrane dans laquelle elle est insoluble. Des mesures récentes indiquent que le taux de flip-flop est si faible qu'une molécule donnée ne traverse cette barrière qu'une fois par mois au maximum.

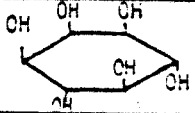
Cette structure bimoléculaire permet ainsi à la membrane d'assurer une de ses fonctions essentielles : être imperméable à la plupart des molécules solubles dans l'eau. En effet, ces solutés deviennent insolubles dans la partie lipidique centrale.

La perméabilité membranaire s'est avérée être un processus hautement contrôlé et sélectif où les lipides représentent des

TABLEAU 17

LOCALISATION DES PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES



X	Nom	Abréviation	Localisation ou fonction
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
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	Phosphatidyléthanolamine ou céphaline	PE	constituant des membranes plasmiques non chloroplasmiques membranes bactériennes
$-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$	Phosphatidylsérine	PS	intermédiaire métabolique (peu abondant)
$-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{OH}$	Phosphatidylglycérol	PG	chloroplaste
$ \begin{array}{c} -\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\text{CH}}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \text{HO}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \text{O} \\ \text{R}_4-\text{CO}-\text{O}-\underset{\text{O}-\text{CO}-\text{R}_3}{\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\text{CH}}-\text{CH}_2} \end{array} $	Diphosphatidylglycérol (cardiolipide)	PGP	membrane interne de la mitochondrie
	Phosphatidylinositol	PI	membrane plasmique

molécules physiologiquement très actives.

Comme l'autoincompatibilité de fécondation est associée à des troubles de perméabilité du moins dans l' AIS, la nécessité d'aborder l'étude des glycérolipides a donc été retenue.

II - RESULTATS

Dans le but de mieux définir la structure membranaire des organes reproducteurs végétaux, nous avons donc entrepris l'analyse succincte des glycérolipides (tableau n° 17) chez *Petunia hybrida* et *Oenothera missouriensis*.

Ces lipides ont donc été extraits des tissus selon le protocole décrit fiche T24 tout en respectant quelques précautions particulières lors de l'extraction des lipides végétaux. En effet, la plupart des végétaux contiennent des enzymes lipolytiques qui sont libérés au cours du broyage cellulaire (phospholipase D et certaines acylhydrolases) et dont l'activité peut être accentuée par l'utilisation de solvants organiques au cours de l'extraction des lipides. Cependant, ces enzymes sont inactifs à faible température. Il convient donc d'effectuer les homogénéisations à + 4°C.

Sur ces extraits lipidiques provenant de pollen, stigmates et styles vierges auto- et xénopollinisés et pour des pollinisations de durée variable, nous avons réalisé :

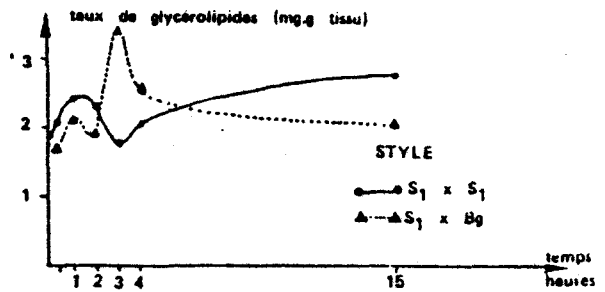
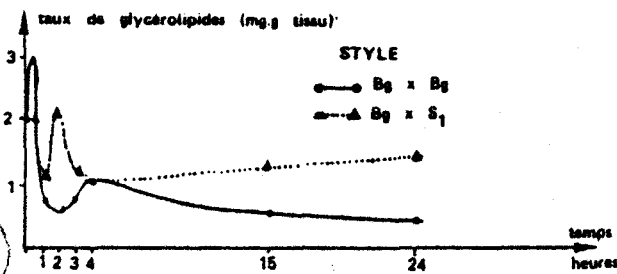
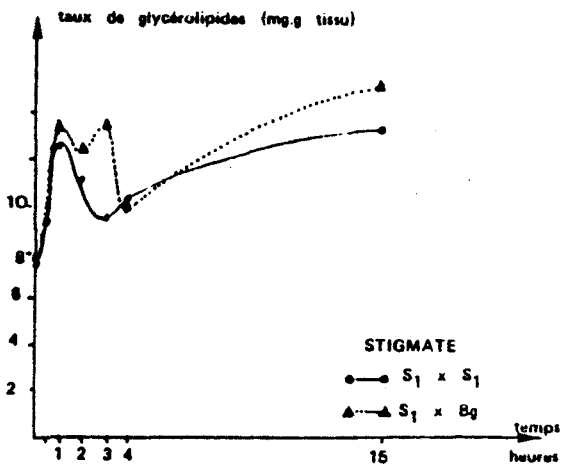
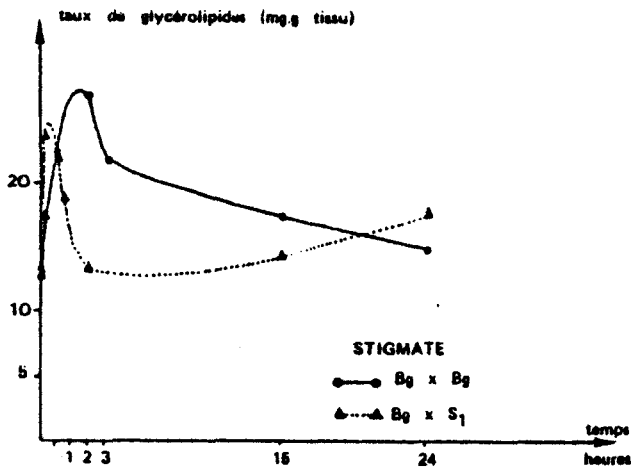
- le dosage des glycérolipides en général (fiche technique T26),
- le dosage des phospholipides (fiche technique T25).

Ce sont ces résultats que nous allons présenter.

EVOLUTION DES GLYCEROLIPIDES AVEC LA POLLINISATION
CHEZ OENOTHERA MISSOURIENSIS

Temps	AUTOPOLLINISATION $B_g \times B_g$		XENOPOLLINISATION $B_g \times S_1$		AUTOPOLLINISATION $S_1 \times S_1$		XENOPOLLINISATION $S_1 \times B_g$	
	Stigmate	Style	Stigmate	Style	Stigmate	Style	Stigmate	Style
0	13,14	2,00	13,14	2,00	7,27	1,98	7,27	1,98
30 min.	17,52	3,00	23,62	2,00	9,17	2,02	9,43	1,77
1 h	22,36	0,71	15,88	1,15	12,49	2,46	13,23	2,05
2 h	15,04	0,64	18,77	2,10	11,03	2,38	12,17	1,99
3 h	27,03	0,81	13,60	1,26	9,46	1,87	13,48	3,41
4 h	22,61	1,01	-	1,02	10,26	2,02	10,06	2,55
15 h	17,18	0,62	14,25	1,27	13,13	2,72	15,22	2,06
24 h	15,12	0,36	18,40	1,36	-	-	-	-

Exprimé en mg de tripalmitine/g tissu frais.



RHS
LILLE

A - EVOLUTION DES GLYCEROLIPIDES

Comme nous avons pu réaliser une étude cinétique relativement complète de l'évolution de ces lipides en fonction de la pollinisation chez *Oenothera missouriensis*, nous présenterons d'abord ces résultats avant d'exposer ceux obtenus chez *Petunia hybrida*.

a) Les glycérolipides d'*Oenothera missouriensis*

Les résultats n'ayant pas été publiés sont reportés tableau n° 18.

Dans les stigmates, l'évolution du taux des glycérolipides avec la pollinisation est biphasique. Après, une accumulation de ces lipides, nous assistons dans un second temps à un retour relatif à la ligne de base (0 heure).

Cette évolution est enregistrée en auto comme en xéнопollinisation bien que les pollinisations compatibles et incompatibles diffèrent entre elles par :

- l'ampleur des perturbations (plus marquées en autopollinisation),
- le délai nécessaire à cette accumulation : 1 heure (xéнопollinisation), 3 heures (autopollinisation),
- le temps nécessaire pour retrouver les valeurs de départ (respectivement 4 et 24 heures pour la xéno et l'autopollinisation).

Nous avons également réalisé cette étude sur les styles. Nous constatons que les valeurs trouvées sont en général beaucoup plus faibles que précédemment.

La pollinisation s'accompagne également de perturbations au niveau des glycérolipides stylaires. Ainsi après autopollinisation, on assiste à une brève augmentation de ces lipides, puis *grosso modo*, à une stabilisation pour des valeurs très basses. En xéнопollinisation, le schéma général est celui d'une diminution du taux des glycérolipides après un léger pic d'incorporation après 2 heures de pollinisation.

A EVOLUTION DES GLYCEROLIPIDES AVEC LA POLLINISATION CHEZ PETUNIA HYBRIDA

POLLINISATION	TEMPS	STIGMATES	STYLES
$S_3S_3 \times S_3S_3$	0 h	54,80	35,50
	1 h	33,19	14,63
	4 h	33,74	13,69
	8 h	36,70	10,14
$S_3S_3 \times S_1S_2$	0 h	54,80	35,50
	1 h	34,46	15,77
	4 h	36,93	13,18
	8 h	39,86	12,07
$S_1S_2 \times S_1S_2$	1 h	33,52	9,88
	4 h	35,46	12,16
	8 h	28,50	11,94
$S_1S_2 \times S_3S_3$	1 h	40,59	15,39
	4 h	35,54	16,28
	8 h	35,23	14,40

les résultats sont exprimés en mg de tripalmitine par g de tissu lyophilisé et représentent la moyenne de 8 valeurs obtenues pour 4 extractions.

B EVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES AVEC LA POLLINISATION CHEZ PETUNIA HYBRIDA

POLLINISATION	TEMPS	STIGMATES	STYLES
$S_3S_3 \times S_3S_3$	0 h	9,10	11,83
	1 h	12,65	15,92
	4 h	12,92	15,01
	8 h	11,01	15,50
$S_3S_3 \times S_1S_2$	0 h	9,10	11,83
	1 h	14,17	18,60
	4 h	9,54	13,71
	8 h	6,25	14,65
$S_1S_2 \times S_1S_2$	1 h	10,85	13,01
	4 h	9,27	14,09
	8 h	5,89	18,08
$S_1S_2 \times S_3S_3$	1 h	9,45	11,73
	4 h	10,83	18,94
	8 h	8,79	22,25

les résultats sont exprimés en mg de phospholipides/g de tissu lyophilisé et représentent la moyenne de 8 valeurs obtenues pour 4 extractions.



b) Les glycérolipides de *Petunia hybrida*

Les résultats obtenus pour *Petunia hybrida* sont reportés tableau 19a. Les mêmes schémas, moins précis sont retrouvés. La pollinisation, quel que soit le génotype de la plante, s'accompagne d'une perte en glycérolipides par rapport aux styles vierges. Seule l'amplitude des variations oppose xéno et autopollinisation.

B - EVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES

a) Les phospholipides à *Oenothera missouriensis*

Les résultats exprimés en mg/g de tissu frais sont reportés dans le tableau n° 20 présenté page suivante.

Au niveau des stigmates, la pollinisation compatible s'accompagne d'une baisse du taux des phospholipides, très brusque entre 0 et 4 heures, plus stagnante ensuite. L'autopollinisation modifie peu ou pas le taux de ces lipides.

Au niveau des styles, la pollinisation perturbe également la distribution des lipides : après une brutale chute, le taux des phospholipides réaugmente puis amorce une lente régression. La réponse induite par l'autopollinisation s'installe plus lentement mais les pertes en phospholipides sont plus marquées.

b) Les phospholipides de *Petunia hybrida*

Les résultats obtenus chez *Petunia hybrida* exprimés en mg/g de tissu lyophilisé sont reporté tableau n° 19b.

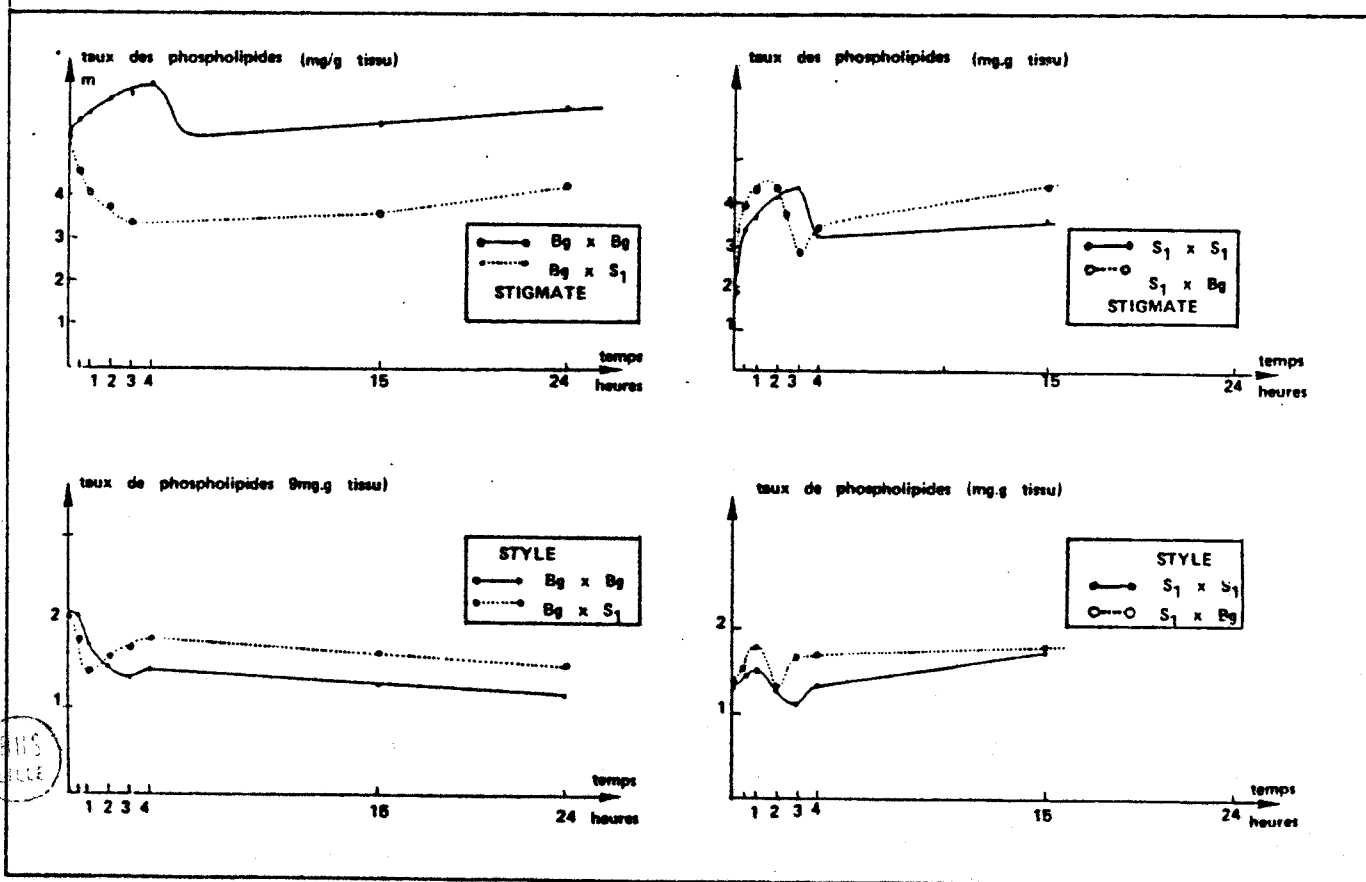
Ils semblent différer des précédents selon le mode de pollinisation. Ainsi au niveau des stigmates comme au niveau des styles, on assiste à une brusque augmentation du taux des phospholipides après une heure de pollinisation. Cette augmentation est nettement plus faible en autopollinisation.

TABLEAU 20

EVOLUTION DES PHOSPHOLIPIDES AVEC LA POLLINISATION
CHEZ OENOTHERA MISSOURIENSIS

Temps	AUTOPOLLINISATION $B_g \times B_g$		XENOPOLLINISATION $B_g \times S_1$		AUTOPOLLINISATION $S_1 \times S_1$		XENOPOLLINISATION $S_1 \times B_g$	
	Stigmate	Style	Stigmate	Style	Stigmate	Style	Stigmate	Style
0	5,55	2,08	5,55	2,08	1,76	1,36	1,76	1,36
30 min.	5,75	2,03	4,54	1,77	3,32	1,39	3,87	1,41
1 h	5,88	1,72	4,07	1,42	3,65	1,51	4,31	1,75
2 h	6,22	1,52	3,72	1,58	4,13	1,28	4,34	1,30
3 h	5,39	1,34	3,35	1,73	4,34	1,12	2,71	1,65
4 h	-	1,45	-	1,82	3,12	1,32	3,37	1,67
15 h	5,76	1,30	3,65	1,65	3,56	1,71	4,35	1,75
24 h	6,16	1,20	4,35	1,53	-	-	-	-

Exprimé en mg/g de tissu.



La réaction incompatible s'accompagne ensuite d'une stabilisation des taux de phospholipides, ce qui n'est absolument pas le cas après xénopollinisation. Diverses modalités d'évolution sont ressenties en fonction du génotype de la plante.

C) EVOLUTION DU RAPPORT PL/GCL (*)

Nous avons analysé l'évolution de ce rapport PL/GCL afin de mieux mettre en évidence les mobilisations respectives de ces deux types de molécules.

a) Evolution du rapport PL/GCL chez *Oenothera*

Les résultats sont reportés figure n° 34 (page suivante).

Au niveau des stigmates la pollinisation (compatible ou non) provoque une accumulation préférentielle des GCL au détriment des phospholipides. Seul le délai pour atteindre le minimum d'intégration des phospholipides varie (respectivement 2 et 4 pour la xéno et l'auto-pollinisation). Ensuite, la pollinisation incompatible induit un retour vers la valeur de départ, tandis qu'en xénopollinisation l'incorporation des phospholipides reste toujours faible.

Au niveau des styles, la pollinisation (auto et xéno) provoque une évolution similaire du rapport PL/GCL, du moins pour les trois premières heures. Pendant cette période, les PL sont énormément, puis beaucoup moins, incorporés. Après 4 heures, les deux pollinisations diffèrent, la xénopollinisation maintenant une incorporation moins

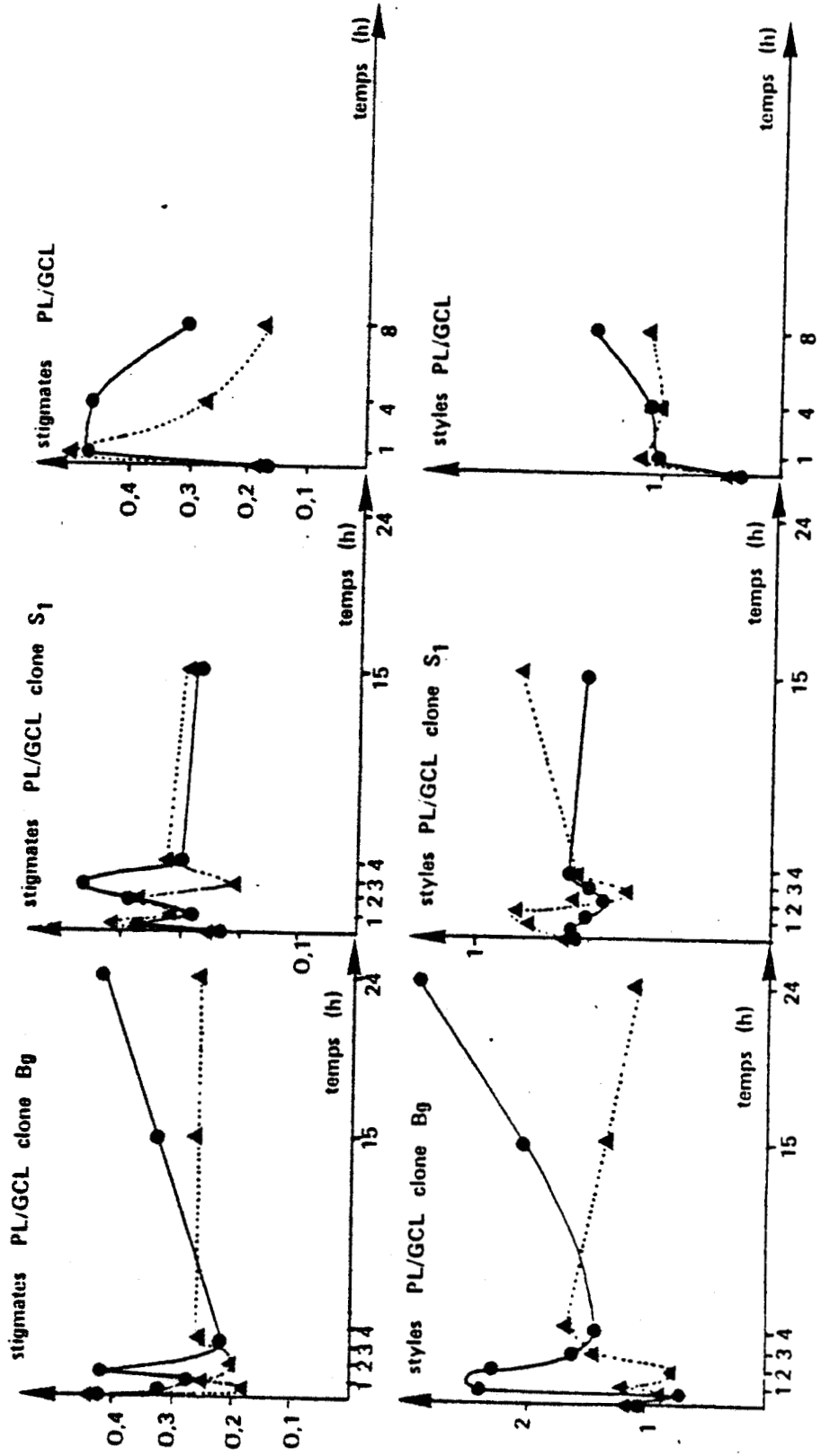
(*) PL phospholipides

GCL glycérolipides

FIGURE 34

EVOLUTION DU RAPPORT PL/GCL EN FONCTION DE LA POLLINISATION

OENOTHERA MISSOURIENSIS



prononcée des PL.

Un fait curieux doit également être souligné : c'est l'opposition entre les valeurs obtenues dans le stigmate et le style (respectivement 0,42 et 1,04). Le tube pollinique traverse deux types de tissus très différents l'un de l'autre.

b) Evolution du PL/GCL chez *Petunia*

L'opposition entre style et stigmate se retrouve également chez *Petunia* (0,33 et 0,17 respectivement).

Pour illustrer l'évolution de ce rapport PL/GCL nous avons reporté figure n° 34 les valeurs obtenues pour le clone T₂U.

Au niveau des styles, l'évolution du rapport PL/GCL traduit comme chez *Oenothera* le même phénomène. Après une légère augmentation de l'intégration des PL, on retrouve encore la même évolution : moins de phospholipides, plus de glycérolipides.

Il convient également de moduler cette conclusion, l'évolution du rapport PL/GCL diffère en fonction du clone.

III - INTERPRETATION

Il semble très difficile de résumer l'évolution des glycéro-et phospholipides, la meilleure schématisation est donnée par l'analyse de l'évolution du rapport PL/GCL mettant en évidence une diminution globale du taux de phospholipides au profit des glycérolipides.

Les deux plantes réagissent à la pollinisation de façon similaire sauf pendant la première heure. En effet, le rapport PL/GCL est exactement inversé. Ensuite au fur et à mesure de la croissance du tube pollinique, ce rapport subit les mêmes perturbations. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par CARON -39-, qui avait constaté

chez *Oenothera*, un effondrement très net surtout après xénopollinisation des taux de phospholipides. Il se pose donc le problème de la signification d'une perturbation aussi importante, qui de plus semble être en contradiction avec la nécessité d'une croissance rapide du tube pollinique. En effet, on s'attendrait plutôt à retrouver des lipides membranaires très augmentés témoignant ainsi de l'efficacité des systèmes d'élongation du tube pollinique.

Il se pourrait que le formidable appel d'eau vers les tissus des organes reproducteurs, puisse provoquer une dilution artificielle de nos lipides, masquant ainsi leur éventuelle évolution. Cela ne s'appliquerait qu'aux *Oenothères*. En effet, les stigmates et les styles de *Petunia* sont lyophilisés.

Des défauts de synthèse ou de transfert par l'intermédiaire des protéines transporteuses de PL (MOORE -204-) pourraient également être invoqués mais ne conviendraient pas à tous les résultats obtenus avec *Petunia hybrida* (clône W166K). Cependant, les études réalisées avec ce matériel ne couvrent pas une période suffisamment longue pour être réellement significatives.

Si l'effondrement des PL est un phénomène caractéristique de la pollinisation, quelles répercussions a-t-il au niveau de la réaction d'incompatibilité ?

Les phospholipides interviennent tout particulièrement dans les systèmes de transfert d'électrons des chaînes respiratoires, ainsi que dans les phénomènes de perméabilité membranaire.

A - RELATION AVEC LES CHAINES DE TRANSPORT D'ELECTRONS

Les systèmes enzymatiques de la chaîne respiratoire dépendent de la présence de phospholipides membranaires. Dans les chaînes de

transport d'électrons les phospholipides interviennent à trois niveaux :

- ils permettent l'interaction entre le cytochrome C et son oxydase,

- ils maintiennent l'enzyme dans une configuration spatiale compatible avec l'activité catalytique,

- de plus, la présence de diphosphatidylglycérol est indispensable au maintien de l'activité enzymatique.

Des résultats analogues ont été trouvés pour le système NADH-réductase. Il semble que les phospholipides jouent un rôle vital dans les phosphorylations oxydatives, que ce soit au niveau des mitochondries, des microsomes ou du reticulum endoplasmique (JOLLIOT-MAZLIAK -128-, JONES-WAKIL -130-).

Or les styles autopollinisés consomment plus d'oxygène que les styles xénopollinisés ou vierges (BRIS-LORCH -31-). Existe-t-il une relation directe entre ces deux phénomènes ?

B - ROLE DANS LES REACTIONS DE TRANSPORT MEMBRANAIRE

Il existe une littérature extensive sur le rôle des phospholipides dans les réactions de transports membranaires. Les propriétés de perméabilité des systèmes membranaires sont en relation avec leur composition en phospholipides. Ainsi la perméabilité des membranes érythrocytaires aux substances ioniques et non ioniques est en relation étroite avec le rapport lécithine/sphingomyéline. Les lécithines contiennent généralement une proportion plus élevée d'acides gras insaturés que les sphingomyélines. Or le degré de saturation des phospholipides membranaires conditionne l'optimisation de la perméabilité.

De plus, les phospholipides sont considérés comme les cofacteurs, au même titre que les sulfolipides, des ATPases responsables du

transfert actif des ions au travers de la membrane, et en particulier des ATPases Ca^{2+} dépendantes (SCHMALZING et coll. -267-).

De plus, le couplage fonctionnel entre PL et phospholipase permet la modulation de l'activité enzymatique des ATPases. En effet, l'activation des phospholipases secondaire à une entrée accrue de Ca^{2+} peut causer une augmentation transitoire de la concentration en acides gras libres. Or une telle augmentation à proximité de la (Ca^{2+}) ATPases doit contribuer à terminer le signal Ca^{2+} par amplification des entrées de ces ions (SCHMALZING et coll. -267-).

Il se pourrait donc que les phospholipides puissent contrôler les entrées et les sorties de Ca^{2+} si importantes dans la régulation de la croissance du tube pollinique.

CHAPITRE VII

ANALYSE DES GSL ACIDES COMPLEXES

I - INTRODUCTION

Le but de cette étude était de mettre en évidence des GSL plus complexes que les précédents pouvant jouer le rôle de marqueurs de surface.

Nous avons donc modifié notre étape d'extraction. Après chromatographie en couche mince, il a été possible de mettre en évidence un GSL très curieux.

Ce sont les résultats de cette analyse que nous rapportons.

II - MISE EN EVIDENCE D'UN GLYCOLIPIDE ACIDE TRES COMPLEXE

A - MISE EN EVIDENCE D'UN GLYCOLIPIDE RESORCINOL-POSITIF

Notre précédente technique d'extraction des GSL neutres (fiche T2) comportait une étape de déphasage au cours de laquelle les GSL très polaires passaient dans la phase aqueuse.

Nous avons donc été amenés à modifier le protocole en supprimant l'étape de déphasage.

Pour cette étude, les GSL sont extraits des tissus (pollen ou pistil) selon la technique préconisée par IRWIN et IRWIN -126- pour l'extraction des gangliosides (Fiche T18).

L'extrait lipidique ainsi obtenu a été déposé sur une plaque de gel de silice. La migration s'est déroulée dans le solvant classique des glycolipides (chloroforme/méthanol/eau - 65/25/4 - v/v/v). Les chromatogrammes ont été révélés par divers réactifs révélant les glycolipides (Fiche T5). Après pulvérisation du réactif résorcinol/HCl spécifique des acides sialiques, une énorme tache pourpre-violacée

PROCOLE DE PURIFICATION DES GANGLIOSIDES SELON IRWIN

STIGMATES OU STYLES

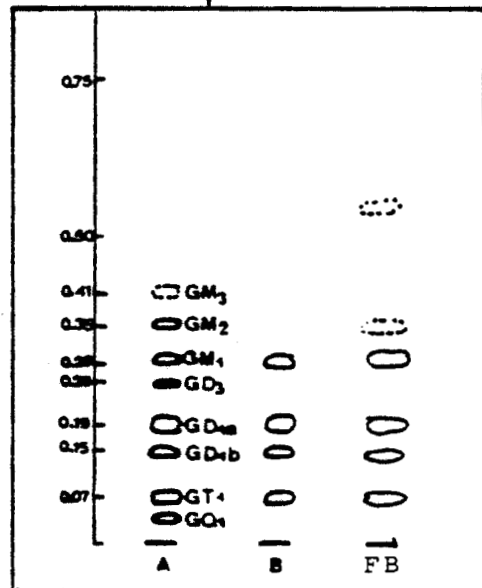
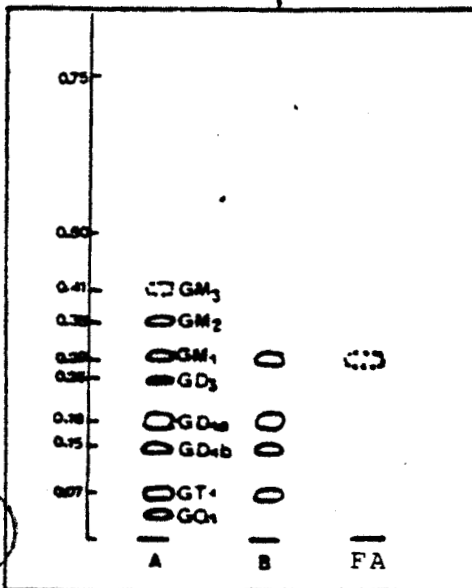
HOMOGENEISATION
CHLOROFORME- METHANOL
10 mn 60°C

CHROMATOGRAPHIE
SUR
ACIDE SILICIQUE

A CHLOROFORME 65
METHANOL 25
EAU 4

B CHLOROFORME 50
METHANOL 50
EAU 15

HPTLC
SYSTEME HARTH et coll.



A et B : témoins de gangliosides
FA : Fraction A
FB : Fraction B

BUS
LILLE

est apparue. Jusqu'à présent, l'existence d'acide sialique dans les glycolipides végétaux n'a jamais été démontrée (SCHAUER -264-). Aussi cette tache nous a-t-elle intriguée.

Une identification des glycolipides par chromatographie en couche mince dans le solvant spécifique des gangliosides décrit par HARTH et coll. -106) a été tentée. L'extrait co-migre avec les témoins de gangliosides animaux GM_1 (●), GD_{1a} (●) et GT (●). Cette identité entre les Rf des gangliosides témoins et ceux de nos extraits a été vérifiée dans plusieurs autres systèmes solvants décrits fiche technique T19. A chaque fois ces lipides se sont révélés avoir le même comportement chromatographique que celui des gangliosides témoins.

Nous avons donc appliqué le protocole d'IRWIN et IRWIN -126- et soumis les extraits à une étape de purification par chromatographie d'absorption sur acide silicique (Fiche technique T20). Normalement cette étape permet de purifier les gangliosides.

Nous avons donc soumis un mélange témoin de gangliosides et divers extraits de pollen, de stigmate ou de style à cette étape de purification. Les fractions F2 ont été recueillies et analysées par chromatographie en couche mince dans le système de HARTH et coll. ou de ZANETTA et coll. (Fiche T19), sur plaque à HPTLC.

Les mêmes résultats ont été obtenus : c'est-à-dire, identité de comportement entre nos extraits et les témoins de gangliosides. Les résultats sont reportés figure n° 35.

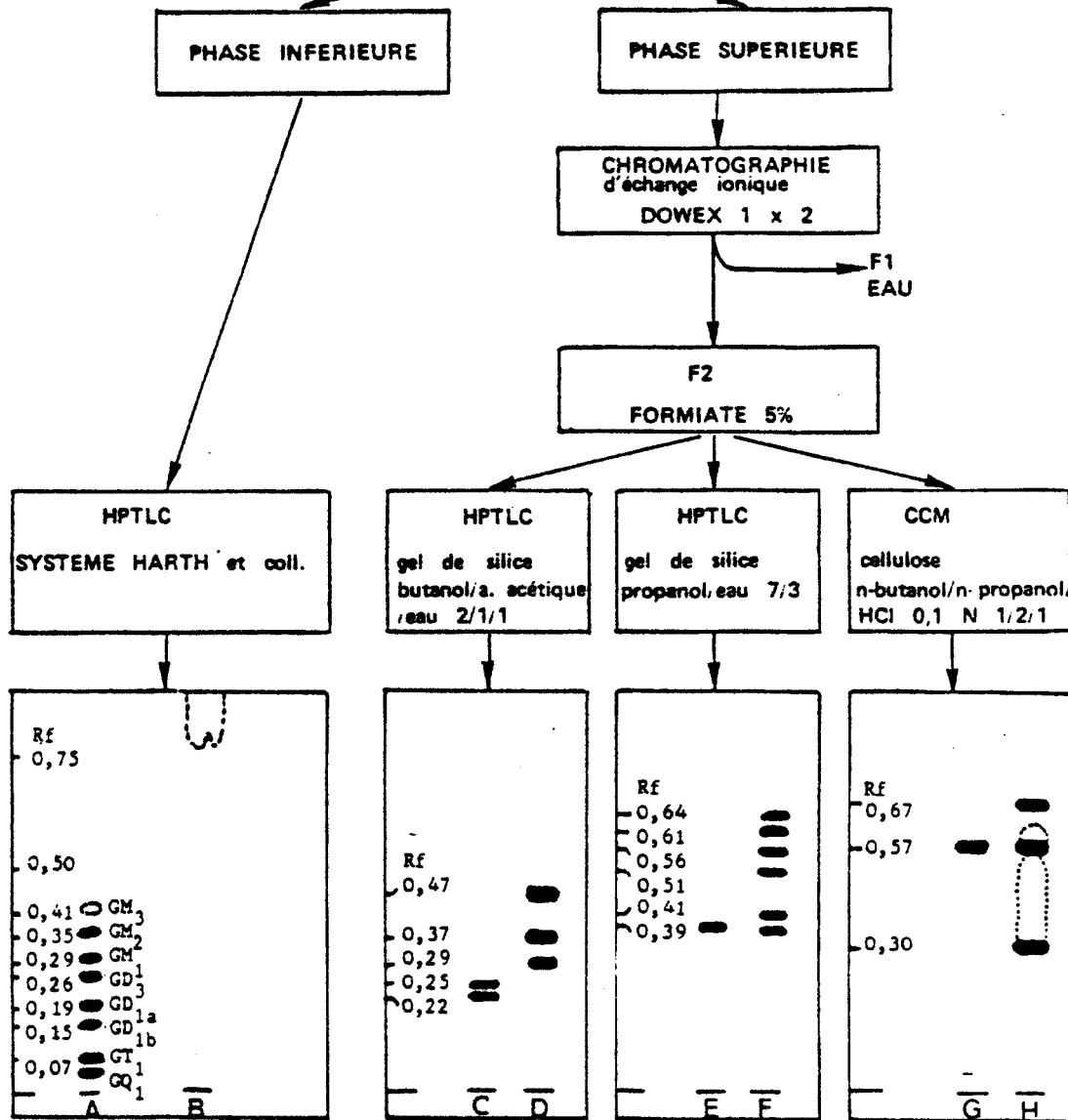
(●) GM_1 = monosialoganglioside

GD_{1a} = disialoganglioside

GT = trisialoganglioside

EXTRAIT SEC
 HYDROLYSE
 H_2SO_4 0,1 N 60 mn 80°C

déphasage



A : TEMOIN GANGLIOSIDES
 B : PHASE INFÉRIEURE
 C, E, G : TEMOIN ACIDE SIALIQUE
 D, F, H : F2 de DOWEX



B - ESSAIS DE CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES

Le comportement très curieux de nos extraits en chromatographie, les analogies avec le comportement des gangliosides témoins nous ont bien malgré nous, conduit vers un essai de caractérisation des acides sialiques chez les plantes.

a) Hydrolyse acide des extraits

Les lipides de la fraction F2, encore contaminés par des pigments chlorophylliens, ont été soumis à une hydrolyse acide douce par H_2SO_4 0,1 N pendant 1 heure à 80°C, fiche technique T21.

Dans ces conditions (SCHAUER -264-) les acides sialiques sont libérés de leurs glycoconjugués : 20% seulement des acides sialiques sont détruits au cours de cette hydrolyse, par contre ils sont tous O-déacylés.

Après déphasage obtenu par addition de chloroforme et de méthanol, des parties aliquotes des phases inférieures et supérieures ont été déposées et analysées sur plaque d'HPTLC dans les conditions précédemment décrites (Fiche T19)(figure n° 36).

La révélation des chromatogrammes par pulvérisation d'un réactif résorcinol/HCl est négative. Par contre, il apparaît dans la phase inférieure des glycolipides orcinol positifs migrant dans la zone des GSL neutres.

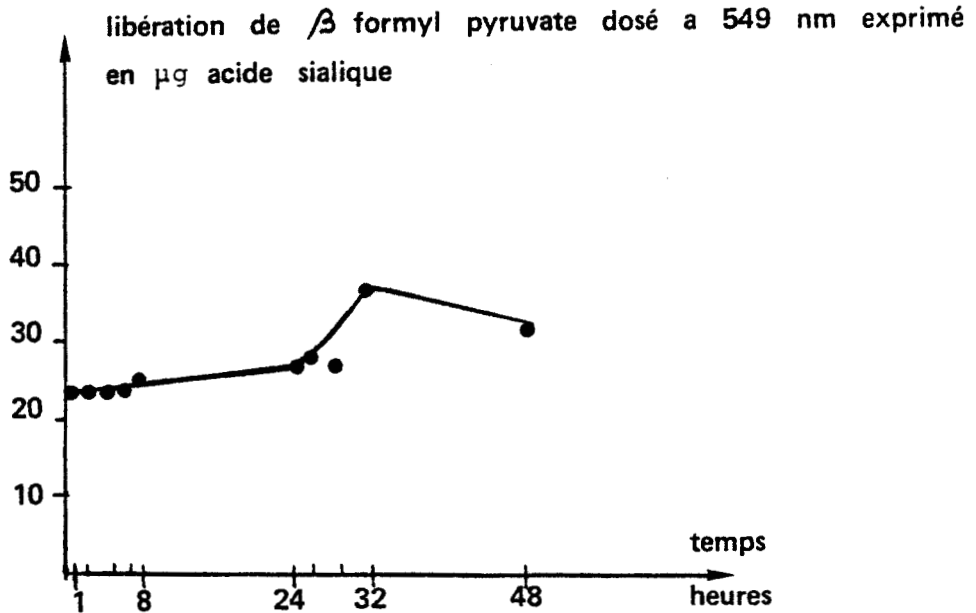
La phase supérieure aqueuse a été purifiée par chromatographie d'échange ionique sur DOWEX 1 x 2 (fiche T21),(figure n° 36).

Normalement, les acides sialiques sont élués au niveau de la fraction 2 par le formiate à 5%.

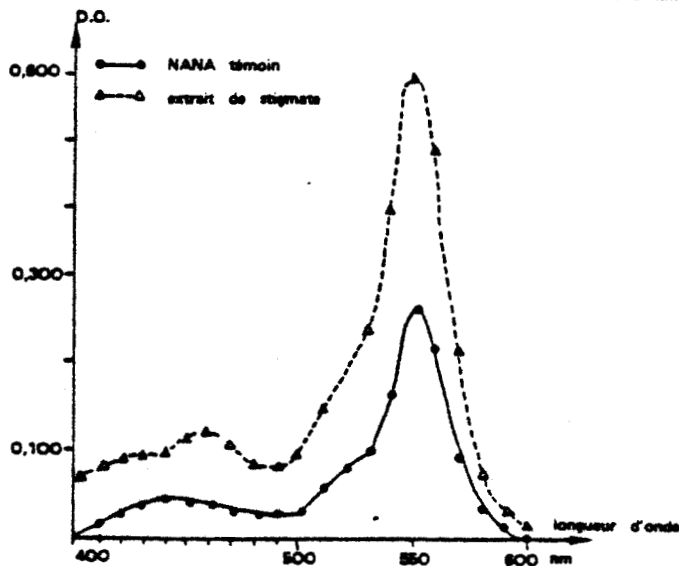
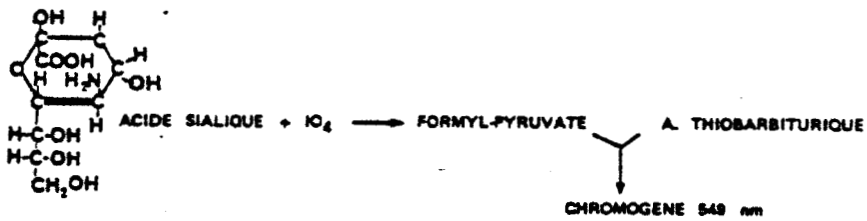
Cette fraction 2 a été analysée par ccm dans tous les systèmes solvants permettant la séparation et l'identification des

FIGURE 37

ACTION DE LA NEURAMINIDASE DE VIBRIO CHOLERAЕ SUR LES EXTRAITS DE STIGMATES OU DE STYLES



ETUDE SPECTRALE DU CHROMOGENE FORME LORS DU DOSAGE PAR LA METHODE DE WARREN



acides sialiques (Fiche T21).

Dans tous les cas, sauf un : (HPTLC sur silice et mélange solvant butanol/acide acétique/eau - 2/1/1), nos extraits contiennent après hydrolyse acide, un composé résorcinol positif co-migrant avec le témoin d'acide neuraminique. Cependant, une différence de coloration est enregistrée. Les témoins sont d'un bleu violacé caractéristique des acides sialiques, le composé libéré par hydrolyse acide donne avec le résorcinol/HCl une coloration plutôt plus pourpre.

b) Hydrolyse par la neuraminidase de *Vibrio cholerae*

Nos extraits, ainsi que des sialoconjugués témoins ont été incubés en présence de neuraminidase de *Vibrio cholerae*. Selon la nature du glycoconjugué et de l'acide sialique, la libération enzymatique de ce dernier peut se faire plus ou moins rapidement (30 min. à 24 heures).

Au bout de 8 heures, nos composés commencent à être sensibles à la neuraminidase. Une cinétique de libération de ces composés a été réalisée. Des parties aliquotes du milieu d'incubation sont prélevées et déphasées par addition de chloroforme et de méthanol. La phase aqueuse est purifiée sur Dowex 1 x 2. La fraction F2 éluée en formiate à 5% est dosée par la méthode de WARREN et chromatographiée en couche mince dans les solvants spécifiques des acides sialiques. La phase inférieure est analysée sur HPTLC dans les solvants caractéristiques des gangliosides. Les résultats sont reportés figure n° 37a.

et témoignent de :

- l'apparition progressive dans la phase aqueuse d'un composé ressemblant à de l'acide sialique,
- et de la disparition progressive dans la phase organique de composés ressemblant aux gangliosides.

c) Caractérisation des acides sialiques après réaction de WARREN

Normalement les acides sialiques libres après oxydation periodique réagissent avec l'acide thiobarbiturique pour donner un composé coloré rouge dont le maximum d'absorption est situé à 549 nm.

Cependant, tous composés capables de libérer après oxydation periodique un groupement β -formylpyruvique interfèrent dans ce dosage.

Afin de limiter les interférences dues au L-fucose, au 2- déoxyribose, aux acides 2-céto-3-déoxyaldoniques et aux acides gras désaturés (SCHAUER -264-), les composés libérés après hydrolyse acide doivent être purifiés par chromatographie sur DOWEX 1 x 2.

Nous présentons figure n° 37b le spectre d'absorption d'un acide sialique témoin (N.A.N.A. : acide N acétyl neuraminique) et celui du composé libéré par hydrolyse acide de nos extraits, après la réaction acide periodique-acide thiobarbiturique (Fiche T22). Une fois de plus, les courbes se superposent parfaitement. La D.O. à 532 nm est toujours très inférieure à celle obtenue à 549 nm. Ainsi nos extraits semi purifiés libèrent par hydrolyse acide un composé acide élué en formiate qui, après oxydation periodique, donne un β -formylpyruvate.

d) Analyse en spectre de masse du composé libéré

Aucun des précédents critères, bien qu'allant tous étrangement dans le même sens, ne peut assurer la caractérisation sans ambiguïté de la présence d'acide sialique dans nos extraits lipidiques.

Nous avons donc eu recours à une analyse par spectrométrie de masse.

Cette analyse dont les modalités opératoires sont reportées Fiche T23 a été réalisée en collaboration avec les équipes des

Professeurs FOURNET et STRECKER.

La détermination de la structure du composé libéré à partir des GSL acides s'est révélée difficile. En effet, les conditions standard d'analyse en spectrométrie de masse n'ont conduit qu'à l'identification d'un hexasitol pur. Il semble que l'ose libéré, soit instable pour les conditions opératoires utilisées. De plus, il ne s'agit pas d'un ose phosphorylé, car il a été impossible de mettre en évidence la moindre trace de phosphore.

Une seconde technique, faisant en outre appel à la triméthylsilation, est en cours de mise au point afin de caractériser sans ambiguïté, ce composé.

III - EVOLUTION DE CE GLYCOLIPIDE ACIDE AVEC LA POLLINISATION

Le dosage de ce glycolipide acide peut être réalisé par la méthode de WARREN puisque l'un des oses constitutifs donne après oxydation périodique le β -formylpyruvate capable de se condenser avec l'acide thiobarbiturique.

Aussi après hydrolyse acide ménagée des extraits, puis purification sur Dowex 1 x 2, nous avons dosé ces glycolipides par l'intermédiaire du β -formylpyruvate et de la réaction de WARREN (Fiches T18 à T22).

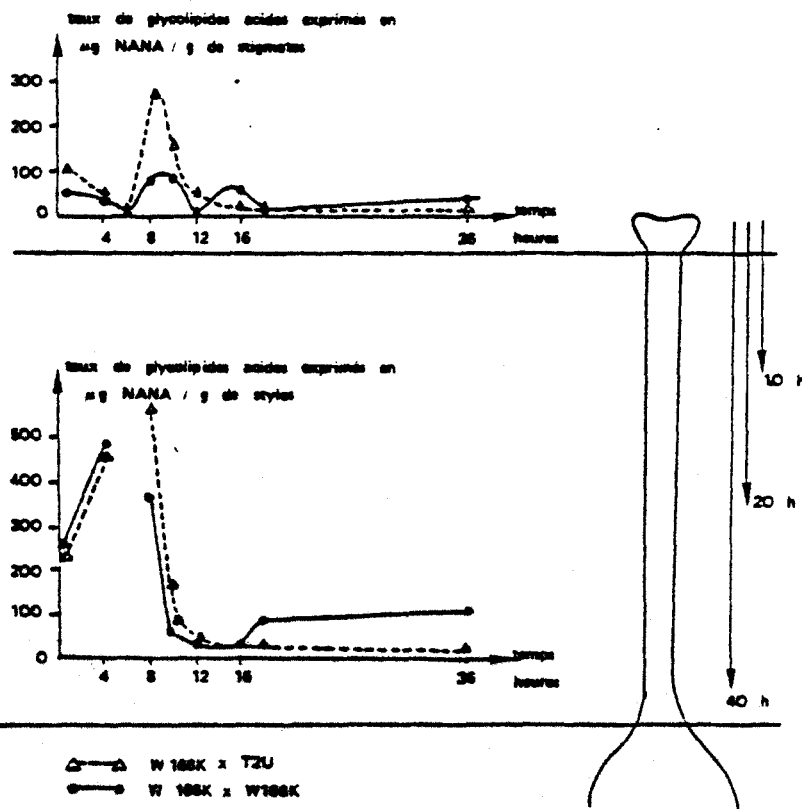
Les résultats reportés dans le tableau n° 21 sont exprimés en μ g d'acides sialiques par g de tissu. Nous avons analysé l'évolution de ces lipides dans les styles et les stigmates de fleurs vierges, auto ou xéнопollinisées pour une période de pollinisation allant de 0 à 36 heures.

ETAT DES GLYCOLIPIDES ACIDES COMPLEXES EN FONCTION DE LA POLLINISATION CHEZ PETUNIA

dosage par la méthode de WARREN après Dewax 1 x 2 (formiate)

	TEMPS	VIERGES	AUTOPOLLINISATION	XENOPOLLINISATION
		W166K	W166K x W166K	W166K x T2U
stigmates	1 h	-	54,24	108,94
	4 h	-	47,68	82,25
	6 h	13,06	13,96	20,10
	8 h	-	81,75	274,69
	10 h	-	98,01	144,36
	12 h	-	16,72	81,10
	14 h	-	-	-
	16 h	-	84,27	29,58
	18 h	-	14,64	23,08
	36 h	18,72	29,66	18,95
styles	1 h	-	264,67	251,47
	4 h	-	486,82	486,18
	6 h	23,18	29,10	37,34
	8 h	-	378,67	886,89
	10 h	-	78,64	78,15
	12 h	-	42,18	48,18
	14 h	-	-	-
	16 h	-	42,49	41,79
	18 h	-	86,33	36,08
	36 h	30,44	111,12	20,48

résultats exprimés en μ g d'acide N-acétylneuraminique par g de tissu sec



BUS
LILLE

A - RESULTATS

a) Evolution au niveau des stigmates

La répartition des glycolipides acides dans les stigmates vierges est relativement homogène. La xénopollinisation est caractérisée par l'apparition d'un pic important de GSL acides complexes pour la période 6 à 12 heures, le maximum se situant après 8 heures de croisement compatible.

Par contre, l'autopollinisation est caractérisée par l'apparition de deux petits pics dont les maximums sont situés vers 9 et 16 heures.

b) Evolution au niveau des styles

Ici encore la répartition dans les styles vierges est très homogène. Par contre la xénopollinisation est caractérisée par un énorme pic centré sur la période 7-8 heures suivi par un retour à un niveau de base très faible.

Le profil d'incorporation après autopollinisation est relativement semblable. Un énorme pic centré sur la période 7-8 heures est également mis en évidence. Cependant, une seconde vague d'incorporation débute vers 18 heures et persiste jusqu'à 36 heures.

Malheureusement, le manque d'information pour la période 18-36 h ne nous permet pas de conclure plus en détails.

B - INTERPRETATION

La pollinisation, qu'elle soit compatible ou non, est caractérisée par une incorporation massive de ces glycolipides acides dans les membranes.

TABLEAU 22

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE EN COUCHE MINCE D'EXTRAITS DE PISTILS

GANGLIOSIDES TEMOINS		EXTRAITS DE STYLES OU STIGMATES	
GANGLIOSIDE	Rf	Rf	Pic
GM ₃	0,400		
GM ₁	0,280	0,270	1
GD ₃	0,259	0,260	2
GD _{1a}	0,189	0,190	3
GD _{1b}	0,146	0,145	4
	0,103	0,107	5
GT ₁	0,077	0,075	6
GQ ₁	0,055		

HPTLC DANS LE SYSTEME DE HARTH ET COLL.



L'incorporation est légèrement plus faible en autopollinisation.

Un autre trait différencie auto et xéнопollinisation. En effet, dans les croisements incompatibles, une seconde vague d'incorporation vient se surajouter à la première.

Ces pics peuvent traduire deux phénomènes possédant une signification métabolique très différente :

a - il s'agit de l'apparition progressive d'un même composé acide,

b - ou celle d'un composé se "sialylant" de plus en plus.

Comme l'examen des chromatogrammes révèle deux ou trois taches co-migrant avec le GM_1 , le GD_{1a} et le GT, il nous a semblé important de définir l'évolution respective de ces composés analogues aux divers gangliosides témoins.

IV - EVOLUTION DES DIVERS GSL ACIDES

Les extraits de pistils préparés sur colonne d'acide silicique, selon la méthode d'IRWIN et IRWIN, ont été purifiés (Fiches T18, T20), puis analysés sur HPTLC dans le système de HARTH et coll. (Fiche T19).

Cinq fractions majeures sont révélées par pulvérisation des plaques au réactif résorcinol/HCl. Leur Rf respectif, ainsi que ceux des gangliosides témoins sont reportés tableau n° 22.

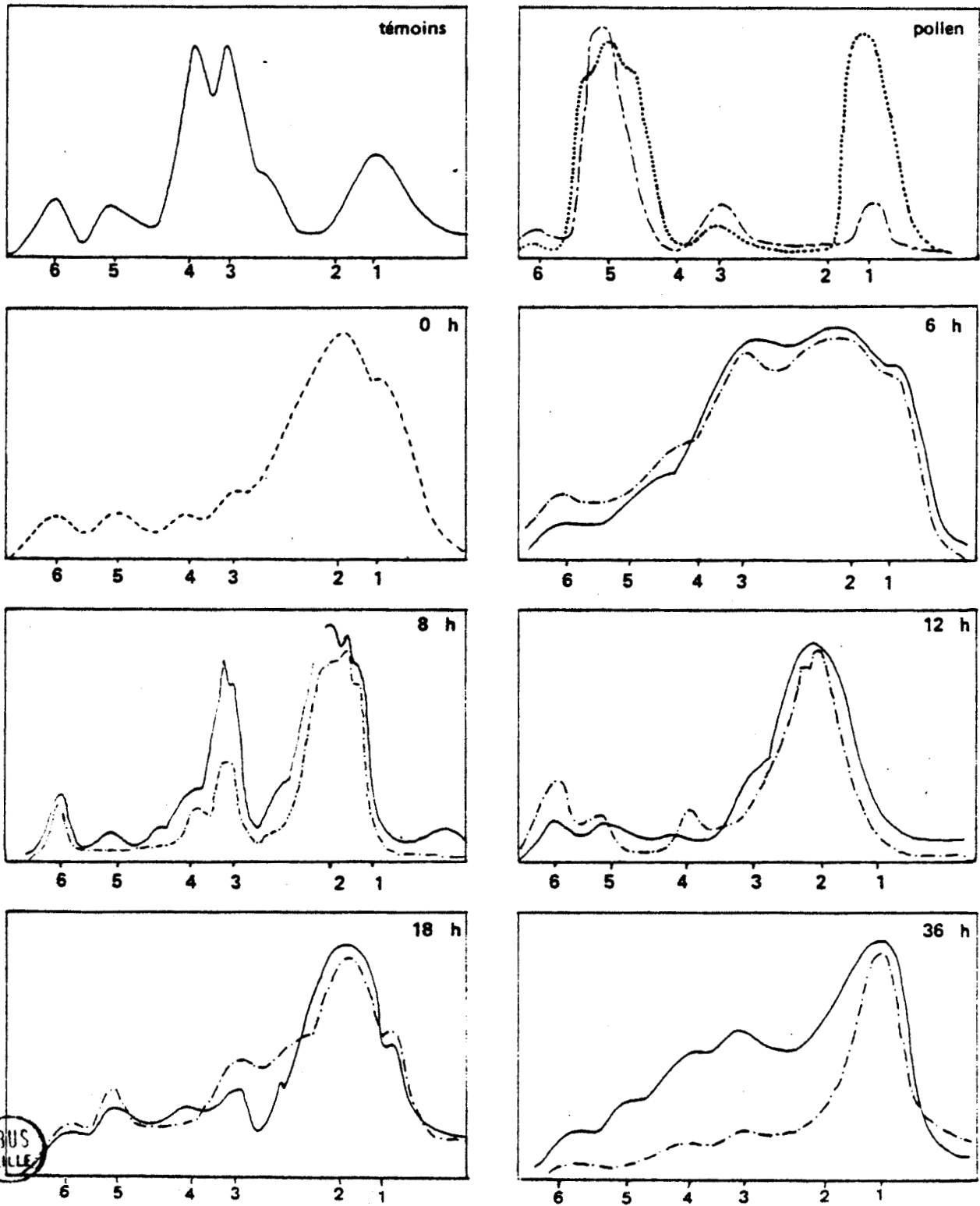
Une fraction co-migre avec le GM_1 (•) ou le GT (•) et le reste avec les disialogangliosides.

Les chromatogrammes ont été ensuite "densitométrés" (densitomètre de type Helena) afin de suivre en fonction du temps l'évolution de la répartition de ces GSL acides.

(•) GM_1 = monosialoganglioside

GT = trisialoganglioside

EVOLUTION DE LA REPARTITION DES DIVERS GSL ACIDES COMPLEXES EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA POLLINISATION



- témoins de gangliosides (voir tableau)
- pollen W166k
- styles vierges W166K
- styles W166K x W166K
- pollen T2U
- styles W166K x T2U

BUS
LILLE

A - ANALYSE DES GSL ACIDES DES PISTILS VIERGES ET DU POLLEN

Dans un premier temps, notre étude s'est portée sur l'évolution des GSL acides des pistils vierges placés dans des conditions environnementales identiques à celles que subissent les pistils lors des pollinisations *in vitro*. Après 6, 8, 12 et 36 heures de pollinisation, les extraits de GSL acides ont été purifiés et analysés en HPTLC.

Peu de variations (non significatives) ont été enregistrées au niveau de ces GSL acides. Un profil standard de répartition des GSL acides a pu être mis en évidence (figure n° 38) ; il est caractérisé par la présence de 5 pics co-migrant avec les témoins de gangliosides, les pics 1 et surtout 2 sont les pics majeurs des extraits.

Les extraits de pollen sont analysés dans les mêmes conditions : 3 pics d'importance inégale sont révélés. Le pollen W166K se caractérise par deux énormes pics (1 et 5) et par un plus faible (3), tandis que le pollen T₂U, même s'il possède un grand pic 5 se caractérise par un profil moins exacerbé au niveau des pics 1 et 3.

B - EVOLUTION DU PROFIL DE REPARTITION DES GSL ACIDES EN

XENOPOLLINISATION

Nous avons donc reporté figure n° 38 l'évolution, en fonction du temps et de la xénopollinisation, du profil de répartition des GSL acides complexes.

Les 6 premières heures de pollinisation compatible se traduisent par une augmentation des pics 2, 3, 4 correspondant aux disialogangliosides se faisant au détriment du pic 1 co-migrant avec le GM₁ animal.

Puis après 12 et 18 heures, le pic 1 continue de régresser au profit plus ou moins des pics 2, 3, 4 et 5.

36 heures de xénopollinisation se traduisent par la réapparition d'un pic 1 se faisant au détriment du pic 2, mais également par l'ampleur des pics 3 à 5.

C - EVOLUTION DU PROFIL DE REPARTITION DES GSL ACIDES EN

AUTOPOLLINISATION

Les 6 premières heures de pollinisation incompatible induisent la même évolution du profil de répartition que la xénopollinisation, c'est-à-dire : accumulation des composés correspondant aux pics 2 à 4 mais, également, augmentation du pic 6 correspondant aux trisia-loconjugués animaux.

Puis, tout comme en xénopollinisation, ce profil de répartition s'accroît avec le temps. Il convient de souligner l'importance relative du pic 6 qui ne fait qu'augmenter.

Ensuite, après 36 heures de pollinisation, il n'y a plus de ressemblance avec la xénopollinisation. Le profil incompatible se caractérise par un pic majeur (1).

D - SIGNIFICATION BIOLOGIQUE

Il semble donc que la pollinisation dans un premier temps s'accompagne de profondes modifications dans le profil de répartition des GSL acides complexes.

La disparition progressive du pic 1 au profit de composés plus polaires caractérise auto et xénopollinisation, qui ne s'opposent qu'au niveau du composé le plus polaire du pic 6.

Puis, après 36 heures de pollinisation, les similitudes ont

disparu et deux profils de répartition peuvent être mis en évidence :

- 1 profil extrêmement simplifié en autopolinisation avec presque exclusivement les composés moins polaires du pic 1,

- 1 profil complexe en xéнопollinisation.

Il est actuellement difficile de définir avec précision la signification biologique de cette évolution dans la répartition des GSL acides complexes. En effet, le manque d'informations précises concernant la structure de ces glycolipides limite notre discussion. Néanmoins, si on procède par analogie avec le comportement des cellules animales, il semble que diverses phases peuvent être distinguées :

- 0-6 h = phase de croissance et de maturation avec présence de pics de plus en plus polaires,

- 6-8 h = maturation au détriment du pic 1,

- 18-36 h = installation d'une réponse à la réaction d'autoincompatibilité, se traduisant par l'opposition des deux profils. Seul le profil obtenu après xéнопollinisation, traduit un système en pleine évolution.

V - CONCLUSION

L'évolution des GSL acides complexes se poursuit de la même façon que celle des GSL neutres, et traduit les mêmes étapes : croissance cellulaire et maturation des composants membranaires.

Ces deux phénomènes s'accomplissent maintenant de façon très classique et se traduisent par des modifications dans la répartition des GSL, en fonction du nombre de résidus osidiques contenus dans la molécule.

CONCLUSION - RESUME

L'étude biochimique des réactions de reconnaissance et d'auto-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.

Nous avons successivement abordé dans ce travail, l'analyse des glycérolipides, des glycosphingolipides neutres et acides et, en relation avec leurs propriétés, les $(Na^+ + K^+)$ ATPases.

Nos essais d'isolement, de fractionnement et de caractérisation des lipides des extraits de pollens et de styles chez *Petunia hybrida* et *Oenothera missouriensis* nous ont conduit à des résultats positifs tant sur le plan analytique que sur le plan physiologique. Bien que la plus grande prudence s'impose quant à l'interprétation de ces résultats en fonction de l'incompatibilité gamétophytique de fécondation, il est cependant évident que les variations quantitatives et qualitatives relevées dans les structures de ces lipides semblent constituer vraisemblablement une première approche du processus de reconnaissance dirigée par le gène S d'incompatibilité.

I - PHYSIOLOGIE DE L'INCOMPATIBILITE ET ACTIVITES MEMBRANAIRES

Les recherches que nous avons effectuées sur l'évolution des glycolipides neutres et acides après pollinisation, nous ont permis de dégager les points suivants :

- les membranes témoignent d'un phénomène de régulation de croissance,

- auquel se surajoute dans un premier temps, une étape de différenciation et de maturation,

- de plus, les membranes réalisent un puissant contrôle de la perméabilité par l'intermédiaire de ces molécules lipidiques.

A - GLYCOLIPIDES ET REGULATION DE CROISSANCE

VICKER et CRITCHLEY -306) ont montré que la croissance tissulaire était accompagnée d'une diminution des teneurs en glycolipides et d'un raccourcissement de leurs chaînes polysaccharidiques et que parallèlement à ces faits, les teneurs en glycoprotéines allaient croissantes ainsi que la longueur de leurs chaînes osidiques.

Ce phénomène décrit jusqu'à présent pour les cellules animales, est retrouvé également dans le règne végétal.

Ainsi, la croissance du tube pollinique est caractérisée par la diminution de leurs teneurs en glycosphingolipides mais aussi par un raccourcissement de la longueur de leur chaîne polysaccharidique. En effet, tout au long de la croissance du tube pollinique, on assiste à une intégration préférentielle des monoglycosylcéramides dans les systèmes membranaires. Parallèlement, dans les espèces que nous avons étudiées (*Petunia* et *Oenothera*), il a été possible de mettre en évidence l'accumulation de glycoprotéines de haut poids moléculaire (LINSKENS et coll. -180-, VANDERDONK -301-).

Il est donc évident qu'au cours de la progression du tube pollinique compatible dans les tissus du pistil, les GSL montreront une évolution identique à celle qui a été décrite dans les extraits de cellules animales en croissance.

L'autopollinisation provoque, quant à elle, dans un premier temps, une évolution du profil de répartition des GSL similaires mais non identique à celle obtenue en xéнопollinisation. En effet, le tube pollinique incompatible, à l'instar du xénotube, peut croître dans les

tissus stylaires. Sa progression plus lente s'accompagne de modifications de moindre envergure. Dans un second temps, la réaction d'auto-rejet a lieu : le tube pollinique incompatible est bloqué à mi-hauteur dans le style et les similitudes avec la xénopollinisation s'arrêtent ; le profil de répartition des GSL ne reflète plus l'élongation cellulaire.

De plus, il semble que l'évolution enregistrée au niveau des GSL soit attribuable à la croissance du tube pollinique. L'induction d'un métabolisme de type pollinique après xénopollinisation et dans les premiers stades de l'autopollinisation, est parfaitement illustrée par les résultats de l'analyse des bases à longue chaîne des GSL neutres et acides. En effet, il a été possible dans un premier temps d'attribuer à certaines bases de type sphingosine, une origine précise. Les bases se répartissent en deux groupes :

- les bases de "type pollinique", c'est-à-dire rencontrées plus spécialement dans les extraits de pollen,
- les bases de "type stylaire", localisées préférentiellement dans les GSL des styles et des stigmates.

Après quelques heures seulement de pollinisation, il apparaît dans les extraits de styles pollinisés des GSL dont les bases à longue chaîne (sphingosine) sont typiques du gamétophyte mâle. La balance entre ces bases que nous avons appelées "polliniques" ou "stylaires" représente un excellent marqueur pour suivre l'évolution du métabolisme des GSL membranaires dans un style pollinisé.

B - GLYCOLIPIDES : TEMOINS D'UN ETAT DE MATURATION CELLULAIRE

Un de nos objectifs était de rechercher les indices de la maturation des déterminants de surface du tube pollinique.

L'analyse des GSL neutres et des GSL complexes a permis de mettre en évidence cette étape de différenciation.

Au niveau des GSL neutres, ce phénomène est plus évident en autopolinisation qu'en xéno-polinisation : en 8 heures de pollinisation incompatible, le tube pollinique acquiert des glycolipides plus glycosylés tels que les DGCer, TGCer et TRGCer. Ce phénomène est moins visible en xéno-polinisation car la croissance active du tube pollinique qui se traduit pas l'accumulation et l'incorporation de MGCer masque légèrement cette phase de maturation des glycolipides.

Cette différenciation des déterminants de surface est également très nette au niveau des GSL acides complexes. La pollinisation se traduit par :

- le maintien d'un taux élevé de GSL analogues aux GM₁ et traduisant un état de croissance active,
- mais également par l'apparition de GSL analogues aux di et trisialogangliosides, c'est-à-dire à des GSL dont le glycanne a évolué par addition successive de résidus osidiques.

L'existence d'une phase de différenciation des déterminants de surface constitue un premier argument pour la confirmation de notre hypothèse : à savoir que le pollen des plantes à AIG est un pollen immature dont la maturité se développe au cours du stade de tube pollinique.

On peut donc envisager l'apparition quelques heures après la pollinisation des déterminants directement impliqués dans :

- le décodage de l'information "soi - non soi",
- la transmission de cette information au travers de la membrane vers le cytoplasme et la machinerie biosynthétique.

C - GLYCOLIPIDES : DETERMINANTS DE SURFACE

Le plus grand problème qui se pose dans l'installation de la réaction de rejet concerne les modalités de la détermination du signal spécifique au gène S. Nous avons vu précédemment les modalités de l'émission d'une information. Cela suppose un ligand spécifique et un récepteur capable de décoder le message et de le transmettre vers l'intérieur de la cellule.

Les GSL neutres pourraient éventuellement être impliqués dans l'émission ou la réception de l'information spécifique d'auto-rejet. Cependant bien que l'analyse de leur composition en oses soit trop fragmentaire, il ne semble pas que ce soit le cas. Par contre, les GSL acides complexes pourraient de par la présence de cet ose curieux, avoir un pouvoir de discrimination supérieur aux GSL neutres. Leurs analogies de comportement avec les gangliosides qui sont directement impliqués dans la réception de facteurs biologiques, sont des arguments en faveur d'un rôle potentiel dans la reconnaissance. Cependant, comme nous l'avons dit, le caractère fragmentaire de nos études ne nous permet pas de conclure plus fermement. La démonstration de leur capacité à fixer une molécule spécifique du gène S s'avère indispensable afin de confirmer ce rôle.

D - GLYCOLIPIDES ET PERMEABILITE CELLULAIRE

Il semble que la régulation de perméabilité cellulaire procède d'un ensemble cohérent de variations observées dans la matrice lipidique. Nous ne tiendrons pas compte dans cette discussion des résultats obtenus chez les glycérolipides et les phospholipides en raison de leur analyse fort incomplète.

Cependant, l'étude fine de l'évolution des GSL neutres et acides, tant dans leur taux que dans leur structure, fait apparaître un schéma général d'une régulation concertée et programmée de la perméabilité. Ce contrôle s'exerce à deux niveaux différents :

- une régulation viscotropique se traduisant par une balance saturation-désaturation et un contrôle de la longueur des chaînes aliphatiques des acides gras et des bases de type sphingosine,

- une régulation interfaciale plus difficile à apprécier, mais présente et efficace.

Ainsi en xénopollinisation, un programme bien défini entraîne des modifications très cohérentes de la matrice lipidique et conduisant vers une optimisation de la fluidité membranaire. L'évolution synchrone du profil de répartition des bases et des acides gras au niveau des sulfolipides et des glycosphingolipides neutres concourt à rendre la membrane plus perméable.

Cette optimisation de la fluidité membranaire ne se retrouve pas après croisement incompatible. Il semblerait qu'au contraire on assiste à l'installation d'une membrane de plus en plus imperméable.

De plus, le contrôle de la perméabilité membranaire réside également dans une activation programmée des enzymes et coenzymes responsables de la translocation des ions au travers de la membrane.

L'étude des sulfolipides et des ATPases K^+ et Na^+ dépendantes a permis de souligner les différences fondamentales qui opposent auto et xénopollinisation en ce qui concerne le transport actif. En effet, seule la xénopollinisation possède des structures membranaires favorisant la translocation des ions, et assurant par là, un réel transport actif des ions tout au long de la croissance du tube pollinique.

Après un croisement compatible, il existe une régulation de la balance des entrées des ions K^+ et des sorties de protons qui tend à maintenir la membrane dans un état de dépolarisation qui va faciliter la diffusion du Ca^{2+} . Enfin, le calcium à son tour régulera la croissance du tube pollinique en maintenant :

- une certaine flexibilité des microfibrilles impliquées dans l'élongation de la paroi,
- une activation optimale des vésicules transportant les précurseurs des membranes.

Nous insisterons tout particulièrement sur le contrôle qu'exercent les lipides sur la perméabilité aux ions comme :

- cofacteurs essentiels à l'activité des enzymes du transport actif,
- molécules indispensables au maintien des enzymes dans une configuration compatible avec l'activité catalytique,
- source d'activateurs ou d'inhibiteurs de ces mêmes enzymes.

A ce titre les phospholipides sont considérés en effet comme des pourvoyeurs d'acides oléique et linoléique libres qui peuvent réguler à leur tour l'activité des ATPases Ca^{2+} dépendantes.

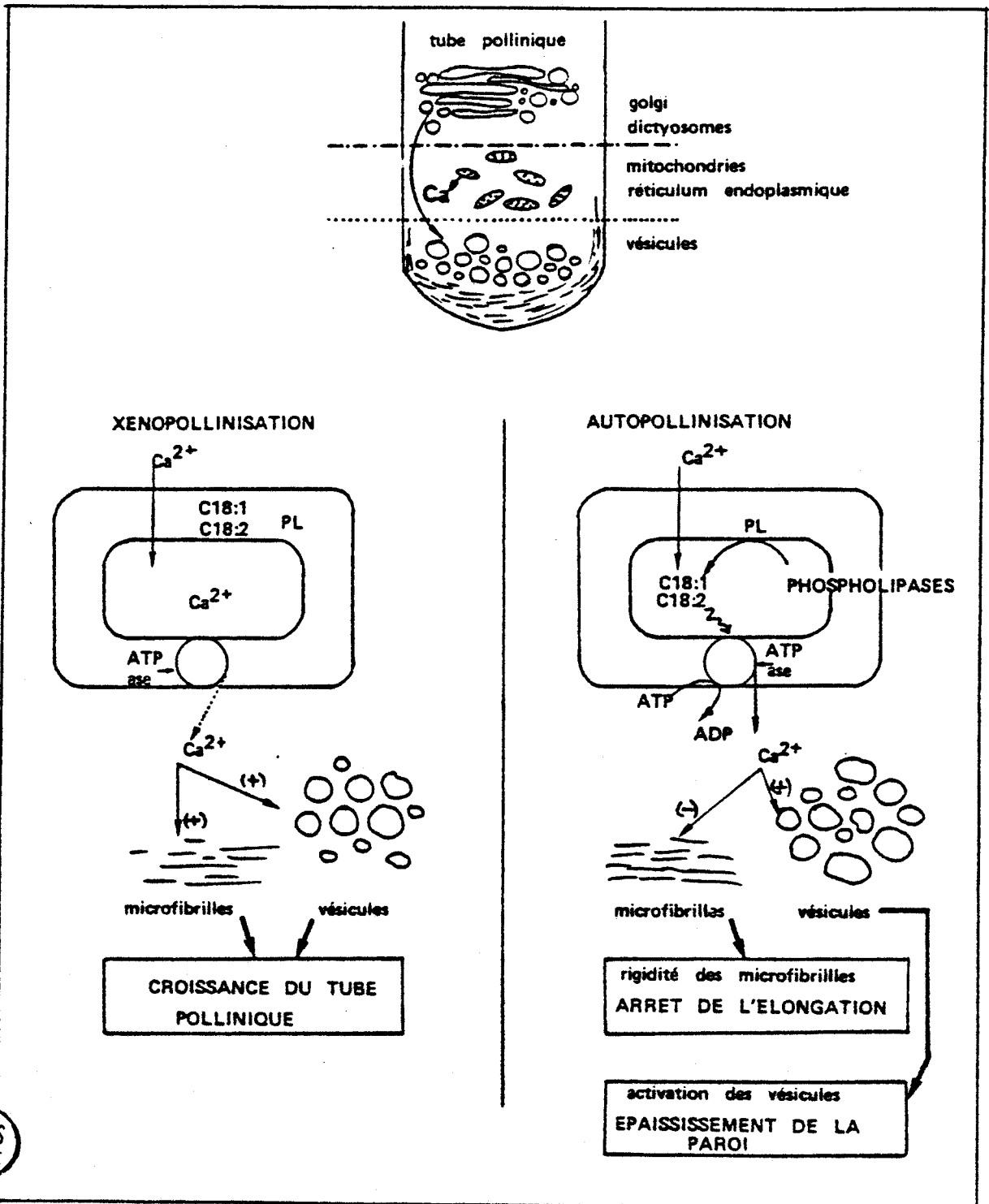
Nous avons donc essayé de résumer figure n° 39 les interrelations possibles entre lipides et perméabilité membranaire en fonction de la pollinisation.

Selon de nombreux auteurs (CRESTI et al. -52-, HERRERO et coll. -111-), différents territoires sont distingués à partir de l'extrémité du tube pollinique en voie d'élongation :

- une zone apicale riche en vésicules,
- un peu en arrière une région où coexistent mitochondries et saccules du réticulum endoplasmique lisse,

FIGURE 39

CONTROLE HYPOTHETIQUE DE L'ELONGATION DU TUBE POLLINIQUE



- encore plus en arrière le cytoplasme contient le complément usuel des organelles des cellules végétales, considérablement enrichi en dictyosomes et en réticulum endoplasmique rugueux. Il semblerait que ces dictyosomes soient impliqués dans l'élaboration des vésicules qui migrent par la suite vers l'extrémité apicale du tube pollinique.

Selon PICTON et coll. -242-, l'élongation de l'extrémité du tube pollinique et la fusion des vésicules sont deux phénomènes distincts régulés par la redistribution du Ca^{2+} contenu dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

Il se pourrait qu'en xénopollinisation l'ATPase Ca^{2+} dépendante soit peu ou pas activée, permettant ainsi que libération du Ca^{2+} suffisante pour maintenir les deux phénomènes de fusion des vésicules et de transport au maximum de leur potentialité.

Par contre, en autopollinisation, les membranes sont riches en phospholipides, pauvres en acides oléique et linoléique, bien que ces acides gras soient identifiés à l'état libre. Il se pourrait qu'un flux de Ca^{2+} active les phospholipases libérant ainsi les acides oléique et linoléique qui vont à leur tour activer les (Ca^{2+}) ATPases provoquant l'expulsion du Ca^{2+} . Celui-ci exerce alors un double contrôle :

- il inhibe les phénomènes mettant en jeu les microfibrilles,
- et il optimise l'activité des vésicules.

Cette hypothèse cependant nécessite une vérification par l'intermédiaire du dosage des (Ca^{2+}) ATPases.

E - GSL, EXISTENCE ET AMPLIFICATION D'UN SIGNAL

Selon LINSKENS -182- et DEURENBERG -60-61-62-, un signal, ayant pour but l'orchestration des nouvelles inductions métaboliques, serait

émis à partir du stigmate vers le style et l'ovaire.

Deux hypothèses concernant la nature de ce signal sont actuellement proposées et correspondent à la diffusion d'une substance biologiquement active et/ou à la propagation d'un stimulus électrique.

La vitesse de propagation de ce signal serait relativement lente (LINSKENS -182-, DEURENBERG -62-).

Bien que la séquence des événements survenant immédiatement après la stimulation des récepteurs périphériques appropriés ne soit pas complètement élucidée, un fait est certain: la membrane cellulaire est à l'origine de la transmission et de l'amplification des signaux vers le compartiment intracellulaire.

Les résultats que nous avons obtenus sur l'évolution des lipides (PL et GSL) permettent d'argumenter en faveur d'une transmission lente et d'une amplification faible des signaux après autopollinisation.

La transmission et l'amplification des signaux transitant par la membrane reposent sur le caractère essentiellement asymétrique et fluide de cette dernière. L'asymétrie provient non seulement de la structure des divers lipides mais également de la répartition des phospholipides et des glycosphingolipides entre les deux couches de la matrice lipidique. Les GSL grâce à leur chaîne oligosaccharidique se localisent préférentiellement dans la couche externe, tandis que les phospholipides sont enfouis plus profondément dans la couche la plus interne de la matrice.

Après pollinisation les proportions relatives en phospholipides et en glycosphingolipides évoluent différemment en fonction du mode de pollinisation. En effet, après xéнопollinisation, le taux des GSL ne varie pas ou peu, tandis que celui des glycérolipides et des phospholipides s'effondre. Par contre, en autopollinisation, le

rapport GSL/GL et PL est inversé à cause de la très nette diminution des GSL. Les membranes après auto- et xénopollinisation ne possèdent pas la même structure et par conséquent pas la même asymétrie.

La fluidité des membranes est en étroite relation avec le degré de saturation des chaînes aliphatiques des acides gras et des bases de type sphingosine. Nos résultats ont mis en évidence l'augmentation du degré de saturation des chaînes hydrocarbonées après autopollinisation, conférant ainsi aux membranes une rigidité caractéristique et une aptitude très réduite pour acheminer efficacement une information perçue en surface.

Nos résultats indiquent clairement que la mobilisation des composés lipidiques agissant en synergie avec d'autres constituants membranaires pour transmettre et amplifier une information n'est pas optimale en autopollinisation. Il semblerait qu'après autofécondation, tous les signaux émis ne transitent que lentement (voire pas du tout) au travers de la membrane provoquant ainsi un retard inéluctable dans l'induction de nouveaux métabolismes adaptés au maintien de la croissance des tubes polliniques dans les tissus stylaires.

II - INTEGRATION DES RESULTATS DANS UN MODELE METABOLIQUE EXPLICATIF DE L'AIG

Au terme de cette étude, il semble de plus en plus évident que les lipides soient tout particulièrement impliqués dans le contrôle de l'AIG. Cependant, actuellement s'il est difficile de démontrer, dans l'état actuel des choses, leur participation dans la détermination de la réaction de reconnaissance et dans l'induction d'une réponse d'auto-rejet, il est clair que les modifications concertées qu'ils subissent, traduisent pour le moins une participation active dans la phase de réponse.

L'analyse de l'évolution des glycolipides en fonction de la pollinisation est fondamentale car elle permet de retracer les diverses étapes traversées par le tube pollinique au cours de sa croissance, mais également de suivre le déroulement d'une phase de maturation des déterminants de surface.

Le tube pollinique, et par là même le gamétophyte mâle, se différencie au cours des premières heures. De nouveaux GSL apparaissent à sa surface. Ces GSL, considérés comme des molécules-code peuvent réguler ou initier des phénomènes nouveaux et spécifiques. Ils pourraient même jouer un rôle primordial car ils sont potentiellement capables de donner le signal de la dernière division de noyau.

Cette participation des GSL à la réaction d'incompatibilité peut également être illustrée par le comportement du tube pollinique en présence de cycloheximide ou de puromycine.

En effet, si de la cycloheximide est injectée dans le canal styloïde de *Lilium* avant la pollinisation, elle provoque au niveau du tube pollinique un sévère retard de croissance ainsi que des malformations. Ainsi le tube pollinique pousse en "tire-bouchon" et cette croissance ne se limite plus au canal styloïde.

Lorsque la cycloheximide est injectée après 12 heures de pollinisation compatible, la croissance du tube pollinique normale jusqu'à là est inhibée et le tube pollinique ne progresse plus dans le style (ASCHER et coll. -14-12-).

De même, l'application de puromycine avant pollinisation perturbe la croissance du tube pollinique ; il a même été possible de lever l'incompatibilité en inhibant le pollen incompatible, avant d'effectuer la pollinisation, avec de la cycloheximide (FERRARI et coll. -74-). Le pollen incompatible est alors capable de pénétrer

le stigmate de *Brassica*.

Des résultats analoges ont été obtenus sur *Tradescentia* ou sur *Petunia hybrida* (KOVALEVA et coll. -153-). Ces diverses expériences ont été interprétées uniquement en terme de synthèse protéique. En effet, la puromycine y intervient en déstabilisant le complexe ribosome-polypeptide naissant et la cycloheximide en interférant avec le facteur d'élongation.

Cependant, ces deux antibiotiques agissent également au niveau de la biosynthèse des GSL neutres et acides (VAKIRTZI et coll. -298-). En effet, dans des conditions d'inhibition permanente de la synthèse protéique, la biosynthèse des GSL est strictement limitée à certaines catégories possédant un glycanne très réduit.

La biosynthèse des GSL ne nécessite pas une synthèse continue de la sécrétion des protéines. Les changements observés semblent davantage associés à des altérations du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi où s'effectue l'élongation des glycanes des GSL (ROTHMAN LODISH -262-) plutôt qu'à celles des enzymes impliqués dans leur élaboration. L'action de ces antibiotiques sur la biosynthèse des GSL se situe à deux niveaux :

- altération du réticulum endoplasmique,
- inhibition des glycosyltransférases impliquées dans l'élongation de la copule osidique, résultant de la fixation de l'inhibiteur sur les membranes.

Il se pourrait donc, que lors de ces expériences de levée des barrières d'incompatibilité, les membranes régressent vers un état immature. Les déterminants de surface ne sont plus synthétisés en présence d'antibiotiques et les nouveaux GSL qui s'accumulent possèdent un glycanne (réduit à 1 ou 2 unités saccharidiques) qui n'est plus

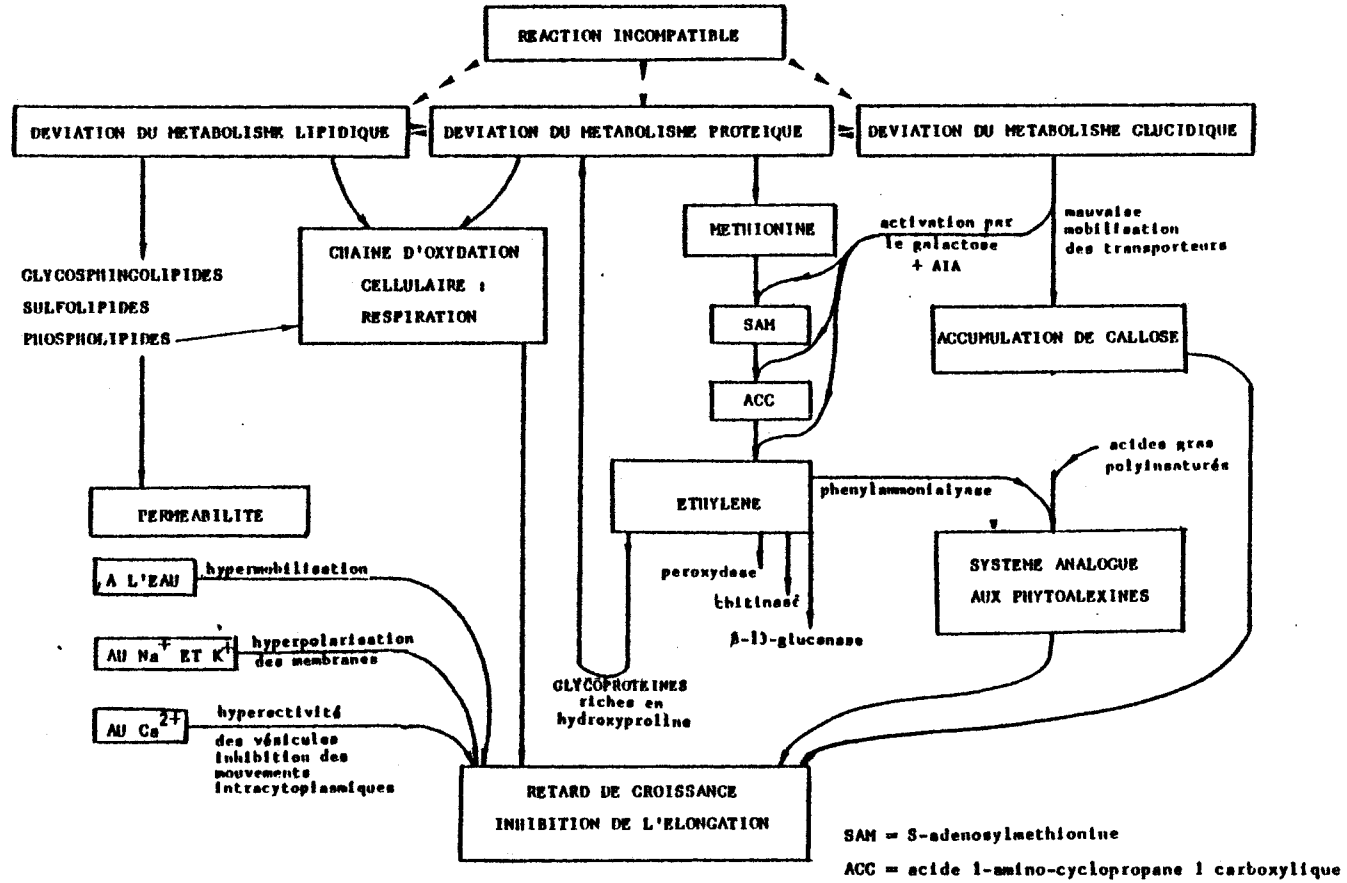


TABLEAU 23

TABLEAU RECAPITULATIF DES INTERACTIONS METABOLIQUES IMPLIQUEES
DANS LA REACTION D'INCOMPATIBILITE

le vecteur d'une information spécifique.

Actuellement de nombreux travaux impliquent de plus en plus fréquemment les GSL dans les réactions de reconnaissance. Récemment, ils ont été localisés au niveau des microtubules (SAKAKIBARA et coll. -265-). Si cette association "GSL-microtubules" est démontrée comme un phénomène général, cela conduira à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le transport ou assurant la transmission vers le noyau des messages biologiques perçus à la surface cellulaire.

Bien que nous n'apportions aucune preuve réellement suffisante, il semble que les GSL, de par leur glycanne et l'évolution que subit celui-ci avec la pollinisation, doivent être considérés comme jouant un rôle primordial dans l'initiation du comportement du tube pollinique.

De plus, s'ils sont directement impliqués dans l'émission de signaux sociaux, ils participent également en tant qu'éléments de la matrice lipidique à l'élaboration d'une réponse intra-cytoplasmique (conséquence directe du signal perçu).

Nous avons donc essayé de schématiser tableau n° 23 , les diverses facettes d'une réponse consécutive à un signal d'auto-rejet. La réponse incompatible s'accompagne de perturbations au niveau des trois grands métabolismes (lipidique, protéique et glucidique).

Les "déviations" du métabolisme lipidique après un croisement incompatible sont orientées vers un nouveau contrôle de la perméabilité membranaire et des chaînes d'oxydation cellulaire.

Les déviations des métabolismes glucidiques et protéiques conduisent à l'accumulation de callose et d'éthylène par le relais du galactose (TOPPAN et coll. -293-, COLCLASURE et coll. -49-). Ce dernier facteur peut au même titre que la production d'acides gras polyinsaturés (BOSTOCK et coll. -22-) mettre en jeu un système analogue aux phytoalexines qui contrôlerait également la croissance de l'auto-tube.

III - CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Les recherches effectuées au cours de ces dernières années dans le domaine des lipides des organes floraux ont fait ressortir l'importance du rôle régulateur que jouent les membranes dans la biologie de la reproduction. Les observations ont suscité le concept d'une maturation des déterminants de surface impliquée dans la discrimination soi - non soi et ont placé les membranes végétales au premier rang des modifications induites au cours de l'autoincompatibilité de fécondation.

Les études que nous avons menées sur l'évolution des glycosphingolipides et des phospholipides nous ont permis de dégager les points suivants :

1) en analysant l'évolution des glycosphingolipides neutres et acides complexes et en comparant les taux de ces glycolipides en fonction de la longueur de leur chaîne oligosaccharidique, il est possible de postuler que le tube pollinique subi une étape de maturation de ses déterminants de surface se traduisant par l'apparition de glycolipides dont le glycanne est de plus en plus complexe. Cette étape de maturation expliquerait la lenteur de l'établissement de la réaction incompatible dans les plantes à AIG, comparée au blocage brutal observé dans les plantes à AIS. Tant que le signal d'auto-rejet, n'est pas donné ou perçu (par manque de maturation), les styles auto et xénopollinisés évoluent de façon similaire. Lorsque le signal est émis, il y a activation de voies métaboliques précises conduisant ou non à l'inhibition de la croissance du tube pollinique.

Les glycoprotéines et les glycolipides élaborant leur glycanne de façon identique (maturation dans la membrane par les mêmes glycosyltransférases), l'étape de maturation des GSL pourrait témoigner de celle de glycoprotéines spécifiques.

2) toujours grâce à l'analyse de l'évolution des divers GSL neutres, nous avons pu mettre en évidence une phase de croissance relevant de synthèses très actives de la part du tube pollinique. Cette phase de croissance se traduit par l'accumulation de GSL dont les chaînes oligosaccharidiques sont très courtes et dont les bases sont essentiellement de type pollinique, excluant ainsi la participation directe des tissus stylaires à ces synthèses.

3) l'analyse de la composition en acides gras et en bases de type sphingosine des GSL neutres et des sulfolipides a permis de mettre en évidence l'installation d'un contrôle cohérent et précis de la perméabilité membranaire. Ce dernier comporte une régulation viscotropique (au moyen d'un contrôle du degré de saturation et de la longueur des chaînes aliphatiques) et une régulation interfaciale (au moyen d'un contrôle de la balance GSL/PL). La mise en place de ce contrôle de la perméabilité a été vérifiée par le dosage de l'activité des ATPases impliquées dans le transport actif des ions Na^+ et K^+ .

4) l'analyse de la répartition des diverses classes de lipides a permis de souligner le fait que les membranes sont très différentes après une pollinisation compatible ou incompatible. Cette répartition différentielle des lipides après pollinisation a des répercussions importantes au niveau de l'asymétrie des membranes qui conditionne, au même titre que la fluidité, la transmission et l'amplification des signaux perçus en surface. Nos résultats indiquent clairement qu'après autopollinisation, les membranes cellulaires ont des aptitudes très réduites pour acheminer efficacement une information.

5) il semble que les régulations ioniques aient un rôle primordial dans le phénomène d'autoincompatibilité. Les études sur l'activité des ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPases ont permis de relier le mouvement des ions

Na^+ et K^+ avec la croissance du tube pollinique. De même l'analyse de l'évolution des PL permet de souligner le rôle capital du calcium dans les mouvements du "membrane flow" en relation avec l'extension du tube pollinique.

6) il nous semble intéressant, au terme de ce travail, de dresser une comparaison entre le règne animal et le règne végétal. Dans les deux cas le succès de la fécondation dépend d'une interaction de type récepteur-ligand et repose sur la participation des membranes, des ions et des polymères sulfatés (SHAPIRO -275-). Toutes altérations dans la concentration en Ca^{2+} , Na^+ , K^+ et dans la fluidité membranaire modulent la réponse finale et compromettent le succès de la fécondation.

Dans les deux règnes, le terme ultime de la fécondation correspond à la fusion des gamètes mâle et femelle. Le tube pollinique, au même titre que le spermatozoïde, doit pouvoir fusionner avec l'ovule. La coopération des membranes à cet instant est évidente. Ces dernières doivent être "fusibles" et la notion d'une fluidité membranaire appropriée est sous-jacente. Or la fusion entre les matrices lipidiques ne peut avoir lieu que pour des conditions de température supérieure à la température de transition de phase des phospholipides. Ceci est à rapprocher de la thermodépendance des processus de fécondation tant chez les végétaux que chez les animaux. Il semblerait (SHAPIRO -275-) que des zones de fusion préexistent. Leur existence a été mise en évidence par des études physiques (étude en fluorescence des lipides, ou après incorporation d'un marqueur de spin le 5-doxylstéarate). Le calcium serait un élément important dans la fusion des membranes, car il est capable de déstabiliser la bicouche lipidique (en induisant la formation de micro-domaines cristallins dans les phospholipides acides) et de donner naissance à des sites où la fusion membranaire peut se réaliser.

Ainsi même si le tube pollinique incompatible achevait sa croissance jusqu'au sac embryonnaire, il serait incapable d'effectuer la fusion, car ses membranes sont trop rigides. Par contre, le xénotube ne présente pas cette réduction de fluidité membranaire si néfaste.

Dans les deux règnes, les événements aboutissant à la fécondation de l'oeuf sont très soigneusement orchestrés. Les aspects régulateurs doivent encore être définis mais la programmation successive des événements métaboliques est très nettement dépendante d'un contrôle membranaire.

Au terme de ce travail, de nombreuses incertitudes subsistent, révélées par l'abondance des hypothèses avancées dans la discussion de ces résultats. Une meilleure définition des structures lipidiques membranaires, des relations de la membrane avec la réception et le transfert d'un signal doivent être abordées. Ces recherches constitueront l'objet de nos prochaines investigations dans ce problème particulièrement important de la biologie que représente l'incompatibilité.

Il nous semble en effet primordial de définir plus précisément la structure des glycanes des GSL acides complexes et leur évolution selon les différents modes de pollinisation.

De plus, il est nécessaire de préciser leur rôle biologique dans la réaction de reconnaissance. En effet, tout glycoconjugué impliqué dans cette étape doit être capable de fixer spécifiquement une molécule codée par le gène S d'incompatibilité.

La seconde orientation de nos travaux concerne la signification biologique de l'évolution des phospholipides. En effet, il semble qu'il y ait deux grands groupes de récepteurs : une classe reliée à la production de cAMP, une autre induisant généralement le catabolisme

du phosphatidyl-inositol et la mobilisation du calcium (NISHIZUKA -233-) dans les tissus-cible ; lorsque ces derniers sont stimulés, il y a libération de calcium, d'acide arachidonique et de cAMP. Les produits du catabolisme du phosphatidyl-inositol lié à un récepteur ont été identifiés comme du diacylglycérol et de l'inositol-phosphate qui se reconvertit partiellement en inositol 1-2 phosphate cyclique. Le rôle du diacylglycérol est de servir de signal pour le contrôle transmembranaire de la phosphorylation des protéines (NISHIZUKA -233-). Il nous semble donc très important de porter notre attention sur ce phosphatidyl-inositol, ainsi que sur deux lipides particuliers qui apparaissent uniquement dans les styles après 4 heures de pollinisation. Dans le même but (définir les modalités d'action d'un éventuel récepteur lié aux lipides), l'étude des (Ca^{2+}) ATPases semble intéressante.

BIBLIOGRAPHIE

- 164 -

BIBLIOGRAPHIE

- 1) ABRAHAMSON, S., DAHLEN, B., LÖFGREN, H., PASCHER, I. and S. SUNDELL. - Molecular arrangement and conformation of lipids of relevance to membrane structure. In "Structure of biological membrane". S. ABRAHAMSON, I. PASCHER eds. Plenum Press, New York, London 1977, 1-24.
- 2) ALBERSHEIM, P. - The primary cell wall and control of elongation growth. In "Plant carbohydrate Biochemistry". J.B. BRIDHAM ed. Academic Press, London 1974, pp. 145-164.
- 3) ALBERSHEIM, P. and A.J. ANDERSON-PROUTY. - Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. Annu. Rev. plant physiol 1975, 26, 31-52.
- 4) ALBERSHEIM, P., AYERS, A.R., VALENT, B.S., EBEL, J., HAHM, M., WOLPERT, J. and R. CARLSON. - Plants interact with microbial polysaccharides. Journal of supramolecular structure, 1977, 6, 599-616.
- 5) ALBERSHEIM, P. and B.S. VALENT. - Host pathogen interaction in plants. J. Cell. Biol., 1978, 78, 627-643.
- 6) ALVING, C.R. and R.L. RICHARDS. - Immune reactivities of antibodies against glycolipids. I : properties of anti-galactocerebroside antibodies purified by a novel technique of affinity binding to liposomes. Immunochemistry, 1977, 14, 373-381.
- 7) ANDERSON, R.L., CLARKE, A.E., JERMYN, M.A., KNOX, R.B. and B.A. STONE. - A carbohydrate binding arabinogalactan protein from liquid suspension cultures of endosperm from Lolium multiflorum. Aust. J. plant. Physiol. 1977, 4, 143-158.
- 8) ANDO, S., KON, K., ISOBE, M., NAGAI, Y. and T. YAMAKAWA. - Existence of glucosaminyl lactosyl ceramide in human erythrocyte membrane as a possible precursor of blood group active glycolipids. J. Biochem., 1976, 79, 625-632.

- 9) ARASU, N.T. - Self-incompatibility in Angiosperms : a review. Genetica, 1968, 39, 1-24.
- 10) ASCHER, P.D. - A gene action model to explain gametophytic self-incompatibility. Euphytica, 1966, 15, 179-183.
- 11) ASCHER, P.D. and S.J. PELOQUIN. - Effect of floral aging on the growth of compatible and incompatible pollen tubes in Lilium longiflorum. Am. J. Botan., 1966, 53, 99-102.
- 12) ASCHER, P.D. and L.W. DREWLOW. - The effect of cycloheximide and 6-methyl-purine on in vivo compatible and incompatible pollen tube growth in Lilium longiflorum. Theor. Appl. Genetics, 1970, 40, 173-175.
- 13) ASCHER, P.D. and S.J. PELOQUIN. - Temperature and self - incompatibility reaction in Lilium longiflorum Thumb. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1970, 95, 586-588.
- 14) ASCHER, P.D. - The self - incompatibility in detached styles of Lilium longiflorum Thumb. injected before pollination with 6-methyl-purine or puromycin. Incomp. Newsletter, 1974, 4, 57-60.
- 15) ASCHER, P.D. - Special stylar property required for compatible pollen tube growth in Lilium longiflorum Thumb. Bot. Gaz., 1975, 136, 317-321.
- 16) AULT, K.A. and J. BRAUN. - Cell surface recognition and transmembrane control. In "Biological basis of immunodeficiency". E.W. GELFAND, H.M. DOSCH eds. Raven Press, New York, 1980, p. 155-169.
- 17) BALSAMO, J. and J. LILIEN. - Functional identification of three components which mediate tissue-type specific embryonic cell adhesion. Nature, 1974, 251, 522-524.
- 18) BARONDES, S.H. and S.D. ROSEN. - Cell surface carbohydrate binding proteins : role in cell recognition. In "Neuronal recognition". S.H. BARONDES ed., London Chapman et Hall Ltd, 1976, p. 331-356.

- 19) BARONDES, S.H. - Lectins : their multiple endogenous cellular functions. Ann. Rev. Biochem., 1981, 50, 207-231.
- 20) BERLIN, R.D., OLIVIER, J.M., UKENA, T.E. and H.H. YIN. - Control of cell surface topography. Nature London, 1974, 247, 45-47.
- 21) BOLDYREV, A.A. - Role of lipids in the functioning of $(Na^+ - K^+)ATPase$. Studia Biophysica, 1981, 84, 153-160.
- 22) BOSTOCK, R.M., LAINE, R.A. and J.A. KUC. - Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosa pentaenoic and arachidonic acids in potato. Plant Physiol., 1982, 70, 1417-1424.
- 23) BOUHOURS, J.F. and R.M. GLICKMAN, R.M. - Rat intestinal glycolipids. II - Distribution and biosynthesis of glycolipids and ceramide in villus and crypt cells. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 441, 123-133.
- 24) BRADY, R.O. and P. FISHMAN. - Biosynthesis of glycolipids in virus. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 355, 119-148.
- 25) BRADY, R.O. and P. FISHMAN. - Gangliosides as biotransducers of membrane mediated information : cholera toxin as a model. In "Transport of macromolecules in cellular systems". S.C. SILVERSTEIN ed. Berlin Dahlem Konferenzen, 1978, p. 69-84.
- 26) BREDEMEIJER, G.M.M. - A possible role of a stylar peroxidase gradient in the rejection of incompatible growing pollen tube. Act. Bot. Neerl., 1976, 25, 107-116.
- 27) BREDEMEIJER, G.M.M. and J. BLAAS. - S-specific proteins in styles of self incompatible Nicotiana glauca. Theor. Appl. Genetics, 1981, 59, 185-190.
- 28) BRETSCHER, M.S. - Membrane structure : some general principles. Science, 1973, 181, 622-629.
- 29) BREWBAKER, J.L. - Pollen cytology and incompatibility system in plants. J. Hered., 1957, 48, 217-277.

- 30) BREWBAKER, J.L. - Biology of the Angiosperm pollen grain. Ind. J. Genet. Plant Breed, 1959, 19, 121-123.
- 31) BRIS, B. and G. LÖRCH. - Etude comparative de la respiration des styles d'Oenothera missouriensis après pollinisation compatible et incompatible. Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 1970, 23, 19-22.
- 32) BRIS, B. and C. DELBART. - The glycosphingolipids of the pollen and the style in Oenothera missouriensis Sims, self incompatible species. Incompatibility Newsletter, 1978, 9, 74-77.
- 33) BRIS, B., DELBART, C., COUSTAUT, D. and R. LINDER. - Changes in glycosphingolipids during pollination in Oenothera missouriensis. Phytochemistry, 1981, 20 (6), 1255-1258.
- 34) BRIS, B. - Evolution des protéines et des lipides au cours de la réaction d'incompatibilité gamétophytique chez Oenothera missouriensis Sims, espèce autoincompatible. Thèse Doct. Etat ès Sciences naturelles, 1982.
- 35) BRIS, B., DELBART, C. and D. COUSTAUT. - L'autoincompatibilité de fécondation chez les Angiospermes. Année biologique, 1982, 21, 321-358.
- 36) BURNET, M. - Self-recognition in colonial marine forms and flowering plants in relation to the evolution of immunity. Nature, 1971, 232, 230-235.
- 37) CALHOUN, W.I. and G.G. SHIPLEY. - Fatty acid composition and thermal behaviour of natural sphingomyelins. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 555, 436-441.
- 38) CALLOW, J.A. - Recognition, resistance and the role of plant lectins in host-parasite interactions. Adv. Bot. Res., 1977, 4, 1-49.
- 39) CARON, B. - Phospholipides et glycolipides du pollen et du style chez Oenothera missouriensis Sims, espèce auto-incompatible. Thèse d'Etat de Pharmacie. Lille, 1972.

- 40) CARPITA, N., SUBULARSE, D., MONTEGINOS, D. and D.P. DELMER. - Determination of the pore size of cell walls of living plants cells. Science, 1979, 205, 1144-1147.
- 41) CARTER, A.L. and T. MacNEILLY. - Effects of increased humidity on pollen growth and seed set following self pollination in Brussels sprouts (Brassica oleracea var. gemmifera). Euphytica, 1975, 24, 805-813.
- 42) CARTER, A.L. and T. MacNEILLY. - Increased atmospheric humidity post pollination : a possible aid to the production of inbred line seed from mature flowers in Brussels sprouts. Euphytica, 1976, 25, 531-536.
- 43) CHAPMAN, D. - Some recent studies of lipids. Lipids, cholesterol and membrane systems. Biol. Membrane. Academic Press, 1973, 2, 91-144.
- 44) CHAPMAN, D., GOMEZ-FERNANDEZ-J.C. and F.M. GONI. - The interaction of intrinsic proteins and lipids in biomembranes. Trends in Biochemical Sciences, 1982, 7, 67-70.
- 45) CHEAH, A.M. - Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of sarcoplasmic reticulum. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 648, 113-119.
- 46) CLARKE, A.E. and R.B. KNOX. - Cell recognition in flowering plants. The quarterly Review of Biology, 1978, 53, 3-28.
- 47) CLARKE, A.E. and R.B. KNOX. - Plants and immunity. Dev. Comp. Immunol., 1980, 3, 571-589.
- 48) CLARKE, A.E. and P.A. GLEESON. - Molecular aspects of recognition and response in the pollen-stigma interaction. In "Phytochemistry of cell Recognition and cell Surface interaction". Recent Advances in Phytochemistry. F.A. LOEWUS and G.A. RYAN eds. Plenum Press, New York, London, 1981, 15, 161-211.
- 49) COLCLASURE, G.C. and YOPP, J.H. - Galactose induced ethylene evolution in mung bean hypocotyls : a possible mechanism for galactose retardation of plant growth. Plant physiol., 1976, 37, 298-302.

- 50) COPE, F.W. - The mechanism of pollen incompatibility in Theobroma cacao. Heredity, 1962, 17, 157-182.
- 51) CORRENS, C. - Selbsterilität und individualstoffe. Biol. centr., 1913, 33, 389-423.
- 52) CRESTI, M., PACINI, E., CIAMPOLINI, F. and G. SARFATTI. - Germination and early tube development in vitro of Lycopersicum peruvianum pollen : ultrastructural features. Planta, 1977, 13, 239-249.
- 53) CRITCHLEY, D.R. and M.G. VICKER. - Glycolipids as membrane receptors important in growth regulation and cell-cell interactions. In "Dynamics aspects of cell surface organization". Cell Surface Reviews, 1977, 3, 306-370.
- 54) CUATRECASAS, P. - Insulin receptor of liver and fat cell membranes. Fed Proc., 1973, 32, 1838-1846.
- 55) CUATRECASAS, P. and M.D. HOLLENBERG. - Hormone receptor complexes and their modulation of membrane functions. Rec. Prog. Horm. Res., 1975, 31, 37- 84.
- 56) CUATRECASAS, P. and M.D. HOLLENBERG. - Membrane receptors and hormone action. Adv. Prot. chem., 1976, 30, 251-451.
- 57) DAVIS, M.T. and D.F. SILBERT. - Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 373, 224-241.
- 58) DAUWALDER, M. and W.G. WHALEY. - Membrane assembly and secretory in higher plants. Journal of ultrastructure research, 1982, 78, 302-320.
- 59) DELBART, C., BRIS, B., NOUVELOT, A. and D. COUSTAUT. - Sulphatides and pollination in Oenothera missouriensis. Phytochem., 1983, 22, sous presse.
- 60) DEURENBERG, J.J.M. - In vitro protein synthesis from unpollinated, cross- and self-pollinated Petunia ovaries. Planta, 1976 a, 128, 29-33.

- 61) DEURENBERG, J.J.M. - Activation of protein synthesis in ovaries from Petunia hybrida after compatible and incompatible pollination. Acta Bot. Neerl., 1976 b, 25, 221-226.
- 62) DEURENBERG, J.J.M. - Evidence against the formation of fast diffusing substances preceding fertilization in Petunia. Acta Bot. Neerl., 1977, 26, 353-355.
- 63) DICKINSON, H.G. and D. LEWIS. - The formation of the tryphine coating pollen grains of Raphanus and its properties relating to the self incompatibility system. Proc. Roy. Soc. London B, 1973 b, 184, 149-165.
- 64) DICKINSON, H.G. and J. LAWSON. - Pollen tube growth in the stigma of Oenothera organensis following compatible and incompatible intra-specific pollinations. Proc. Roy. Soc. London B, 1975, 188, 327-344.
- 65) DICKINSON, H.G., MORIARTY, J. and J. LAWSON. - Pollen-pistil interaction in Lilium longiflorum: the role of the pistil in controlling pollen tube growth following cross and self-pollinations. Proc. Roy. Soc. London B, 1982, 215, 45-62.
- 66) DOLJANSKI, F. - Cell surface shedding. In "Glycoconjugates". HOROWITZ, M.T. ed. Academic Press, New York, 1982, 4, 155-190.
- 67) DUMAS, C. and T. GAUDE. - Sécrétions et biologie florale. II - Leurs rôles dans l'adhésion et la reconnaissance pollen-stigmate. Données récentes, hypothèses et notions d'immunité végétale. Bull. Soc. Bot. fr., Actual. Bot., 1982 (1), 89-101.
- 68) EAST, E.M. and A.J. MANGELSDORF. - A new interpretation of the hereditary behaviour of self sterile plants. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 1925, 11, 166-171.
- 69) EAST, E.M. - The physiology of self-sterility in plants. Jacques loeb mem. J. Gen. Physiol., 1926, 8, 403-416.

- 70) EAST, E.M. - Self-sterility. Bibliographica Genetica, 1929, 5, 331-370.
- 71) EDELMAN, G.M. - Surface modulation in cell recognition and cell growth. Science, 1976, 192, 218-226.
- 72) ENEGREN, B.J. and A.T.H. BURNES. - Chemical structure of attachment sites for viruses on human erythrocytes. Nature, 1977, 268, 536-537.
- 73) FARIAS, R.N., BLOJ, B., MORERO, R.D., SINERIZ, F. and R.E. TRUCCO. - Regulation of allosteric membrane bound enzymes through changes in membrane lipid composition. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 231-251.
- 74) FERRARI, T.E. and D.H. WALLACE. - Incompatibility on Brassica stigmas is overcome by treating pollen with cycloheximide. Science, 1977, 196, 436-438.
- 75) FERRARI, T.E. and D.H. WALLACE. - A model for self recognition and regulation of incompatibility response of pollen. Theor. Appl. Genet., 1977, 50, 211-225.
- 76) FETT, W.F., PAXTON, J.D. and D.B. DICKINSON. - Studies on the self-incompatibility response of Lilium longiflorum. Am. J. Bot., 1976, 63, 1104-1108.
- 77) FIELD, M. - Mode of action of cholera toxin stabilization of catecholamine sensitive adenylate cyclase in turkey erythrocytes. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1974, 71, 3299-3303.
- 78) FISHMAN, P.H. and R.O. BRADY. - Biosynthesis and function of gangliosides. Science, 1976, 194, 906-915.
- 79) FISHMAN, P.H. - Role of membrane ganglioside in the binding and action of bacterial toxins. J. membrane biol., 1982, 69, 85-97.
- 80) FRANKEL, L.K., BRICKER, T.M. and W.H. ESHBAUGH. - Comparison of stylar polypeptides from self and cross pollinations in Petunia hybrida L. Incompatibility Newsletter, 1981, 13, 125-129.

- 81) FRANKS, D.J. - Cholera toxin and adenylate cyclase : properties of the activated enzyme in liver plasma membrane. Can. J. Biochem., 1976, 54, 981-987.
- 82) FRAZIER, W. and L. GLASER. - Surface components and cell recognition. Ann. Rev. Biochem., 1979, 48, 491-523.
- 83) FRIEDMAN, K.J. - Role of lipids in the Neurospora crassa membrane. II - Membrane potential and resistance studies, the effect of altered fatty acid composition on the electrical properties of the cell membrane. J. membrane Biol., 1977, 36, 175-190.
- 84) GAGNEU, A. - L'incompatibilité chez les plantes supérieures : problème de génétique végétale. Ann. Biol., 1950, 26, 3-4.
- 85) GAGNEU, A. - Evolution caryologique et évolution chimique dans le fonctionnement du pollen. Colloque R.C.P. 115 du C.N.R.S., 1967, p. 29-34.
- 86) GAHMBERG, C.G. - Proteins and glycoproteins of Hamster Kidney fibroblast (BHK₂₁) plasma membranes and endoplasmic reticulum. Biochim. Biophys. Acta, 1971, 249, 81-95.
- 87) GAHMBERG, C.G. and S.I. HAKOMORI. - External labelling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipid and glycoprotein of human erythrocytes. J. Biol. Chem., 1973, 248, 4311-4317.
- 88) GALLIARD, T. and E.I. MERCER. - In "Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids. Academic Press, London, 1975.
- 89) GARDAS, A. - A structural study on a macroglycolipid containing 22 sugars isolated from human erythrocytes I. Eur. J. Biochem., 1976, 68, 177-183.
- 90) GARDAS, A. - A structural study on a macroglycolipid containing 22 sugars isolated from human erythrocytes II. Eur. J. Biochem., 1976, 68, 185-191.
- 91) GIDDINGS, T.M., BROWER, D.L. and L.A. STAEHELIN. - Visualization of particles complexes in the plasma membrane of microsterias denticulata associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. J. Cell. Biol., 1980, 84, 327-339.

- 92) GILL, D.M. and C.A. KING. - The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. J. Biol. Chem., 1975, 250, 6424-6432.
- 93) GIRARD, N. and L. HIRTH. - Adsorption et pénétration des virus. In "Virologie générale et moléculaire". Doin éditeurs, 1980, p. 193-197.
- 94) GLICKMAN, R.M. and J.F. BOUHOUS. - Characterization, distribution and biosynthesis of the major ganglioside of Rat intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 424, 17-25.
- 95) GOLYNSKAYA, E.L., BASHIROVA, N.V. and N.N. TOMCHUK.- Phytohaemagglutinins from the pistil of primula as possible proteins of generative incompatibility. Fiziol. Rast., 1976, 23, 88-97.
- 96) GOMPERTS, B.D. - Calcium and cell activation. In "Receptors and Recognition" serie A, vol. 2, 1976, 45-102. P. CUATRECASAS, M.F. GREAVES eds. Chapman and Hall London.
- 97) GREAVES, M.F. - Cellular recognition. In "Cellular recognition". M.F. GREAVES ed., London. Chapman and Hall. A. HALSTED, Press Book, J. WILEY and Sons Inc. New York, 1975, 7-72.
- 98) GRUHAGEN, H.H. and J.P. CHANGEUX. - Studies on the electrogenic action of acetylcholine with Torpedo marmorata electric organ. V - Qualitative correlation between pharmacological effects and equilibration processes of the cholinergic receptor protein as revealed by the structural probe. J. Mol. Biol., 1976, 106, 517-535.
- 99) HAINES, T.H. - A proposal on the function of unsaturated fatty acids and ionic lipids. The role of potential compaction in biological membrane. J. theor. Biol., 1979, 80, 307-323.
- 100) HAKOMORI, S.I. and G.D. STRYCHARD. - Investigations on cellular blood-group substances. I - Isolation and chemical composition of blood-group ABH and Le^b isoantigens of sphingoglycolipid nature. Biochemistry, 1968, 7, 1279-1286.

- 101) HAKOMORI, S.I., SIDDIQUI, B., LI, Y.T., LI, S.C. and C.G. HELLERQUIST. - Anomeric structure of globoside and ceramide trihexoside of human erythrocytes and Hamster fibroblasts. J. Biol. Chem., 1971, 246, 2271-2277.
- 102) HAKOMORI, S.I. - Structure and organization of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 417, 55-80.
- 103) HAKOMORI, S.I. - Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. Ann. Rev. Biochem., 1981, 50, 733-764.
- 104) HANFLAND, P. - Characterization of B and H blood group active glycolipids from human B erythrocytes membrane. Chem. Phys. Lip., 1975, 15, 105-124.
- 105) HANSSON, G.C., HEILBRONN, E., KARLSSON, K.A. and B.E. SAMUELSSON. - The lipid composition of the electric organ of the ray Torpedo marmorata, with specific reference to sulfatides and $(Na^+ - K^+)ATPase$. J. Lip. Res., 1979, 20, 509-518.
- 106) HARTH, S., DREYFUS, H., URBAN, P.F. and P. MANDEL. - Direct thin layer chromatography of gangliosides of a total lipid extract. Anal. Biochem 1978, 86, 543-551.
- 107) HASLAM, J.M., SPITHILL, T.M., LINNANE, A.N. and J.B. CHAPPELL. - The effects of altered membrane lipid composition on cation transport by mitochondria of Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J., 1973, 134, 949-957.
- 108) HAYASHI, R., MORIKAWA, H., NAKAJIMA, N., ICHIKAWA, Y. and M. SENDA. - Oriented structure of pectic polysaccharides in pea epidermal cell walls. Plant cell Physiol., 1980, 21, 999-1005.
- 109) HAYWOOD, A.M. - Characteristics of sendai virus receptors in a model membrane. J. Mol. Biol., 1974, 83, 427-436.

- 110) HAYWOOD, A.M. - Fusion of sendai viruses with model membranes.
J. Mol. Biol., 1974, 87, 625-628.
- 111) HERRERO, M. and H.G. DICKINSON. - Pollen tube development in Petunia hybrida following compatible and incompatible intraspecific matings.
J. Cell. Sci., 1981, 47, 365-383.
- 112) HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y. and J. BARBER. - The stigma surface in incompatibility responses. Proc. Roy. Soc., London B, 1975, 188, 287-297.
- 113) HESLOP-HARRISON, J. - Incompatibility and the pollen stigma interaction
Ann. Rev. Plant Physiol., 1975, 26, 403-425.
- 114) HESLOP-HARRISON, J. and Y. HESLOP-HARRISON. - The specialized cuticles of the receptive surfaces of angiosperm stigmas. In "Plant cuticle". D.F. CUTLER, K.L. ALVIN, C.E. PRICE eds., Academic Press, London, 1982, pp. 99-100.
- 115) HICKMAN, J. and E.F. NEUFELD. - A hypothesis for I - cell disease defective hydrolases that do not enter lysosomes. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, 49, 992-999.
- 116) HINATA, K., NISHIO, T. and J. KIMURA. - Comparative studies on S-glycoproteins purified from different S-genotypes in self-incompatible Brassica species. II - Immunological specificities. Genetics, 1982, 100, 649-657.
- 117) HITCHCOCK, C. and B.W. NICHOLS. - In "Plant lipid biochemistry". Academic Press, New York, 1973.
- 118) HITCHCOCK, C. - Structure and distribution of plant acyl lipids. In "Proceedings of the phytochemical society : recent advances in chemistry and biochemistry of plant lipids. T. GALLIARD and E.I. MERCER eds. Academic Press, 1975, 12, 1-19.

- 119) HOLMGREN, J., SVENNERHOLM, L., ELWING, H., FREDMAN, P. and O. STRANNEGARD. - Sendai virus receptor : proposed recognition structure based on binding to plastic adsorbed gangliosides. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1980, 77, 1947-1950.

- 120) HOOD, L., HUANG, H.V. and W.J. DRYER. - The area code hypothesis : the immune system provides clues to understanding the genetics and molecular basis of cell recognition during development. J. supramol. Struct., 1977, 7, 531-559.

- 121) HORWITZ, A.F., HATTEN, M.E. and M.M. BURGER. - Membrane fatty acid replacements and their effect on growth and lectin induced agglutination. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1974, 71, 3115-3119.

- 122) HOWLETT, B.J., KNOX, R.B., PAXTON, J.D. and J. HESLOP-HARRISON. - Pollen wall proteins : physicochemical characterization and role in self incompatibility in Cosmos bipinnatus. Proc. Roy. Soc., London B, 1975, 188, 167-182.

- 123) HOWLETT, B.J., VITHANAGE, H.V. and R.B. KNOX. - Pollen antigens, allergens and enzymes. Current advances in plant science, 1979, 35, 1-17.

- 124) HUGHES, R.C. - The complex carbohydrates of mammalian cell surfaces and their biological roles. Essays in Biochemistry, 1975, 11, 1-36.

- 125) HUGHES, R.C. - Cell surface carbohydrates in relation to receptor activity. In "Glycoconjugate research". J.D. GREGORY, R.W. JEANLOZ eds. Academic Press, New York, 1979, 2, 985-1005.

- 126) IRWIN, C.C. and L.N. IRWIN. - A simple rapid method for ganglioside isolation from small amounts of tissues. Analytical Biochemistry, 1979, 94, 335-339.

- 127) JÄRNEFELT, J., FINNE, J., KRUSIUS, T. and H. RAUVALA. - Protein bound oligosaccharides of cell membranes. Trends Biochem. Sci., 1978, 3, 110-114.

- 128) JOLLIOT, A. and P. MAZLIAK. - 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., 1973, 1, 21-29.
- 129) JONES, M.N. - Hydrogen bonding in cellular cohesion. Febs Lett., 1976, 62, 21-24.
- 130) JONES, P.D. and S.J. WAKIL. - A requirement for phospholipids by microsomal reduced diphosphoridine nucleotide cytochrome c reductase. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5267-5273.
- 131) KARLSSON, K.A. - Studies on sphingosine. Use of TMS ethers for the gas chromatography and mass spectrometry of sphingosine. Acta chem. Scand., 1965, 19, 2425-2427.
- 132) KARLSSON, K.A. - Enzymatic hydrolysis of sphingomyelin : use in structure analysis. Acta chem. Scand., 1968, 22, 3050-3052.
- 133) KARLSSON, K.A. - On the chemistry and occurrence of sphingolipid long chain bases. Chem. Phys. lipids, 1970, 5, 6-43.
- 134) KARLSSON, K.A. - Sphingolipid long chain bases. Lipids, 1971, 5, 878-891.
- 135) KARLSSON, K.A., SAMUELSSON, B.E. and G.O. STEEN. - The lipid composition and (Na^+, K^+) ATPase activity of the salt (nasal) gland of eider Duck and Herring Gull. Eur. J. Biochem., 1974, 46, 243-258.
- 136) KARLSSON, K.A. - Aspects on structure and function of sphingolipids in cell surface membrane. In "Structure of biological membrane". S. ABRAHAMSON, I. PASCHER eds. Plenum Press. New York, London, 1977, pp. 245-274.
- 137) KALZ, A.M., NASH ADLER, P., WATRAS, J., MESSINEO, F.C. and G.F. LOUIS. - Fatty acid : effects on calcium influx and efflux in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 687, 17-26.

- 138) KAUSS, H. - Biosynthesis of pectin and hemicelluloses. In "Plant carbohydrate biochemistry". J.B. BRIDHAM ed. Academic Press, London, 1974, pp. 190-205.
- 139) KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.W., BAUER, W.D. and P. ALBERSHEIM. - The structure of plant cell walls. Plant physiol., 1973, 51, 188-197.
- 140) KEEN, N.T., PARTRIDGE, J.E. and A.I. ZAKI. - Accumulation of wyerone in broadbean and dimethyl-homopterocarpan in jack bean after inoculation with Phytophthora megasperma var. sojae. Phytopathology, 1972, 62, 1365-1366.
- 141) KEENAN, T.W., HUANG, C.M. and D.J. MORRE. - Gangliosides : specific localization in the surface membranes of bovine mammary gland and rat liver. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, 47, 1277-1283.
- 142) KEENAN, T.W. and D.J. MORRE. - Mammary carcinoma : enzymatic block in olisialoganglioside biosynthesis. Science, 1973, 182, 935-937.
- 143) KIEDA, C., DELMOTTE, F. and M. MONSIGNY. - Preparation and properties of glycosylated cytochemical markers. Febs Lett., 1977, 76, 257-261.
- 144) KIND, L.S. and B. NILSSON. - The biological activity of a ragweed arabinogalactan. Immunology, 1967, 13, 477-482.
- 145) KLENK, H.D. and P.W. CHOPPIN. - Glycosphingolipids of plasma membranes of cultured cells and an enveloped virus (SVS) grown in these cells. Proc. Nat. Acad. Sci., 1970, 66, 57-64.
- 146) KNOX, R.B. and J. HESLOP-HARRISON. - Pollen wall proteins : the fate of intine held antigens on the stigma in compatible and incompatible pollination of Phalaris tuberosa L. J. Cell Sci., 1971, 9, 239-251.
- 147) KNOX, R.B., WILLING, R.R. and A.E. ASHFORD. - Role of pollen wall proteins as recognition substances in interspecific incompatibility in poplars. Nature, 1972, 237, 381-383.

- 148) KNOX, R.B. - Pollen wall proteins : cytochemical observations of pollen stigma interaction in ragweed and cosmos (Compositae). J. Cell Sci., 1973, 12, 421-443.
- 149) KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J. and H. HESLOP-HARRISON . - Pollen wall proteins : localization and characterization of gametophytic and sporophytic fractions. In "The biology of the male gamete". J.C. DUCKETT, P.A. RACEY eds. Linnean Soc. of London, Academic Press, 1974, pp. 177-188.
- 150) KNOX, R.B., CLARKE, A., HARRISON, S., SMITH, P. and J.J. MARCHALONIS. - Cell recognition in plants : determinants of stigma surface and their pollen interactions. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A, 1976, 73, 2788-2792.
- 151) KONAR, R.R. and H.F. LINSKENS. - Physiology and biochemistry of the stigmatic fluid of Petunia hybrida. Planta, 1966, 71, 372-387.
- 152) KOSCIELAK, J., PIASEK, A., GORNIAK, H., GARDAS, A. and A. GREGOR. - Structure of fucose containing glycolipids with H and B blood group activity and of sialic acid and glucosamine containing glycolipid of human erythrocyte membrane. Eur. J. Biochem., 1973, 37, 214-225.
- 153) KOVALEVA, L.V., MUSATOVA, N.A. and E.A. BRITIKOV. - Etude du processus de formation de l'autoincompatibilité chez Petunia à l'aide d'inhibiteur du métabolisme protéique et nucléaire. Dokl. Akad. Nauk., 1975, 222, 1470-1473.
- 154) KREBS, J.J.R. - The topology of phospholipids in artificial and biological membranes. Journal of Bioenergetics and biomembranes, 1982, 14, 141-147.
- 155) KROES, H.W. - An enzyme theory of incompatibility. Incompatibility Newsletter, 1973, 2, 5-14.
- 156) KUIPER, P.J.G. - Role of lipids in water and ion transport. In "Recent advances in chemistry and biochemistry of plant lipid". T. GALLIARD and E.T. MERCER eds. Academic Press, London, 1975, pp. 359-386.

- 157) LABARCA, C., KROH, M. and F. LOEWUS. - The composition of stigmatic exudate from Lilium longiflorum. Plant Physiol., 1970, 46, 150-156.
- 158) LABARCA, C. and F. LOEWUS. - The nutritional role of pistil exudate in pollen tube wall formation in Lilium longiflorum. I - Utilization of injected stigmatic exudate. Plant Physiol., 1972, 50, 7-14.
- 159) LABARCA, C. and F. LOEWUS. - The nutritional role of pistil exudate in pollen tube wall formation in Lilium longiflorum. II - Production and utilization of exudate from stigma and stylar canal. Plant Physiol. 1973, 52, 87-92.
- 160) LABAVITCH, J.M. - Cell wall turnover in plant metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 1981, 32, 385-406.
- 161) LAMPORT, D.T.A. - The isolation and partial characterization of hydroxyproline rich glycopeptides obtained by enzymic degradation of primary cell walls. Biochemistry, 1969, 8, 1155-1163.
- 162) LAMPORT, D.T.A. - Cell wall metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 1970, 21, 235-270.
- 163) LAMPORT, D.T.A. - The role of hydroxyproline rich proteins in the extracellular matrix of plant. In "Macromolecules regulating growth and development". D.A. HAY, T.J. KING, J. PAPACONSTANTINOUS eds. Academic Press, New York, 1974, pp. 113-130.
- 164) LAUF, P.K. - Antigen-antibody reactions and cation transport in biomembranes. Immunophysiological aspects. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 173-229.
- 165) LAWSON, J. and H.G. DICKINSON. - The site of the incompatibility reaction in Lilium henryi. Incompatibility Newsletter, 1975, 6, 18-21.
- 166) LAZO, P.S., BARROS, F., DE LA PENA, P. and S. RAMOS. - Ion gradients as candidates for transmembrane signaling. Trends in Biochemical Sciences, 1981, 5, 83-86.

- 167) LENARD, J. and S.J. SINGER. - Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotary dispersion and circular dichroism. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1966, 56, 1828-1833.
- 168) LEWIS, D. - Structure of the incompatibility gene. II - Induced mutation rate. Heredity, 1949, 3, 339-355.
- 169) LEWIS, D. - Structure of the incompatibility gene. III - Type of spontaneous and induced mutation. Heredity, 1951, 5, 399-414.
- 170) LEWIS, D. - Serological reactions of pollen incompatibility substances. Proc. Roy. Soc., London B, 1952, 140, 127-135.
- 171) LEWIS, D. - Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. Adv. Genet., 1954, 6, 235-285.
- 172) LEWIS, D. - A protein dimer hypothesis on incompatibility. In "Genetics to day". S.J. GEERTS ed., Proc. 11th Int. Congr. Genet. Pergamon Press, London, 1965, 3, 657-663.
- 173) LEWIS, D. - Incompatibility in flowering plants. In "Receptors and recognition", P. CUATRECASAS, M.F. GREAVES eds. Chapman and Hall, London, 1976, vol. 2, serie A, p. 167-198.
- 174) LIENER, I.E. - Phytohemagglutinins. Ann. Rev. Plant Physiol., 1976, 27, 291-319.
- 175) LINDER, R. - L'incompatibilité dans Oenothera missouriensis Sims, Ann. amel. plantes., 1952, 2, 189-213.
- 176) LINSKENS, H.F., SCHRAUWENS, J.A. and M. VANDERDONK. - Überwindung der Selbstinkompatibilität durch Röntgenbestrahlung des Griffels. Naturwissensch., 1960, 46, 547-551.
- 177) LINSKENS, H.F. - The influence of castration on pollen tube growth after self-pollination. In "Pollen physiology and Fertilization". H.F. LINSKENS ed. Amsterdam, North-Holland, 1964, pp. 230-236.

- 178) LINSKENS, H.F. - Biochemistry, of incompatibility. Proc. 11th Int. Congr. Genet. The Hague. In Genetics to day. Ed. S.J. GEERTS, 1965, 3, 621-636.
- 179) LINSKENS, H.F. and M. KROH. - Pollen. In "Encyclopedia of plant physiology". W. RUHLAND ed. Berlin Heidelberg, New York, Springer, 1967, p. 506-530.
- 180) LINSKENS, H.F., HAVEZ, R., LINDER, R., SALDEN, M., RANDOUX, A., LANIEZ, D. and D. COUSTAUT. - Etude des glycanne-hydrolases au cours de la croissance du pollen chez Petunia hybrida auto-incompatible. Bull. Soc. Pharm. France du Nord, 1970, 1, 1-16.
- 181) LINSKENS, H.F. - The reaction of inhibition during incompatible pollination and its elimination. Sovjet plant physiol., 1972, 20, 156-166.
- 182) LINSKENS, H.F. and A.W. SPANGERS. - Changes in the electrical potential in the transmitting tissue of Petunia styles after cross and self pollination. Incompatibility Newsletter, 1973, 3, 81-85.
- 183) LINSKENS, H.F. - The physiological basis of incompatibility in angiosperms. In "The biology of the male gamete". J.C. DUCKETT, P.A. RACEY eds. Linnean Soc. of London, Academic Press, 1975, 143-152.
- 184) LINSKENS, H.F. - Incompatibility in Petunia. Proc. Roy. Soc., London B, 1975, 188, 299-311.
- 185) LIS, H. and N. SHARON. - The biochemistry of plant lectins. Ann. Rev. Biochem., 1973, 42, 541-574.
- 186) LOEWUS, F. and C. LABARCA. - Pistil secretion product and pollen tube wall formation. In "Biogenesis of plant cell wall polysaccharides". F. LOEWUS ed. Academic Press, 1973, pp. 175-193.
- 187) LUCY, J.A. - Globular lipid micelles and cell membranes. J. theor. Biol., 1964, 7, 360-364.

- 188) LUNDEN, R. - A short introduction to the litterature on pollen chemistry. Svensk. kem. Tidstr., 1954, 66, 201-213.
- 189) LUNDQUIST, A. - The genetics of incompatibility. In "Genetics to day". S.J. GEERTS ed. Proc. 11th Int. Congr. Genet. The Hague, 1965, 3, 637-647.
- 190) LUNDQUIST, A. - Autoincompatibility and breeding. Genetica Agraria, 1969, 23, 365-380.
- 191) MACKIE, W., SELLEN, D.B. and J. SUTCLIKKE. - Spectral broadening of lighth sachered from polysaccharide gel. Polymer, 1978, 19, 9-16.
- 192) MAGGIO, B., CUMAR, F.A. and R. CAPUTTO. - Molecular behaviour of glycosphingolipids in interfaces, possible participation in some properties of nerve membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 650, 69-87.
- 193) MAINO, V., GREEN, N.M. and M.J. CRUMPTON. - The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. Nature, 1974, 251, 324-327.
- 194) MARX, J.L. - Looking at lectins. Do they function in recognition processes. Science, 1977, 196, 1429-1431.
- 195) MASCARENHAS, J.P. - The biochemistry of angiosperm pollen development. Botanical Review, 1975, 41, 259-314.
- 196) MATHER, K. - Specific differences in Petunia. I - Incompatibility. J. Genet., 1943, 45, 215-235.
- 197) MATTSON, O., KNOX, R.B., HESLOP-HARRISON, J. and Y. HESLOP-HARRISON. - Pollen pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. Nature (London), 1974, 247, 298-300.

- 198) MAZLIAK, P. - Glyco- and phospholipids of biomembrane in higher plants. In "Lipids and lipid polymers in higher plants". M. TEVINI and H.K. LICHTENTHALER eds. Springer Verlag. Berlin. 1977, p. 48-74.
- 199) MEADE, C.J. and J. MERTIN. - Fatty acids and immunity. Adv. in lipid research, 1978, 16, 127-166.
- 200) MERRELL, R., GOTTLIEB, D.I. and L. GLASER. - Membrane as tool for the study of cell surface recognition. In "Neuronal recognition". S.H. BARONDES ed., Chapman and Hall. London, 1976, pp. 249-272.
- 201) MONTREUIL, J. - Primary structure of glycoprotein glycans : basis for the molecular biology of glycoproteins. Adv. carbohyd. chem. Biochem., 1980, 37, 157-223.
- 202) MONTREUIL, J. - Glycoproteins. In "Comprehensive Biochemistry" A. NEUBERGER, L.C.M. VAN DEENAN eds. Elsevier Scientific publishing Compagny Amsterdam, Oxford, New York, 1982, 19 B.
- 203) MOORE, R. - Graft compatibility-incompatibility in higher plants. In "What's new in plant physiology", 1981, 12, 13-16.
- 204) MOORE, T.S. - Phospholipid biosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol., 1982, 33, 235-259.
- 205) MOREAU, F., DUPONT, J. and C. LANCE. - Phospholipid and fatty acid composition of outer and inner membranes of plant mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 345, 294-304.
- 206) MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, I.H., HICKMAN, J. and G. ASHWELL. - The role of sialic Acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. J. Biol. Chem., 1971, 246, 1461-1467.

- 207) MORELL, P. and P. BRAUN. - Biosynthesis and metabolic degradation of sphingolipids not containing sialic acid. J. lip. Res., 1972, 13, 293-310.
- 208) MORRE, D.J. and W.J. VANDER WOUDE. - Origin and growth of cell surface components. In "Macromolecules regulating growth and development". E.D. HAY, T.J. KING, J. PAPACONSTANTINOU eds. Academic Press, 1974, pp. 81-112.
- 209) MORRE, D.J. - Membrane biogenesis. Ann. Rev. plant Physiol., 1975, 26, 441-481.
- 210) MORRE, D.J., KARTENBECK, J. and W.W. FRANKE. - Membrane flow and inter-conversions among endomembranes. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 559, 71-152.
- 211) MORRIS, E.R., REES, D.A., YOUNG, G., WALKINSHAW, M.D. and A. DARKE. - Order-disorder transitions for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between Xanthomonas pathogen and its plant host. Mol. Biol., 1977, 110, 1-16.
- 212) MOYA, F., SILBERT, D.F. and L. GLASER. - The relation of temperature and lipid composition to cell adhesion. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 550, 485-499.
- 213) MUELLER, S.G. - Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. J. Cell. Biol., 1980, 84, 315-326.
- 214) MULLIN, B.R., FISHMAN, P.H., LEE, G., ALOJ, S.M., LEDLEY, F.D., WINAND, R.J., KOHN, L.D. and R.O. BRADY. - Thyrotropin ganglioside interactions and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1976, 73, 842-846.
- 215) NAIKI, N., FONG, J., LEDEEN, R. and D.M. MARCUS. - Structure of the human erythrocyte blood group P₁ glycosphingolipid. Biochemistry, 1975, 14, 4831-4837.

- 216) NAKANISHII, I. and K. HINATA. - An effective time for CO₂ gas treatment in overcoming self incompatibility in Brassica. Plant Cell. Physiol., 1973, 14, 873-879.
- 217) NARIMSHAM, R., HAY, J.B., GREAVES, M.F. and R.K. MURRAY. - Studies on the glycolipids of sheep Thymus and of normal and concanavalin A stimulated sheep peripheral lymphocytes. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 431, 578-591.
- 218) NASRALLAH, M.E. and D.H. WALLACE. - Immunogenetics of self incompatibility in Brassica oleracea L. Heredity, 1967, 22, 519-527.
- 219) NASRALLAH, M.E. and D.H. WALLACE. - Immunochemical detection of antigens in self incompatibility genotypes of cabbage. Nature, 1967, 213, 700-701.
- 220) NASRALLAH, M.E., BARBER, J.T. and D.H. WALLACE. - Self incompatibility proteins in plants : detection, genetics and possible mode of action. Heredity, 1970, 25, 23-27.
- 221) NASRALLAH, M.E., WALLACE, D.H. and R.M. SAVO. - Genotype, protein, phenotype relationship in self incompatibility of Brassica. Genet. Res. Camb., 1972, 20, 151-160.
- 222) NASRALLAH, M.E. - Genetic control of quantitative variation in self incompatibility proteins detected by immunodiffusion. Genetics, 1974, 76, 46-50.
- 223) De NETTANCOURT, D. - Self incompatibility in basic and applied researches with higher plants. Genetica Agraria, 1972, 26, 163-216.
- 224) De NETTANCOURT, D., DEVREUX, M., BOZZINI, A., CRESTI, M., PACINI, E. and G. SARFATTI. - General and ultrastructural aspects of self incompatibility mechanism in Lycopersicum peruvianum Mill. J. Cell. Sci., 1973, 12, 403-419.
- 225) De NETTANCOURT, D. - Incompatibility in angiosperms. In "Incompatibility in angiosperms". De NETTANCOURT, D. ed. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1977.

- 226) NICOLSON, G.L. and S.J. SINGER. - Ferritin conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy : application to saccharides bound to cell membranes. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1971, 68, 942-945.
- 227) NICOLSON, G.L. and S.J. SINGER. - The distribution and asymetry of mammalian cell surface saccharide utilizing ferritin conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains. J. Cell. Biol., 1974, 60, 236-248.
- 228) NISHIO, T. and K. HINATA. - Analysis of S-specific proteins in stigma of Brassica oleracea L. by isoelectric focusing. Heredity, 1977, 38, 391-396.
- 229) NISHIO, T. and K. HINATA. - Stigma proteins in self incompatible Brassica campestris L. and self compatible relatives with special reference to S allele specificity. Jap. J. Genet., 1978, 53, 27-34
- 230) NISHIO, T. and K. HINATA. - Purification of an S specific glycoprotein in self incompatible Brassica campestris. Jap. J. Genet., 1979, 54, 307-311.
- 231) NISHIO, T. and K. HINATA. - Rapid detection of S-glycoproteins of self-incompatible Crucifers using ConA reaction. Euphytica, 1980, 29, 217-221.
- 232) NISHIO, T. and K. HINATA. - Comparative studies on S glycoproteins purified from different S genotypes in self incompatible Brassica species : I - Purification and chemical properties. Genetics, 1982, 100, 641-647.
- 233) NISHIZUKA, Y. - Phospholipid degradation and signal translation for protein phosphorylation. Trends in Biochemical Sciences, 1983, 8, 13-16.
- 234) NORTHOCOTE, D.H. - Sites of synthesis of the polysaccharides of the cell wall. In "Plant carbohydrate biochemistry". J.B. BRIDHAM ed. Academic Press (London), 1974, pp. 165-181.

- 235) NUDELMAN, E., HAKOMORI, S.I., KNOWLES, B.B., SOLTER, D., NOWINSKI, R.C., TAM, M.R. and W.W. YOUNG. - Monoclonal antibody to the stage-specific embryonic antigen (SSEA 1) reacts with a branched glycosphingolipid similar in structure to I₁ antigen. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 97, 443-451.
- 236) OCKENDON, D.J. - Pollen tube growth and the site of the incompatibility reaction in Brassica oleracea. New Phytol., 1972, 71, 519-522.
- 237) OCKENDON, D.J. - Effect of hexane and humidity on self incompatibility in Brassica oleracea. Theor. Appl. Genet., 1978, 52, 113-119.
- 238) OPPENHEIMER, S.B. - Functional carbohydrate in teratoma cell adhesion factor. J. Cell. Biol., 1974, 63, 251-263.
- 239) PANDEY, K.K. - Time and site of the S gene action, breeding systems and relationships in incompatibility. Euphytica, 1970, 19, 364-372.
- 240) PARSONS, D.F. and J.R. SUBJECK. - The morphology of the polysaccharide coat of mammalian cells. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 265, 85-113.
- 241) PASCHER, I. - Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramides, and their implication on membrane stability and permeability. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 455, 433-451.
- 242) PICTON, J.M. and M.W. STEER. - A model for the mechanism of tip extension in pollen tubes. J. Theor. Biol., 1982, 98, 15-20.
- 243) PRESTON, D.R. - The physical biology of plant cell walls. In "The physiology of plant cell walls". D.R. PRESTON ed. Chapman and Hall, 1974.
- 244) PRESTON, D.R. - Polysaccharide conformation and cell function. Ann. Rev. Plant Physiol., 1979, 30, 55-78.
- 245) RAFF, J. and R.B. KNOX. - Self incompatibility in sweet cherry. Incompatibility Newsletter, 1977, 8, 36-39.
- 246) RAMULU, R.S., BREDEMEIJER, G.M.M., DIJKHUIS, P., De NETTANCOURT, D. and H. SCHIBILLA. - Mentor pollen effects on gametophytic incompatibility in Nicotiana, Oenothera and Lycopersicum. Theor. Appl. Genet., 1979, 54, 215-218.

- 247) RAIJVALA, H. and J. FINNE. - Structural similarity of the terminal sequences of glycoproteins and glycolipids. Febs Letters, 1979, 97, 1-8.
- 248) RESCH, K. - Membrane associated events in Lymphocyte activation. In "Receptors and recognition". serie A, n° 1. P. CUATRECASAS, M.F. GREAVES eds. Chapman and Hall (London), 1976, pp. 61-117.
- 249) ROBARDS, A.W. - Plasmodesmata. Ann. Rev. Plant Physiol., 1975, 26, 13-29.
- 250) De ROBERTIS, E. - Les protéines des récepteurs synaptiques : isolation et reconstitution dans les membranes artificielles. Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 1975, 73, 9-38.
- 251) ROBERTS, I., STEAD, A.D. and H.G. DICKINSON. - No fundamental changes in lipids of the pollen grain coating of Brassica oleracea following self or cross pollination. Incompatibility Newsletter, 1979, 11, 77-83.
- 252) ROBERTS, I.N., STEAD, A.D., OCKENDON, D.J. and H.G. DICKINSON. - Glycoprotein associated with the acquisition of the self incompatibility system by maturing stigmas of Brassica oleracea. Planta, 1979, 146, 179-183.
- 253) ROBERTS, I.N., STEAD, A.D., OCKENDON, D.J. and H.G. DICKINSON. - Pollen stigma interaction in Brassica oleracea. Theor. Appl. Genet., 1980, 58, 241-246.
- 254) ROGGEN, H.P.J.R. - Electric aided pollination, a method of breaking incompatibility in Brassica oleracea. Euphytica, 1972, 21, 1-10.
- 255) ROGGEN, H.P.J.R. - Pollen washing influences compatibility in Brassica oleracea varieties. In "Fertilization in higher plants". H.F. LINSKENS ed. Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1974, pp. 273-278.
- 256) ROGGEN, H.P.J.R. - Stigma application of an extract from rape pollen (Brassica napus L.) affects self incompatibility in Brussel sprouts (Brassica oleracea L. var. gemmifera D.C.). Incompatibility Newsletter, 1975, 6, 80-84.

- 257) ROGGEN, H.P.J.R. - Stigma application of paraffin oil overcomes self incompatibility in Brassica. Incompatibility Newsletter, 1979, 11, 76-76.
- 258) ROLAND, J.C. and B. VIAN. - The wall of the growing plant cell : its three dimensional organization. Internation. Rev. Cytol., 1979, 61, 129-166.
- 259) ROSEMAN, S. - The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. Chem. Phys. Lip., 1970, 5, 270-297.
- 260) ROSEN, W.G. - Ultrastructure and physiology of pollen. Ann Rev. Plant Physiol., 1968, 19, 435-462.
- 261) ROTH, S., Mac GUIRE, E.J. and S. ROSEMAN. - An assay for intercellular adhesive specificity. J. Cell. Biol., 1971, 51, 525-547.
- 262) ROTHMAN, J.E. and H.F. LODISH. - Synchronized transmembrane insertion and glycosylation of a nascente membrane protein. Nature, 1977, 269, 775-780.
- 263) RUTISHAUSER, U., THIERY, J.P., BRACKENBURY, R., SELA, B.A. and G.M. EDELMAN. - Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1976, 73, 577-581.
- 264) SCHAUER, R. - Characterization of sialic acids. Methods of enzymology, 1978, 50, 64-89.
- 265) SAKAKIBARA, K., MOMOI, T., UCHIDA, T. and Y. NAGAI. - Evidence for association of glycosphingolipid with a colchicinesensitive microtubule like cytoskeletal structure of cultured cells. Nature, 1981, 293, 76-79.
- 266) SANDERMANN, H. - Lipid dependent membrane enzymes. A kinetic model for cooperative activation in the absence of cooperativity in lipid binding. Eur. J. Biochem., 1982, 127, 123-128.

- 267) SCHMALZING, G. and P. KUTSCHERA. - Modulation of ATPases activities of human erythrocytes membranes by free fatty acids or phospholipase A₂. J. membrane Biol., 1982, 69, 65-77.
- 268) SCHMIDT, E.L. - Initiation of plant root microbe interaction. Ann. Rev. Microbiol., 1979, 33, 355-376.
- 269) SCHNEPF, E., DEICHGRABER, G. and W. HERTH. - Development of cell wall appendages in Acanthosphaera zacchariasi : kinetics, site of cellulose synthesis and microfibril assembly and bard formation protoplasma. Protoplasma, 1982, 110, 203-214.
- 270) SCHRADER, J.W., CUNNINGHAM, B.A. and G.M. EDELMAN. - Functional interactions of viral and histocompatibility antigens at tumor cell surfaces. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1975, 72, 5066-5069.
- 271) SEARS, E.R. - Cytological phenomena connected with self sterility in the flowering plants. Genetics, 1937, 22, 130-131.
- 272) SEDGELEY, M. - Assessment of serological techniques for S allele identification in Brassica oleracea. Euphitic, 1974, 543-551.
- 273) SELVENDRAN, R.R. - Cell wall glycoproteins and polysaccharides of parenchyma of Phaseolus coccineus. Phytochemistry, 1975, 14, 2175-2180.
- 274) SEQUEIRA, L. - Lectins and their role in host pathogen specificity. Ann. Rev. Phytopathol., 1978, 16, 435-481.
- 275) SHAPIRO, B.M., SCHACKMANN, R.W. and C.A. GABEL. - Molecular approaches to the study of fertilization. Ann. Rev. Plant Physiol., 1981, 50, 815-843.
- 276) SHARON, N. and H. LIS. - Lectins : cell agglutinating and sugar specific proteins. Science, 1972, 177, 949-959.
- 277) SHAROM, F.J. and C.W.M. GRANT. - GSL in membrane architecture. J. supramolecular structure, 1977, 6, 249-258.

- 278) SHAROM, F.J. and C.W.M. GRANT. - A model for gangliosides behaviour in cell membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 507, 280-293.
- 279) SHIVANNA, K.R. and N.S. RANGASWAMY. - Overcoming self incompatibility in Petunia axillaris. I - Delayed pollination, pollination with stored pollen and bud pollination. Phytomorphology, 1969, 19, 372-380.
- 280) SIDDIQUI, B. and S.I. HAKOMORI. - A revised structure for the Forssman glycolipid hapten. J. Biol. Chem. 1971, 246, 5766-5769.
- 281) SINGER, S.J. and G.L. NICOLSON. - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972, 175, 720-731.
- 282) SINGER, S.J. - The fluid mosaic model of membrane structure. In "Structure of biological membrane". S. ABRAHAMSON, I. PASCHER eds. Plenum Press, New York, London, 1977, pp. 443-462.
- 283) SITTE, P. - Functional organization of biomembranes. In "Lipids and lipid polymers in higher plants". M. TEVINI, H.K. LICHTENTHALER eds. Springer Verlag, Berlin, 1977, p. 1-28.
- 284) SLOMIANY, A. and B.L. SLOMIANY. - Water soluble GSL of dog gastric mucosa. Characterization of a branched ceramide hepta saccharide. Eur. J. Biochem., 1977, 76, 491-498.
- 285) STEAD, A.D., ROBERTS, I.N. and H.G. DICKINSON. - Pollen-pistil interaction in Brassica oleracea evens prior to pollen germination. Planta, 1979, 146, 211-216.
- 286) STEAD, A.D., ROBERTS, I.N. and H.G. DICKINSON. - Pollen-stigma interaction in Brassica oleracea : the role of stigmatic proteins in pollen grain adhesion. J. Cell. Sci., 1980, 42, 417-423.
- 287) STECK, Th.L. and G. DAWSON. - Topological distribution of complex carbohydrates in the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem., 1974, 249, 2135-2142.

- 288) STEINHARDT, R.A., EPEL, D., CARROLL, E.J. and R. YANAGIMACHI. -
Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs ?
Nature, 1974, 252, 41-43.
- 289) STOUT, A.B. - Fertility in Cichorium intybus : the sporadic occurrence
of self fertile plants among the progeny of self sterile plants.
Am. J. Botan., 1917, 4, 375-395.
- 290) STUIVER, C.E.E., KUIJPER, P.J.C., MARSCHNER, H. and A. KYLIN. -
Effects of salinity and replacement of K^+ by Na^+ on lipid composition
in two sugar-beet inbred lines. Physiol. plant, 1981, 52,
77-82.
- 291) TAKI, T., HIRABAYASHI, Y., ISHIWATA, Y., MATSUMOTO, M. and K. KOJIMA. -
Biosynthesis of different gangliosides in two types of rat ascites
hepatoma cells with different degrees of cell adhesiveness.
Biochim. Biophys. Acta, 1979, 572, 113-120.
- 292) TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., BAUER, W.D. and P. ALBERSHEIM. - Plant
cell walls. Plant Physiol., 1975, 51, 158-173.
- 293) TOPPAN, A., ROBY, D. and M.T. ESQUERRETUGAYE. - Cell surfaces in
plant microorganisms interactions. III - in vivo effect of ethylene
on hydroxyproline rich glycoprotein accumulation in the wall of
diseased plants. Plant Physiol., 1982, 70, 82-86.
- 294) TOWNSEND, C.E. - Advances in study of incompatibility. In "Pollen :
development and physiology, J. HESLOP-HARRISON ed., London
Butterworth, 1971, 281-309.
- 295) TU, J.C. - Cellulose fibrils in the primary wall of white clover
as revealed by freeze-fracture and freeze etch. Cytobios., 1981,
32, 189-202.
- 296) TURNER, R.S. and M.M. BURGER. - Involvement of a carbohydrate group
in the active site for surface guided reassociation of animal cells.
Nature, 1973, 244, 509-510.

- 297) UMBREIT, J. and S. ROSEMAN. - A requirement for reversible binding between aggregating embryonic cells before stable adhesion. J. Biol. Chem., 1975, 250, 9360-9368.
- 298) VAKIRTZI-LEMONIAS, C. and G.R.P. EVANGELATOS. - Effect of puromycin and cycloheximide in GSL biosynthesis by PHA stimulated human lymphocytes. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1978, 85, 1488-1495.
- 299) VAN DEENEN, L.L.M., DE GIER, J., VAN GOLDE, L.M.G., NAUTA, I.L.D., RENOOCY, W., VERKLEIJ, A.J. and R.F.A., ZWAAL. - Some topological and dynamic aspects of lipids in the erythrocyte membrane. In "Structure of biological membrane". S. ABRAHAMSON, I. PASCHER eds. Plenum Press, New York, London, 1977, 107-118.
- 300) VAN DER DONK, J.A.W.M. - Differential synthesis of RNA in self and cross pollinated styles of Petunia hybrida L. Mol. Gen. Genet., 1975 a, 131, 1-8.
- 301) VAN DER DONK, J.A.W.M. - Recognition and gene expression during incompatibility reaction in Petunia hybrida. Mol. Gen. Genet., 1975 b, 141, 305-317.
- 302) VANDERKOOI, G. and D.E. GREEN. - Biological membrane structure. I - The protein crystal model for membranes. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1970, 66, 615-619.
- 303) VAN HEYNINGEN, W.E. - Gangliosides as membrane receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. Nature, 1974, 249, 415-417.
- 304) VASIL, I.K. - The histology and physiology of pollen germination and pollen tube growth on the stigma and in the style. In "Fertilization in higher plants. H.F. LINSKENS ed. Amsterdam, North-Holland, Publ. Co., 1974, pp. 105-118.
- 305) VERNAY, M., CORNIC, M., AUBREY, M. and R. BOURRILLON. - Relationship between regeneration of cell surface glycoproteins in trypsin treated chick embryo fibroblasts and cell adhesion to substratum. Experientia, 1978, 34, 736-737.

- 306) VICKER, M.G. and D.R. CRITCHLEY. - Glycolipids as cell surface receptors and their role in cell social behaviour. Biochem. Soc. transaction, 1977, 5, 1995-1700.
- 307) VILLEMEZ, C.L. - The relation of plant enzyme catalysed β -(1-4)-glucan synthesis to cellulose biosynthesis in vivo. In "Plant carbohydrate biochemistry". J.B. BRIDHAM ed. Academic Press, London, 1974, 182-189.
- 308) VITETTA, E.S. and J.W. UHR. - Immunoglobulin receptors revisited. Science, 1975, 189, 964-969.
- 309) WAKSMAN, A., HUBERT, P., CREMEL, G., RENDON, A. and C. BURGUN. - Translocation of proteins through biological membranes : a critical view. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 604, 249-296.
- 310) WALLACH, D.F.H. and H. FISCHER. - In "The dynamic structure of cell membrane". Berlin Heidelberg, New York, 1971.
- 311) WATANABE, K., DRZENIEK, Z. and E. LISOWSKA. - The amino acids of M and N blood group glycopeptides are different. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 76, 385-390.
- 312) WATKINS; W.M. - Blood group substances. Science, 1966, 152, 172-181.
- 313) WEISENSEEL, M.H. and L.H. JAFFE. - The major growth current through lily pollen tubes enters as K^+ and leaves as H^+ . Planta, 1976, 133, 1-7.
- 314) WHIPPLE, A.P. and J.P. MASCARENHAS. - Lipid synthesis in germinating Tradescantia pollen. Phytochemistry, 1978, 17, 1273-1274.
- 315) WIEGANDT, H. - Glycosphingolipids. Advance in lipid research, 1971, 9, 249-289.
- 316) WOJTCZAK, L. - Effect of fatty acids and acyl-CoA on the permeability of mitochondrial membranes to monovalent cations. Febs Lett, 1974, 44, 25-30.

- 317) YAHARA, I. and G.M. EDELMAN. - Modulation of lymphocyte receptor mobility by locally bound concanavalin A. Proc. Nat. Acad. Sci., 1975, 72, 1579-1582.
- 318) YOHE, H.C., ROARK, D.E. and A. ROSENBERG. - Sphingosine as a determining factor in aggregation of gangliosides. J. Biol. Chem., 1976, 251, 7083-7087.
- 319) ZALC, B., CRAVES, F.B., MONGE, M., LOH, H.H. and N.A. BAUMANN. - Immunohistochemical evidence for the involvement of sulfogalactosylceramide in the opiate receptor. In "Affinity chromatography and molecular interactions". J.M. EGLY ed., INSERM, 1979, 86, 423-430.
- 320) ZINKERNAGEL, R.F. and P.C. DCHERTY. - Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic Chorio meningitis. Nature, London, 1974, 251, 547-549.

LISTE DES PUBLICATIONS CITEES DANS LES RESULTATS

PUBLICATION I

Soc. bot. Fr., Actualités botaniques, 1973, n° 1-2, 69-77.

Quelques aspects du métabolisme des glycosphingolipides des styles et du pollen chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible

PAR D. COUSTAUT ⁽¹⁾, H.F. LINSKENS ⁽²⁾, Y. MOSCHETTO ⁽³⁾
et C. DELBART ⁽⁴⁾

Résumé. — La participation des glycosphingolipides au métabolisme particulier présenté par l'incompatibilité gamétophytique chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible, est envisagée. La distribution et l'évolution des glycosphingolipides totaux, acides et neutres, sont analysées dans les pollens et les styles (vierges, auto et xéнопollinisés) par de nombreuses techniques chromatographiques et fluorimétriques en fonction de la pollinisation compatible et incompatible. La composition en acides gras des glycosphingolipides neutres montre l'importance de la participation des glycosphingolipides dans le métabolisme de l'incompatibilité.

Summary. — The participation of glycosphingolipids in the metabolism of the gametophytic incompatibility reaction in the self-compatible species *Petunia hybrida* has been investigated. The distribution and the concentration changes of total glycosphingolipids, as well as the acid and neutral fractions, were analyzed in the pollen and styles after self- and cross-pollination. These were compared to the glycosphingolipids composition of unpollinated styles. The composition of the fatty acids of the neutral glycosphingolipids changed dramatically, so that the involvement of these substances in the metabolism of the incompatibility reaction seems possible.

..

Les glycosphingolipides constituent une classe de lipides complexes azotés qui, bien que largement distribués chez les êtres vivants, demeurent mystérieux notamment dans le monde végétal où leur fonction et leur métabolisme n'ont fait l'objet que de travaux limités.

Il nous a paru intéressant d'analyser leur participation au métabolisme dans le cadre d'un processus physiologique actif, l'incompatibilité gamétophytique de fécondation qui se concrétise par l'inhibition de croissance du tube pollinique incompatible dans le style présentant les mêmes allèles d'incompatibilité.

(1) Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, 59045 Lille Cedex.

(2) Institut de Botanique, Faculté des Sciences, Université de Nimègue (Pays-Bas), Toernooiveld.

(3) Centre de Technologie Bio-médicale, INSERM, 27, rue C. Guérin, 59000 Lille.

(4) I.U.T. Université des Sciences et Techniques, 59650 Villeneuve-d'Ascq.

I — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) *Matériel.*

Nous avons utilisé les styles vierges, autopolinisés et xéno-pollinisés, ainsi que le pollen de *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible, clones W 166 K avec les allèles d'incompatibilité S1 S2, et T 2 U avec les allèles d'incompatibilité S3 S3, cultivés dans le Jardin Botanique de l'Université de Nimègue.

B) *Méthodes.*

Omniprésents dans toutes les structures vivantes mais selon des concentrations extrêmement faibles, l'obtention, la purification et le fractionnement des glycosphingolipides exigent une grande multiplicité de techniques schématisées dans les étapes suivantes :

- Extraction des lipides totaux selon FOLCH [1, 2] modifié par KARLSSON [3].

- Extraction des glycosphingolipides totaux après méthanolyse alcaline ménagée [4].

- Purification et fractionnement des glycosphingolipides totaux par couplage de différentes techniques chromatographiques [3] : d'adsorption sur colonne d'acide silicique [5], d'échange ionique sur colonne de diéthylamino-ethyl-cellulose (DEAE — cellulose) [3], d'adsorption, à nouveau, sur colonne d'acide silicique afin de purifier et de fractionner les glycolipides neutres et acides précédemment obtenus après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

Des chromatographies unidimensionnelle, ascendante, en couche mince de gel de silice G [6] permettent le contrôle des extractions, des purifications et l'identification des céramides et cérébrosides dans les conditions suivantes : activation d'une heure à + 110 °C ; solvant de migration [7] : chloroforme — méthanol — eau (65 : 25 : 4 V/V/V) ; réactifs d'identification : vapeurs d'iode, solution de Rhodamine 6 G [8] et examen en lumière ultra violette : solution hydro-méthanolique d' α — naphthol sulfurique [9].

- Dosage fluorimétrique après méthanolyse des glycosphingolipides totaux et formation d'un complexe avec la fluorescamine [10].

- Chromatographie en phase gazeuse (CGL) appliquée :

- 1) aux acides gras des glycosphingolipides neutres libérés par hydrolyse acide [11] transméthylation et purification [12] par couche mince dans le benzène ;

- 2) aux oses selon [3].

II — RÉSULTATS

1) *Des dosages fluorimétriques des glycosphingolipides totaux, neutres et acides.*

A) La fluorimétrie a été appliquée aux glycosphingolipides totaux obtenus par hydrolyse alcaline des lipides totaux. Ce mode de dosage est basé sur la mesure de la fluorescence développée par le complexe sphingosine, libérée par

TABLEAU 1. — Comparaison de la variation des teneurs en glycosphingolipides dans les pollens, styles vierges autopolinisés et xéнопollinisés.

MATÉRIEL	GSL TOTAUX		GSL NEUTRES DANS LES FRACTIONS					ACIDES GRAS DES GSL NEUTRES EXPRIMÉS EN %										SUCRES DES GSL NEUTRES EXPRIMÉS EN %								
	N. moles par g de pollen sec	N. moles total	céramides	monoglycosyl céramides	cétriénoïdes	cétriénoïdes	lipides pu- raires.	C 14	C 15	C 16	C 17	C 18	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20	C 22	C 24	Cic	Man						
Style vierges W166K	522.1	1,000	227.7	18.14	180.1	30.05	27.4	5.78	19.4	4.18	10.50	3.01	2.76	1.74	1.84	22.10	3.28	1.46	15.31	14.10	6.64	2.44	1.82	99.34		
Pollen W166K	653.8	1,352	185.4	30.33	200.7	32.84	89.6	14.66	77.9	12.75	57.5	9.41	2.06	0.98	0.92	20.3	2.74	0.73	7.73	6.41	0.26	7.46	1.26	27.14	4.75	
Pollen T2U	568.5	1,088	158.2	30.87	215.2	41.98	50.9	9.93	54.1	10.55	34.2	6.66	2.05	0.76	1.00	19.2	4.27	0.46	4.98	4.25	2.4	4.16	2.65	35.85	6.80	
Style autopolinisés W166K x W166K	310.8	0,661	114.6	37.88	100.1	35.64	29.9	9.89	24.1	7.94	26.2	8.63	1.64	0.13	1.80	13.2	2.06	1.27	7.47	9.77	5.21	5.66	13.4	25.22	99.88	0.11
Style xéнопollinisés W166K x T2U	513.6	0,983	1,000	206.1	41.92	176.5	35.89	54.6	11.10	34.5	7.01	19.9	1.11	2.16	1.07	16.2	2.29	1.32	8.11	8.39	9.79	4.93	10.63	47.80	99.98	Trace
Style autopolinisés 24U W166K x W166K	421.5	0,807	0,815	128.8	32.72	186.4	47.35	34.2	8.08	25.6	6.51	18.6	0.26	0.20	0.09	1.44	2.14	0.14	0.80	3.48	2.36	1.26	15.55	52.26	46.39	3.53
Style xéнопollinisés 24U W166K x T2U	516.6	0,939	1,000	151.9	20.26	443.1	59.10	71.9	9.00	60.9	6.80	31.6	1.06	1.13	1.47	10.9	0.66	0.71	12.30	30.63	18.71	4.36	3.09	9.17	97.04	2.82
Style autopolinisés 24U T2U x T2U	636.5	0,811	100.8	29.63	263.1	43.12	67.1	10.99	48.5	7.95	50.6	8.29														
Style xéнопollinisés 24U T2U x W166K	788.3	1,000	223.1	29.16	347.9	45.47	62.1	8.12	73.7	9.64	58.2	7.60														



hydrolyse et la fluorescamine [8]. Les lectures sont effectuées pour des λ d'excitation de 385 nm et d'émission de 480 nm.

Les résultats des dosages des glycosphingolipides totaux sont consignés dans le tableau 1. Les teneurs, exprimées en n moles/g de tissu lyophilisé, sont très variables suivant que l'on compare styles vierges et pollens d'une part, styles vierges ou styles pollinisés (auto et xénopollinisés) d'autre part.

Styles vierges et styles xénopollinisés ont des teneurs équivalentes, inférieures à celles des pollens S1 S2 et S3 S3. L'autopollinisation s'accompagne, malgré l'apport pollinique, d'une diminution des teneurs en glycosphingolipides totaux beaucoup plus marquée au début de la réaction (0 à 8 h) qu'à la fin (24 h). Les résultats des dosages sont identiques avec les styles autopollinisés (S3 S3). S3.

B) Une partie aliquote des glycosphingolipides acides élués en chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose par le méthanol-chlorure de Lithium sont dosés par fluorimétrie et les résultats des dosages rapportés dans le tableau 2.

On y relève des différences quantitatives entre les extraits des pollens S1 S2 Et S3 S3 (les teneurs des pollens S3 S3 sont plus élevées que celles des pollens S1 S2), et aussi entre pollen S1 S2 et styles vierges homologues S1 S2, ces derniers étant quantitativement plus riches en sphingolipides acides que les pollens.

TABLEAU 2. — Comparaison de la variation des teneurs en glycosphingolipides acides totaux selon les différentes combinaisons.

MATERIEL ANALYSE	Conc. n. moles/ g. de tissu	Taux relatif/ styles vierges
Styles vierges W166K	48,74	1,000
Pollen W166K	42,56	0,873
Pollen T2U	55,82	1,145
Styles autopollinisés 8 h W166K X W166K	43,64	0,895
Styles xénopollinisés 8 h W166K X T2U	21,83	0,447
Styles autopollinisés 24 h W166K X W166K	27,33	0,571
Styles xénopollinisés 24 h W166K X T2U	34,47	0,707

La comparaison des variations des teneurs de ces composés au cours de la pollinisation souligne combien le comportement métabolique des glycosphingolipides acides est perturbé. Au début de la pollinisation, tous les styles

auto ou xénopollinisés ont des teneurs qui vont en diminuant; par la suite, cette chute des valeurs ne concerne plus que les styles autopollinisés et va s'accroissant jusqu'à la fin du temps considéré (24 h).

Notons, enfin, la présence d'un composé non identifié, de Rf nul, α naphthol positif, reconnu dans tous les chromatogrammes en couche mince des extraits de styles vierges et dans les extraits de styles autopollinisés dans lesquels il est quantitativement très abondant.

C) Les glycosphingolipides neutres élués par chromatographie sur colonne DEAE-cellulose (solvant chloroforme-méthanol) sont purifiés par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique équilibrée en chloroforme. Leur fractionnement est réalisé par un mélange éluant chloroforme-méthanol, de polarité croissante par augmentation progressive des concentrations croissantes en méthanol. Cinq sous-fractions sont recueillies, numérotées de 1 à 5.

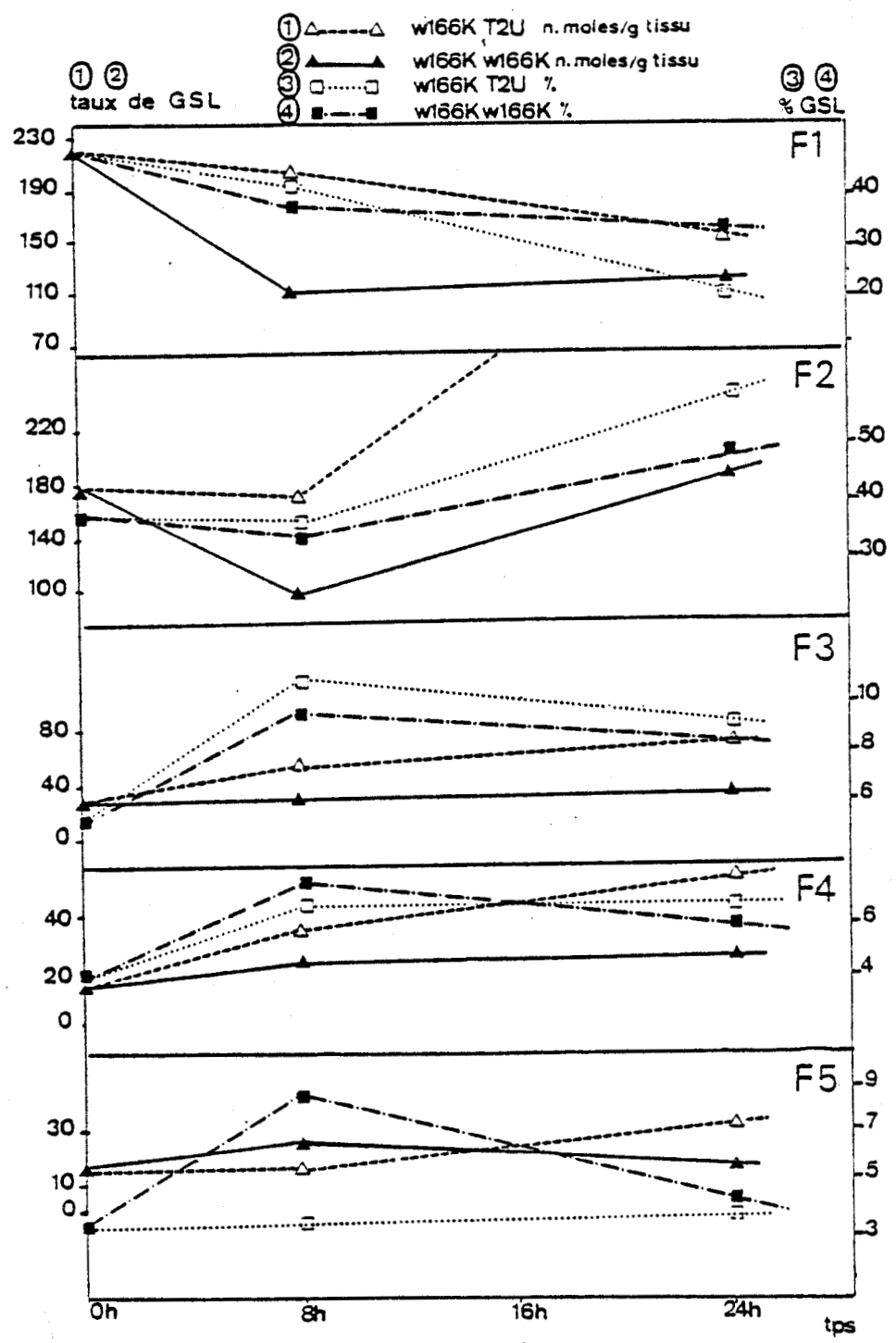
Par chromatographie en couche mince : des céramides (sous-fraction 1), des monoglycosyl céramides (sous-fraction 2), des di et triglycosyl céramides (sous-fraction 3), des lipides polaires (sous-fractions 4 et 5) sont identifiés dans tous les extraits de pollens et de styles. De plus, nous caractérisons dans les chromatogrammes des extraits de styles vierges et de styles autopollinisés un composé, qui, par son caractère naphthol positif est identique au composé révélé sur les chromatogrammes de glycosphingolipides acides. La distribution de ces glycosphingolipides neutres dans les différentes sous-fractions des extraits de pollens et de styles est confirmée par fluorimétrie, ce qui permet également une bonne évaluation quantitative de ces composés : céramides et monogalactosyl céramides sont les composants majeurs des styles et appartiennent respectivement aux sous-fractions 1 et 2 de tous les extraits. Les di et tri glycosylcéramides et les lipides polaires sont, par contre, les composants les mieux représentés dans les extraits de pollens (sous-fractions 3 et 4).

Le comportement des glycosphingolipides neutres en fonction de la pollinisation est envisagé en comparant les taux des glycosphingolipides neutres dans les sous-fractions des différents extraits de styles vierges, autopollinisés et xénopollinisés. La pollinisation entraîne une diminution des teneurs en céramides et monoglycosylcéramides de 0 à 8 h qui est beaucoup plus marquée dans les styles autopollinisés. De 8 à 24 h la pollinisation montre un accroissement du taux de ces composants notamment des monogalactosyl-céramides qui deviennent ainsi d'une manière uniforme, dans toutes les fractions 2 des styles auto et xénopollinisés, le composé prépondérant. Remarquons que les concentrations finales en ce composé demeurent toujours inférieures à celles qui sont observées en xénopollinisation.

L'examen des courbes de la cinétique des glycosphingolipides neutres établies dans les différentes sous-fractions en fonction des pourcentages, des concentrations relatives et des temps de pollinisation considérés, confirme ces faits (tableau 3).

L'inversion du profil des courbes de 0 à 8 h qui est constaté dans les cinétiques des sous-fractions 3, 4 et 5 ne peut s'expliquer que par l'important apport pollinique dont les fortes concentrations indiquées dans le tableau 1 interviennent ici.

TABLEAU 3. — Cinétique du métabolisme des glycosphingolipides neutres dans les sous-fractions 1, 2, 3, 4, 5.



2) Résultats des analyses en chromatographie phase gazeuse (CGL).

Cette technique permet l'analyse des copules glucidiques des glycosphingolipides et l'établissement de leur composition en acides gras.

A) L'analyse des copules glucidiques [13] est actuellement à l'étude. Les résultats partiels que nous rapportons ici montrent une grande richesse des pollens en glucose et surtout en mannose.

Au cours de la pollinisation, une diminution importante du taux de glucose supérieure à 54 % est caractérisée en incompatibilité. Par contre le taux mannose/glucose augmente dans les styles autopollinisés dans de fortes proportions. Cette augmentation ne semble pas due à l'apport pollinique mais doit être recherchée dans une intervention métabolique.

3) Composition en acides gras des glycosphingolipides neutres (GSL neutres).

L'étude de la composition en acides gras des GSL neutres a été entreprise dans les différents extraits stylaires et polliniques, dans des conditions précédemment décrites.

La composition en acides gras des extraits de pollen, de styles vierges, autopollinisés et xéнопollinisés, est rapportée dans le tableau 1. Il est évident que le type de colonne retenu limite notre analyse : aucun acide gras à chaîne carbonée courte, inférieure à C_{14} : 0 (ac. myristique) ne peut être identifié clairement, les acides béhéniques et homolinoléique ne sont pas séparés.

La composition des extraits est homogène qualitativement, cependant des différences quantitatives nettes apparaissent si nous comparons : extraits de pollens et extraits des styles vierges ; pollinisations compatibles et incompatibles.

Les teneurs en acides gras sont plus élevées ou équivalentes dans les styles vierges (S1S2) que dans les extraits polliniques (S1 S2). Les styles sont riches en acide palmitique (C_{20} : 0). Le pollen S1 S2 est mieux pourvu en acide oléique (I_9 : 1), linoléique (1_3 : 3) et γ homolinoléique + béhénique que les styles vierges S1 S2 ou que le pollen S2 S3 qui n'est riche qu'en homolinoléique + béhénique.

Nous avons envisagé la distribution des acides gras selon la longueur des chaînes dans les styles pollinisés : (acides gras saturés à chaîne carbonée courte et acides gras insaturés à chaîne carbonée moyenne).

Les acides gras à chaîne carbonée relativement courte sont mieux représentés dans les styles et les pollens. Inversement, les acides gras à chaîne carbonée moyenne sont quantitativement mieux représentés dans les pollens.

Le comportement de ces acides gras a été analysé au cours des différentes pollinisations, compatibles ou incompatibles. Il diffère surtout selon les longueurs des chaînes des acides gras considérés et s'avère intéressant. En effet, dans les premières heures de pollinisation (0 à 8 h), la xéнопollinisation montre par rapport aux styles vierges un accroissement des teneurs des acides gras insaturés à chaîne moyenne, puis de 8 h à 24 h, une diminution de ces mêmes teneurs. Par contre dans les mêmes conditions expérimentales, l'autopollinisation montre de 0 à 24 heures une diminution constante des teneurs des acides gras à chaîne courte et un accroissement constant des teneurs en acides gras à chaîne moyenne.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Si les résultats obtenus ne représentent encore qu'une approche très limitée dans ses conclusions des mécanismes qui président à l'établissement de l'incompatibilité gamétophytique de fécondation, ils témoignent cependant de l'importance du rôle qu'exercent ces glycosphingolipides dans le métabolisme.

L'apport des différentes techniques est considérable : elles permettent en effet une meilleure connaissance de la distribution de ces composés dans les pollens et les styles et surtout de leur devenir en confrontant les différentes pollinisations compatibles ou incompatibles aux styles vierges.

Ainsi l'autopollinisation est caractérisée par une diminution des teneurs des différentes classes de glycosphingolipides, en particulier : diminution accusée des teneurs en sphingolipides totaux (de 0 à 8 h notamment) en glycosphingolipides acides.

Le soin apporté au devenir des glycosphingolipides neutres montre que les teneurs en céramides, composants majeurs des styles vierges et en monoglycosyl-céramides vont, dans les 8 premières heures de l'autopollinisation, diminuer fortement et devenir équivalentes puis ces taux s'accroissent et finalement d'une manière moins marquée qu'en xéнопollinisation, le monoglycosyl-céramides devient le constituant majeur des styles pollinisés.

Enfin, la composition en acides gras des glycosphingolipides neutres a été établie. L'autopollinisation est marquée par la diminution importante des teneurs en acides gras à chaîne courte, et parallèlement par l'accroissement des teneurs des acides gras à chaîne moyenne.

Ces résultats sont importants à plusieurs titres :

— d'une part, l'hypothèse que nous avons précédemment envisagée [14] concernant le rôle inhibiteur des acides gras à chaîne courte sur la croissance est renforcée par l'analyse de leur comportement au cours de l'autopollinisation ;

— d'autre part, nous avons voulu rechercher la participation des glycosphingolipides à un métabolisme. Le comportement des glycosphingolipides neutres permet de l'attester : analysé au niveau de différentes sous-classes en fonction de la pollinisation, les glycosphingolipides ne peuvent être considérés comme de simples témoins mais comme des participants au métabolisme présidant la pollinisation.

Le comportement des céramides, des monoglycosyl-céramides et surtout celui des acides gras analysé au cours des différentes pollinisations illustrent clairement la participation directe des glycosphingolipides neutres à un métabolisme que l'on peut qualifier « d'opposition » qui résultent de l'affrontement de deux métabolismes, l'un à caractère « stylaire » (ac. gras à chaîne courte) et l'autre à caractère « pollinique » (ac. gras à chaîne moyenne).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FOLCH (J.), LEES (A. M.), MEATH (J. A.) et LE BARON (F. N.), 1951. — *J. Biol. Chem.*, 191, 833-841.

- [2] FOLCH (J.), LEES (A. M.), SLOANE (S.) et STANLEY (G. H. S.), 1957. — *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- [3] KARLSSON (K. A.), SAMUELSSON (B. E.) et STEEN (G. O.), 1973. — *Biochim. Biophys. Acta*, 316, 317-335.
- [4] SCHMIDT (G.), BENOTTI (J.), HERSHMAN (B.) et THANNHAUSER (S. J.), 1946. — *J. Biol. Chem.*, 168, 505-511.
- [5] FREYSZ (L.), BIETHR et MANDEL (P.), 1971. — *Biochimie*, 53, 399.
- [6] SKIPSKI (V. P.), BARCLAY (M.), REICHMANN (E. S.) et GOOD (J. J.), 1969. — *In : Methods in enzymology*, XIV, 574.
- [7] KWITEROVICH Jr (P. O.), SLOAN (H. O.) et FREDRICKSON (D. S.), 1970. — *J. Lip. Res.*, 11, 322-330.
- [8] MARINETTI (G. V.), 1962. — *J. Lip. Res.*, 3, 1.
- [9] SIAKOTOS (A. N.) et ROUSER (G.), 1956. — *J. of Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 913.
- [10] NAOI (M.), LEE (Y. C.) et ROSEMAN (S.), 1974. — *Analytical Biochemistry*, 58, 571-577.
- [11] GAVER (R. G.) et SWEELEY (C. C.), 1965. — *J. of Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 294-298.
- [12] SUGITA (M.), DULANEY (J. T.) et MOSER (H. W.), 1974. — *J. Lip. Res.*, 15, 227-233.
- [13] FOURNET (B.), FIAT (A. M.), MONTREUIL (J.) et JOLLES (P.), 1975. — *Biochimie*, 57 (2), 181-185.
- [14] CARON (B.), 1972. — Thèse État pharm. Lille.

PUBLICATION II

**Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*,
a self incompatible species**

I. Composition in fatty acids and in long
chained bases of pollen and unpollinated style

by C. Delbart,¹ H.F. Linskens,² B. Bris,¹ Y. Moschetto³ and D. Coustaut¹

¹ *Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, Lille, France*

² *Department of Botany, Section Molecular Developmental Biology, Faculty of Sciences,
University of Nijmegen, the Netherlands*

³ *Centre Technologie Biomedical, INSERM, Lille, France*

Communicated at the meeting of March 29, 1980

SUMMARY

The cell surface is a logical place to look for possible causes of the breakdown in cellular interactions that characterize the gametophytic incompatibility of fertilization. Indications that changes in cellular glycolipids were related to malignant process or growth inhibition or viral transformation lead us to study the possible role of the glycosphingolipids (GSL). Those GSL are thought to be relatively tissue specific compared, to say, phospholipids. The sensitive metabolic control and their antigenic properties apparently expressed at the cell surface make glycolipids of considerable interest. Previous data implicate them as receptors for a wide variety of molecules which can influence intracellular events. We report here the identification of the GSL of pollen and unpollinated styles of *Petunia hybrida* self-incompatible species, in order to study further the evolution of those GSL during the incompatibility phenomenon.

RESUME

Il semble que les surfaces cellulaires aient un rôle important à jouer dans les interactions qui caractérisent l'incompatibilité gamétophytique de fécondation. Le fait que la distribution des glycolipides varie au cours des processus de tumorigénèse, d'inhibition de contact ou de transformation nous a conduit à envisager le rôle des glycosphingolipides (GSL). Ces GSL sont plus spécifiques d'un tissu que les phospholipides. Leur contrôle métabolique, leurs propriétés antigéniques exprimées à la surface cellulaire permettent de les considérer comme récepteurs à une grande variété de molécules. Nous avons donc caractérisé les GSL des pollens et des styles vierges de *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible, afin de permettre l'étude ultérieure de l'évolution de ces GSL en fonction de la pollinisation compatible ou non.

1. INTRODUCTION

Cellular surfaces play a major part in the initiation of cellular interactions, identification processes, growth, intercellular adhesion, and oncogenic trans-

formation (Oppenheimer 1977; Hakomori 1975; Hoelzl-Wallach 1973). These various activities seem to be linked to the presence of glycoconjugates.

The gametophytic incompatibility of fertilization (Linskens 1980) under investigation is a complex physiological process which implies that:

- the S allele of incompatibility contained in the microspore has been identified by the tissues of a style carrying the same S allele (recognition reaction),
- information has been transmitted, characterized by the appearance of a wave of metabolic changes and by the rejection of the incompatible pollinic tube whose growth will be thwarted inside the style (Linskens 1980; Deurenberg 1977),
- changes of metabolic pollen result in inhibition of pollen tube growth (rejection reaction).

All these events involve the presence of membraneous structures whose adaptability will allow the identification and the transmission of the identification signal, both of which are linked to ionic changes (Linskens and Spanjers 1973; Deurenberg 1977). For this reason we have become interested in the study of glycosphingolipids. These molecules, with their strictly membraneous character and their heterogenous structure, could fulfill the multiple functions that they are believed to be capable of. For instance, in *Petunia*, a self incompatible species which is our basic research material, both fatty acids and long chained bases of glycosphingolipids are thought to play a part in the structure and in the control of membraneous plasticity. The sequence of carbohydrate is thought to be responsible for the existence of local conditions of membrane permeability whose variations are closely related with the recognition process of the S allele. Therefore we looked at the composition of glycosphingolipids in pollen and styles.

abbreviations:

GSL:	glycosphingolipids
CER:	ceramides
MGCER:	monoglycosylceramides
DGCER:	diglycosylceramides
TGCER:	triglycosylceramides
T ₄ GCER:	tetraglycosylceramides
DEAE Cellulose:	diethyl aminoethyl cellulose
DEGS:	diethylene glycol succinate
LCB:	long chained bases

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. *Plant material:*

The present study was conducted with *Petunia hybrida* media vulgaris (Linskens 1955; Linskens and Straub 1978). The clones W166K (self incompatibility alleles S₁, S₂) and T2U (self incompatibility alleles S₃, S₃) were cultivated in the Botanical Gardens of the University of Nijmegen.

2.2. Analytical methods:

2.2.1. isolation of glycosphingolipids (GSL):

The polar lipids from pollen and styles were obtained using the standard Folch method (Folch et al. 1957). The CER, MGCER, DGCER, TGCER and TRGCER were separated, after a mild alkaline hydrolysis, by TL-chromatography on silicic acid and on DEAE cellulose column, according to the Karlsson procedure (Karlsson et al. 1973). Those GSL were finally purified by thin layer preparative chromatography in the classic solvent $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (65-25-4, v/v/v) and developed with Rhodamine (Karlsson et al. 1973).

2.2.2. hydrolysis of GSL and analysis of their fatty acids and LCB composition:

The purified CER, MGCER, DGCER, TGCER and TRGCER were hydrolysed under acidic conditions by a methanol hydrochloric solution (1N HCl in CH_3OH containing 10 molecules of H_2O) for 23 hours in a nitrogen stream (Gaver and Sweeley 1965).

2.2.1.1. analysis of fatty acids composition:

The fatty acids from the hydrolysate should first be extracted by n-hexane and then trans-esterificated in the $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{SO}_4$ mixture (Kates 1972). The resulting freed fatty acids are then purified by TLC (Kates 1972) and identified by GLC under the following experimental conditions: model Varian 1800 flame ionisation detector, standard column of 10% DEGS on chromosorb W 60-80 mesh AW, at a column temperature of 176 °C, and a nitrogen stream of 25 ml/min.

2.2.1.2. analysis of the composition of the long chained bases:

This analysis involves: the extraction of fatty acids by n-hexane (Karlsson and Martensson 1968) followed by the selective extraction of the long chained bases by diethyl ether under alkaline conditions;

- the transformation of those long chained bases into stable DNP derivatives by 1-fluoro-2,4 dinitrobenzene (Karlsson 1970);

- the purification of those DNP derivatives by TLC (Karlsson and Martensson 1968);

- their transformation into aldehydes by oxidation with lead tetraacetate (Sugita et al. 1976);

- finally, their identification by GLC on a standard column of 10% DEGS on chromosorb W 60-80 mesh AW, at a temperature of 150 °C and a nitrogen stream of 19-20 ml/min;

- the nature of the aldehydes is confirmed by an additional GLC analysis of the LCB transformation into fatty acids beforehand. For this purpose, the aldehydic mixture is directly oxidized by KMnO_4 without previous catalytic hydrogenation (Slomiany and Horowitz 1970). The fatty acids thus obtained are trans-esterified, purified by TLC and analysed as described above.

3.RESULTS

3.1. *Composition in fatty acids:*

The distribution of various neutral GSL fatty acids was analysed in T2U and W166K pollen and in the unpollinated W166K styles. They were also examined for any relationships between aliphatic chain length (short-medium-long), distribution of odd fatty acids and saturation degree of the C18 fatty acids (stearic, oleic, linoleic and linolenic acids),

The results of those analysis are listed in Tables 1 and 2. The possibility of a relationship between the amount of fatty acids, the stylar or pollinic origin of the extracts and genotype was also looked for.

A great homogeneity in the distribution of fatty acids, whatever the stylar or pollinic nature of the extracts and/or of the analysed genotype, was observed.

Table 1. Distribution of fatty acids in the different classes of glycosphingolipids in virgin styles (W166K).

Fatty acids	CER	MGCER	DGCER	TGCER	T ₂ GCER
C10 : 0	0.17	0.08	0.58	0.85	1.87
C10 : 1	0.11	0.24	0.40	0.17	2.14
C11 : 0	0.20	0.07	0.21	0.15	1.69
C11 : 1	0.12	0.08	0.16	0.06	1.49
C12 : 0	6.65	0.78	2.37	1.20	3.29
C12 : 1	2.00	0.15	0.29	0.13	1.17
C13 : 0	1.57	0.10	0.29	0.24	1.15
C13 : 1	0.21	0.21	0.55	0.13	0.95
C14 : 0	0.82	2.63	1.37	1.97	1.52
C14 : 1	0.25	0.32	0.88	2.90	2.29
C15 : 0	3.55	1.46	0.76	2.14	2.02
C15 : 1	0.46	0.41	0.69	0.83	1.06
C16 : 0	17.45	23.36	19.10	15.52	20.48
C16 : 1	3.69	3.74	2.33	8.46	6.34
C17 : 0	0.42	0.97	1.77	2.05	2.34
C17 : 1	0.56	0.58	0.34	1.05	0.98
C18 : 0	9.04	13.27	11.68	11.95	10.12
C18 : 1	19.18	16.50	9.96	19.38	15.89
C18 : 2	8.35	2.87	1.98	3.25	2.46
C18 : 3	3.74	0.71	0.85	0.86	0.60
C20 : 0	1.41	0.86	1.84	1.19	1.88
C20 : 1	0.97	11.40	2.39	1.39	1.04
C22 : 0	9.79	13.51	28.19	17.56	13.42
C22 : 1	2.88	1.92	1.65	0.95	0.67
C23 : 0	1.30	1.04	1.92	1.30	0.73
C23 : 1	0.45	1.43	2.42	1.86	0.87
C24 : 0	2.60	1.30	3.45	1.40	0.80
C24 : 1	2.03	pas dosé	1.56	1.05	0.73
TOTAL	99.97	99.99	99.98	99.99	99.99

However, when compared to unfertilized styles, the T2U or W166K pollen, although very similar to each other, are characterized by weaker desaturation and a relatively greater amount of short chained fatty acids, for example lauric acid for the pollen extracts, and palmitic acid for the stylar one. This led us to divide the fatty acids into two groups according to their occurrence in pollen and style respectively.

Furthermore, we noticed the individualization of all pollen T_RGCER, which differs greatly from the other classes of GSL by their high amount of long-chained fatty acids (C18 to C24) regardless of their saturation degree, and by a concomitant low amount of short chained fatty acids (C10 to C17).

3.2. composition of long-chained bases:

We identified 12 isolated peaks which correspond to 24 parent long-chained bases whose specifications are given in Table 3. The results concerning the distribution of those LCB among the various GSL are listed in Tables 4 and 5.

Table 2. Distribution of fatty acids in the different classes of glycosphingolipids in pollen (T2U and W166K).

Fatty acids	CER		MG CER		DG CER		TG CER		T _R GCER	
	Pollen W166K	Pollen T2U	Pollen W166K	Pollen T2U	Pollen W166K	Pollen T2U	Pollen W166K	Pollen T2U	Pollen W166K	Pollen T2U
C10 : 0	0.93	0.19	0.25	—	0.78	1.01	1.70	0.81	1.24	1.59
C10 : 1	0.29	0.25	0.28	—	0.79	1.00	1.90	1.18	1.02	1.07
C11 : 0	0.27	0.15	0.23	0.05	0.63	0.81	1.50	1.01	0.95	0.98
C11 : 1	0.78	0.29	0.21	0.12	0.59	0.69	1.28	1.05	0.37	0.86
C12 : 0	3.16	2.28	6.88	4.42	3.05	5.48	3.33	1.93	2.23	2.86
C12 : 1	0.82	0.33	0.45	0.14	0.57	0.60	0.98	1.33	0.68	0.69
C13 : 0	0.64	0.31	0.35	0.45	0.60	0.56	0.82	1.31	0.78	0.64
C13 : 1	1.00	0.75	0.40	0.40	0.49	0.44	0.71	1.35	0.50	0.47
C14 : 0	0.36	0.95	0.44	1.42	1.20	1.49	2.07	1.33	1.25	1.34
C14 : 1	0.43	0.41	0.45	0.18	0.50	0.64	1.04	1.61	1.77	1.56
C15 : 0	0.71	0.40	0.61	0.36	1.17	1.78	2.19	2.02	1.45	2.07
C15 : 1	0.23	0.27	0.45	0.29	0.47	0.70	0.49	1.10	0.33	0.51
C16 : 0	8.28	12.13	20.09	20.51	16.98	18.23	22.29	10.22	18.56	20.01
C16 : 1	1.72	1.75	1.80	3.23	4.13	4.18	5.39	3.66	4.00	4.85
C17 : 0	0.58	0.88	1.19	1.02	1.83	2.00	2.14	1.75	1.72	1.71
C17 : 1	0.63	0.43	0.26	0.37	0.73	0.71	1.42	1.26	0.79	0.77
C18 : 0	7.13	9.75	14.87	11.79	15.05	10.82	14.82	6.37	10.28	12.38
C18 : 1	12.95	16.56	14.95	16.64	19.06	13.22	16.30	8.51	10.89	13.73
C18 : 2	2.07	2.99	1.81	2.74	3.81	2.37	2.44	2.15	2.91	3.03
C18 : 3	0.67	2.06	0.72	0.94	0.54	0.75	0.56	1.68	1.47	1.65
C20 : 0	1.06	1.84	1.38	0.82	1.61	0.77	1.23	1.12	2.51	2.78
C20 : 1	4.50	3.58	2.01	2.25	1.09	0.37	0.55	0.54	0.66	0.91
C22 : 0	32.06	32.35	19.60	27.14	16.25	21.86	8.39	42.70	26.08	16.36
C22 : 1	4.91	2.87	2.36	1.26	0.76	0.83	1.98	0.71	1.40	1.84
C23 : 0	1.35	1.91	2.19	0.96	1.85	1.99	0.74	0.46	1.15	1.19
C23 : 1	1.63	2.25	2.44	0.66	2.05	2.57	1.46	1.09	1.26	1.02
C24 : 0	2.61	2.06	2.36	0.84	2.27	1.39	1.19	0.74	1.76	1.32
C24 : 1	3.22	—	0.96	0.48	1.14	2.23	1.08	0.50	1.07	1.29
TOTAL	99.99	99.99	99.99	99.98	99.99	99.99	99.99	99.99	99.98	99.98

unfertilized style extracts (see Table 3). However, the 2 classes differ by having varying amounts of sphingosine.

The pollen are also characterized by a rather high amount of heptadecaspheganine – hydroxysphingosine (group B) and heptadecaspheganine – hydroxysphingene (group E). In addition they also contain high amounts of sphingene (57%). Higher quantities of that base can also be found in the styles (80%).

3.2.3. long-chained bases from the diglycosylceramides (DGCER):

Comparing the distribution of LCB among stylar and pollinic DGCER, shows marked differences. The DGCER of the unpollinated W166K styles are rich in LCB belonging to group D (sphinganine-hydroxynonadecaspheganine), E (heptadecaspheganine-hydroxysphingene) and G (sphingene). On the other hand the pollinic DGCER, whatever the genotype (T2U or W166K) differs from the stylar DGCER by high amounts of LCB in group B (heptadecaspheganine-hydroxysphingene) C (hexadecaspheganine) and F (nonadecaspheganine-hydroxyeicosaspheganine).

3.2.4. long-chained bases from the triglycosylceramides (TGCER):

The distribution of LCB among the TGCER of the unpollinated W166K styles, and T2U or W166K are very similar. However, the stylar TGCER can be characterized by the observation that their LCB belong to groups C (hexadecaspheganine), E (heptadecaspheganine-hydroxysphingene) and H (eicosaspheganine).

As for the pollens, they can be defined by the existence of LCB from the group B (heptadecaspheganine-hydroxysphingene). Moreover the nonadecaspheganine (I group) seems to be more specific of T2U pollen.

3.2.5. long-chained bases from the tetraglycosylceramides (TRGCER):

It seems difficult to find a specific base characteristic of the pollinic and stylar TRGCER. However, we have every reason to believe that the LCB of the I, K and L groups are essentially pollinic in nature. On the other hand, the major bases of the stylar TRGCER are those belonging to groups D (sphinganine-hydroxynonadecaspheganine) F (nonadecaspheganine-hydroxyeicosaspheganine) G (sphingene) and H (eicosaspheganine).

4. CONCLUSION

We have analysed the fatty acids and the long-chained bases of several neutral GLS extracted from pollen and unpollinated styles. Although apparently homogenous, with the exception of the TRGCER, the composition of fatty acids of the GSL from pollen and style proved to be quantitatively heterogenous:

- the CER and MGCER of the unfertilized styles were richer in palmitic acid C16 : 0 (17–23%) than the pollen (8–20%);
- a high amount of stearic acid (C18 :0) characterized all pollinic GSL.

3.2.1. long-chained bases from the ceramides (CER):

When we analysed the long-chained bases, it became evident that there were marked differences between pollen species, and also between pollen and stylar extracts. Thus, in the W166K pollen hepta decasphinganine (d17 : 0) and the hydroxy sphinganine (t18 : 0) are the major bases, while heptadecaspingenine (d17 : 1) and hydroxysphingenine (t18 : 1) are mostly encountered in the T2U pollen ceramides. On the other hand, hexadecaspingenine (d16 : 1) is characteristic of unpollinated styles as well as of lower saturation degree.

So this comparison underlines the quantitative and qualitative heterogeneity in the distribution of the long-chained bases among the pollen stylar ceramides.

3.2.2. long-chained bases from the monoglycosylceramides (MGCER):

This class of neutral GSL, and the previous one (CER), are very similar owing to the presence of some LCB belonging to the B, C and E groups in the

Table 3. Identification of long chained bases.

group	Long chained bases	Aldehyds
A	hexadecaspinganine d16 : 0 hydroxyheptadecaspinganine t17 : 0	C14 : 0 tetradecanal
B	heptadecaspinganine d17 : 0 hydroxysphinganine t18 : 0	C15 : 0 pentadecanal
C	hexadecaspingenine d16 : 1	C14 : 1 tetradecenal
D	sphinganine d18 : 0 hydroxynonadecaspinganine t19 : 0	C16 : 0 hexadecanal
E	heptadecaspingenine d17 : 1 hydroxysphingenine t18 : 1	C15 : 1 pentadecenal
F	nonadecaspinganine d19 : 0 hydroxyeicosaspinganine t20 : 0	C17 : 0 heptadecanal
G	sphingenine d18 : 1	C16 : 1 hexadecenal
H	eicosaspinganine d20 : 0	C18 : 0 octodecanal
I	nonadecaspingenine d19 : 1	C17 : 1 heptadecenal
J	? d21 : 0 t22 : 0	C19 : 0 nonadecanal
K	sphingadienine ? d18 : 2	C16 : 2 hexadecadienal
L	eicosaspingenine ? d20 : 1	C18 : 1 octodecanal

Tables 4 and 5. Distribution of long chained bases in the glycosphingolipids in styles and pollens.

Bases	CER			MG CER			OG CER		
	Virgin styles W166K	Pollen TZU	Pollen W166K	Virgin styles W166K	Pollen W166K	Pollen TZU	Virgin styles W166K	Pollen W166K	Pollen TZU
A 416:0 - 417:0	3.23	5.76	8.17	0.84	2.97	2.73	3.34	0.47	1.33
B 417:0 - 418:0	20.30	26.92	28.82	2.50	8.96	7.58	5.26	46.85	35.56
C 416:1	46.53	4.36	5.03	7.45	6.76	9.55	1.94	15.72	15.52
D 418:0 - 419:0	2.55	3.11	5.79	0.90	3.56	2.07	44.76	5.22	7.06
E - 418:1	9.38	29.33	27.31	2.08	9.66	9.47	7.99	1.95	3.01
F 419:0 - 420:0	3.49	11.29	9.21	0.75	4.16	3.83	5.36	16.94	18.50
G 418:1	9.11	13.96	10.08	80.07	56.26	59.84	23.67	7.78	7.90
H 420:0	4.90	4.86	4.58	5.40	7.56	4.92	7.67	5.06	11.11
TOTAL	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99
saturated (sat.)	34.47	51.94	57.57	10.39	27.31	21.13	66.39	74.54	73.56
unsaturated (unsat.)	65.52	48.05	42.42	89.60	72.68	78.86	33.60	25.45	26.43
unsat. / sat.	1.901	0.925	0.736	2.623	2.661	3.732	0.506	0.341	0.359

Bases	TG CER			T _g CER			
	Virgin styles W166K	Pollen W166K	Pollen TZU	Bases	Virgin styles W166K	Pollen W166K	Pollen TZU
A 416:0 - 417:0	1.84	1.32	1.03	A 416:0 - 417:0	1.22	1.24	0.85
B 417:0 - 418:0	32.41	42.88	36.03	B 417:0 - 418:0	37.34	33.59	37.56
C 416:1	21.07	19.72	16.59	C 416:1	17.87	16.78	18.77
D 418:0 - 419:0	5.74	5.37	5.42	D 418:0 - 419:0	7.59	6.12	3.74
E 418:1	3.67	1.32	1.56	E - 418:1	1.89	2.92	1.63
F 419:0 - 420:0	14.04	14.28	12.73	F 419:0 - 420:0	17.24	12.14	13.55
G 418:1	6.33	5.66	5.91	G 418:1	8.28	5.18	6.03
H 420:0	8.66	3.20	3.13	H 420:0	4.51	2.57	3.07
I 419:1 - 420:1	6.23	6.24	17.59	I 419:1 - 420:1	4.05	8.07	1.76
TOTAL	99.99	99.99	99.99	J 421:0 - 422:0	traces	2.05	4.31
saturated (sat.)	62.69	67.05	58.34	K 418:2 (?)	-	4.90	5.08
unsaturated (unsat.)	37.30	32.94	41.65	L 420:1 - 421:1	traces	4.43	3.64
unsat. / sat.	0.595	0.491	0.714	TOTAL	99.99	99.99	99.99
				saturated (sat.)	67.90	57.71	63.08
				unsaturated (unsat.)	32.09	42.28	36.91
				unsat. / sat.	0.622	0.730	0.595



It is also possible to define GSL by a kind of LCB according to its pollinic or stylar origin. The analysis of the evolution of the saturation degree of the fatty acids and of the long-chained bases is also remarkable. For example, the ceramides and monoglycosylceramides from pollen possess a higher percentage of saturated fatty acids (65–70%) than the corresponding stylar GSL (54–59%). The analysis of the composition in LCB also shows a higher saturation degree for the pollinic GSL, pollinic CER (57%), MGCER (27%), DGCER (75%), TGCER (67%). The corresponding unpollinated stylar GSL is 34, 10, 66, 62% respectively.

Before pollination, the structures of GSL from both pollen and styles are different. In recent years numerous research studies have shown the interference of the GSL in the cellular recognition phenomenon, in growth, division and adhesion (Roseman 1970; Watanabe et al. 1976; Wiegandt 1971). Also the incompatibility reaction in plants implies a recognition phase. Furthermore, recent data (Vakirtzi et al. 1978; McDonough and Lilien 1977) have shown a perturbation in the synthesis of those GSL after the addition of cycloheximide or puromycine. These are considered inhibitors of the protein synthesis. It is also well-known that the addition of two antibiotics modifies the expression of the reaction of incompatibility (Ascher 1974; Kovaleva et al. 1975).

As our first results show a marked difference in the GSL structure of pollen and unfertilized styles, it should be interesting to continue studying the changes, after pollination, in those GSL which are basic constituents of the membranes. The participation of membrane structures in the installation, and development of the perturbed metabolism which characterizes the gametophytic incompatibility of fertilization could be better understood.

ACKNOWLEDGMENT

We are thankful to Miss P. Coors, Miss E. Jans, Mrs. B. Lacroix and Miss A. Welcker for their technical assistance. The assistance of Mr. A.H. Glaap, chief gardener, was appreciated.

LITERATURE

- Ascher, P.D. - The self-incompatibility reaction in detached styles of *Lilium longiflorum* Thunb injected before pollination with 6-methylpurine or puromycin. *Incompatibility Newsletter* 4, 57-60 (1974).
- Deurenberg, J.J.M. - Evidence against the formation of fast diffusing substances preceding fertilization in *Petunia*. *Acta Bot. Neerl.* 26, 353-355 (1977).
- Folch, J., M. Lees, S. Sloane and G.H. Stanley - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).
- Gaver, R.G. and C.C. Sweeley - Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long-chained bases by gas liquid chromatography. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 42, 294-298 (1965).
- Hakomori, S.I. - Structures and organization of cell surface glycolipids. Dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochim. Biophys. Acta* 417, 55-89 (1975).
- Hoelzl-Wallach, D.F. - In "Biological membrane". D. Chapman and D.F. Hoelzl-Wallach eds. Acad. Press Lond. N.Y. 253 (1973).
- Karlisson, K.A. - On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chained bases. *Chem. Phys. Lipids* 5, 6-43 (1970).

- Karlsson, K.A. and E. Martensson - Studies on sphingosines. XIV: On the phytosphingosine content of the major human kidney sphingomyelins. *Biochim. Biophys. Acta* **152**, 230-233 (1968).
- Karlsson, K.A., B.E. Samuelsson and G.O. Steen - Sphingolipid composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. *Biochim. Biophys. Acta* **316**, 317-335 (1973).
- Kates, M. - In techniques in lipidology isolation, analysis and identification of lipids. T.S. Work, E. Work, ed., North Holland American Elsevier.
- Kovaleva, L.V., N.A. Musarova and E.A. Britikov - Étude du processus de formation de l'auto-incompatibilité chez *Petunia* à l'aide des inhibiteurs du métabolisme protéique et nucléique. (en russe). *Dokl. Nauk. SSSR* **222**, 1460-1473 (1975).
- Linskens, H.F. - Physiologische Untersuchungen der Pollenschlauch-Hemmung selbststeriler Petunien. *Z. Bot.* **43**, 1-44 (1955).
- Linskens, H.F. - Befruchtungs-Barrieren bei höheren Pflanzen. *Naturwiss. Rundschau* **33**, 11-20 (1980).
- Linskens, H.F. and A.W. Spanjers - Changes of the electrical potential in the transmitting tissue of *Petunia* styles after cross- and self-pollination. *Incompatibility Newsletter* **3**, 81-85 (1973).
- Linskens, H.F. and J. Straub - A mutant collection of *Petunia hybrida*. *Incompatibility Newsletter* **10**, 123-131 (1978).
- McDonough, J. and J. Lilien - The turnover of a tissue specific cell surface ligand which inhibits lectin induced capping. *J. Supramol. Struct.* **7**, 409-418 (1977).
- Oppenheimer, B. - In "Current topics in developmental Biology". A.A. Moscona and A. Monroy eds. Acad. Press. N.Y., vol. II, 1-17 (1977).
- Roseman, S. - The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. *Chem. Phys. Lipids* **5**, 270-297 (1970).
- Slomiany, B.L. and M.I. Horowitz - The glycolipids of bovine serum. *Biochim. Biophys. Acta* **218**, 278-287 (1970).
- Sugita, M., O. Itasaka and T. Hori - Branched long chained bases from the bivalve *Corbicula sandai*. *Chem. Phys. Lipids* **16**, 1-8 (1976).
- Vakirtzi-Lemonias, C., G.P. Evangelos and G.M. Levis - Effect of puromycin and cycloheximide on glycosphingolipid biosynthesis by PHA stimulated human lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 1488-1495 (1978).
- Watanabe, K., T. Matsubara and S.I. Hakomori - L-fucopyranosylceramide: a novel glycolipid accumulated in some of the human colon tumors. *J. Biol. Chem.* **251**, 2385-2388 (1976).
- Wiegandt, H. - Glycosphingolipids. *Advance in Lipid Research* **9**, 249-289 (1971).

PUBLICATION III

**Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*,
a self incompatible species**

**II. Evolution of the fatty acids composition
after cross- and self-pollination**

by C. Delbart,¹ B. Bris,¹ H.F. Linskens,² R. Linder³ and D. Coustaut¹

¹ *Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, Lille, France*

² *Department of Botany, Section Molecular Developmental Biology, Faculty of
Sciences, University of Nijmegen, the Netherlands*

³ *Laboratoire de Cytogénétique et d'Écologie, Université des Sciences et
Techniques, Villeneuve d'Ascq, France*

Communicated at the meeting of March 29, 1980

SUMMARY

The incompatibility reaction in the fertilization process in *Petunia hybrida*, implies cellular interactions that are similar to those also found in transformation or malignant processes. It is well established that virus-transformed or malignant cells contain reduced levels of the more complex glycosphingolipids (GSL), and that the palmitic, stearic and oleic acids are the principal fatty acids in glycolipids with short carbohydrate moieties (Ceramides). The proportion of these fatty acids in glycolipids with more complex carbohydrate moieties is markedly reduced. As we also observed such a decrease in complex glycolipids during fecundation, we tried to see if the change in glycolipid pattern was accompanied by changes in fatty acids composition.

We report here the fatty acids distribution among the various GSL in self- and cross-pollinated styles, and try to find out a possible relationship between the fatty acid pattern and the recognition process, first event of fertilization. This study suggests that an altered glycolipid metabolism takes place in the style after pollination.

RESUME

L'incompatibilité de fécondation, que nous étudions chez *Petunia hybrida*, implique des interactions cellulaires tout comme les phénomènes de transformation ou malins. Les cellules malignes ou transformées possèdent des taux réduits en glycosphingolipides (GSL) complexes et, les acides gras majeurs des GSL possédant peu de résidus osidiques (Ceramide) sont les acides palmitique, stéarique et oléique. Le pourcentage de ces acides gras est nettement réduit dans les GSL complexes. Comme nous avons déjà observé la disparition des lipides complexes pendant la fécondation, il nous a semblé intéressant de voir si ce changement de distribution était ou non accompagné de variations dans la composition en acides gras.

Nous envisageons la distribution des acides gras dans les diverses classes de GSL, pour des styles auto ou xéno-pollinisés afin d'établir une relation entre la composition en acides gras et le processus de reconnaissance primordial à la fécondation. Cette étude suggère l'installation après pollinisation, d'un métabolisme des GSL nettement perturbé.

1. INTRODUCTION

Some recent data dealing with lipids in *Petunia hybrida* (Coustaut et al. 1978; Delbart 1978) and in *Oenothera missouriensis* (Bris and Delbart 1978) indicated an influence of pollination upon total, neutral and acidic glycosphingolipids (GSL): GSL decreases quantitatively after self-pollination. As far as the entire neutral GSL are concerned, this influence must be quite complex when one considers the duration and the mode of pollination (compatible or incompatible), and also the aliphatic chain length of the fatty acids. Eight hours' pollination causes a decrease, in the GSL, in the amount of fatty acids with short and medium aliphatic chain, regardless of the mode of pollination. After 24 hours of xenopollination the fatty acid composition is completely reversed, involving an increase in the short aliphatic chained fatty acids and a concomitant decrease of the others. On the other hand, the level of short-chained fatty acids keep decreasing after 24 hours of self-pollination.

Those various facts led us to examine more closely the metabolism of the polar lipids in connection with the mode of pollination. This work deals with our observations on the evolution of fatty acid composition in the various ceramides (mono-, di-, tri- and tetra-glycosylceramides).

Abbreviations:

GSL	glycosphingolipids
CER	ceramides
MGCER	monoglycosylceramides
DGCER	diglycosylceramides
TGCER	triglycosylceramides
T _R GCER	tetraglycosylceramides

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. - Material:

Petunia hybrida (Linskens and Straub 1978) is our basic material for the study of the incompatibility phenomenon (Delbart et al. 1980). The used clones are W166K (self-incompatibility alleles = S₁S₂) and T2U (self-incompatibility alleles S₃S₃). Our study includes both pollen, unfertilized styles (of S₁S₂ genotype) and styles which underwent pollinations of 8 and 24 hours according to the following combinations:

- compatible (cross-pollination): S₁S₂ × S₃S₃ and S₃S₃ × S₁S₂;
- incompatible (self-pollination): S₁S₂ × S₁S₂ and S₃S₃ × S₃S₃.

Before it is examined, the material (pollen and styles) is lyophilized and kept at -20 °C.

2.2. - Methods:

The whole process of extraction, purification and fractionation of the polar lipids in CER, MGCER, DGCER, TGCER and T_RGCER, and of the ultimate purification of the various classes of GSL thus obtained, was described previously (Coustaut et al. 1978; Delbart 1978; Bris and Delbart 1978; Delbart et al. 1980).

The fatty acids of all the GSL are then released by acid hydrolysis according to Gaver's procedure (Gaver and Sweeley 1965), extracted by n-hexane (3×3 ml), evaporated to dryness and transmethylated (Kates 1972). The methyl esters of the fatty acids are then identified by gas-liquid chromatography under the following conditions: Varian 1800 apparatus supplied with a flame ionization detector, and standard column of 10% DEGS on chromosorb W, 60-80 mesh at a column temperature of 176 °C and a nitrogen stream of 25ml/min.

3. RESULTS

The results of this study are listed in Tables 1 to 5. As in our previous work (Delbart et al. 1980) the analysis of the repartition of the fatty acids among the various GSL of pollinic and stylar extracts, leads us to:

- point out the relative qualitative homogeneity of their distribution regardless of stylar or pollinic origins;
- establish a classification of some fatty acids into two groups: "pollinic or stylar", according to their preferential belonging to GSL from pollinic or unfertilized stylar extracts. For instance, GSL from pollinic extracts will contain more lauric acid (C12 : 0) or behenic acid (C22 : 0), while stylar GSL will mostly display high amounts of palmitic acid (C16 : 0). We are now going to consider the evolution with the pollinations of the fatty acids of both characters: pollinic or stylar (Table 6).

Eight hours after cross or self-pollination, the fatty acids with stylar characteristics seem to decrease while fatty acids with pollinic characteristics increase. Twenty-four hours after pollination the responses are more complex, but xenopollination alone induces a modulate reaction characterized by the coexistence of fatty acids of both characters. This seems to be necessary for the success of the fertilization process.

It seems valuable to us to go further into effects of pollination, of its duration upon the distribution of the fatty acids in the CER, MGCER, DGCER, TGCER and T_RG_CER, taking in consideration also the length and saturation degree of the aliphatic chain.

3.1. - *Pollination and changes of the saturation degree of the fatty acids:*

This evolution was examined among the fatty acids of the various neutral GSL relative to the duration of the pollination. Eight hours after pollination, there is a real increase ($\pm 20\%$) in desaturation degree; after 24 hours, the amounts of unsaturated fatty acids diminish. This change seems to be in close relation with the pollination process in general as it is encountered as well after cross or self-pollination. Only the full range of the variation can allow the distinction between the pollinations. Thus, for instance, only self-pollination is connected with a very low saturation degree in the CER-MGCER, and a higher one for the DGCER, TGCER and T_RG_CER.

It is to be noted that the genotype of the pollinated style has obviously no influence on the changes of the saturation degree of the fatty acids.

Table 1. Fatty acids repartition among ceramides.

		Styles W166K 0 h	W166.W166K 3 h	W166K.T2U 3 h	W166K.W166K 24 h	W166K.T2U 24 h	T2U.T2U 24 h	T2U.W166K 24 h	Pollen W166K	Pollen T2U
C 10	: 0	0.17	0.29	0.05	0.24	0.04	0.50	0.21	0.93	0.19
C 10	: 1	0.11	0.59	0.03	0.40	0.29	0.31	0.22	0.29	0.25
C 11	: 0	0.20	0.19	0.10	0.42	0.24	0.31	0.30	0.27	0.15
C 11	: 1	0.12	0.33	0.13	0.77	0.35	0.73	0.53	0.78	0.29
C 12	: 0	5.65	1.45	1.22	2.33	1.12	2.29	2.35	3.16	2.28
C 12	: 1	2.00	0.47	0.45	0.35	0.63	0.94	0.59	0.32	0.33
C 13	: 0	1.57	0.73	0.33	0.30	0.66	0.31	0.49	0.54	0.31
C 13	: 1	0.21	1.00	0.56	1.25	1.00	1.44	0.65	1.00	0.75
C 14	: 0	0.82	0.35	0.93	1.66	1.41	2.53	0.66	0.36	0.95
C 14	: 1	0.25	1.31	0.66	1.02	1.35	1.11	0.53	0.43	0.41
C 15	: 0	3.55	0.74	0.95	1.05	1.36	1.32	0.69	0.71	0.40
C 15	: 1	0.46	0.62	0.77	0.92	1.66	1.26	0.77	0.23	0.27
C 16	: 0	17.45	7.11	14.10	19.21	9.92	12.93	9.55	8.28	12.13
C 16	: 1	3.59	1.30	1.76	2.29	2.52	1.94	1.30	1.72	1.75
C 17	: 0	0.42	0.47	0.63	1.06	1.32	0.76	0.39	0.58	0.38
C 17	: 1	0.56	0.38	0.50	0.31	1.72	0.55	0.96	0.53	0.43
C 18	: 0	9.04	4.68	6.71	7.27	9.36	8.79	7.38	7.13	9.75
C 18	: 1	19.18	11.72	11.95	13.72	17.41	7.79	15.32	12.35	16.56
C 18	: 2	3.35	4.00	4.38	3.55	2.93	2.05	3.32	2.07	2.99
C 18	: 3	3.74	3.21	2.73	1.22	1.32	1.11	2.20	0.67	2.06
C 20	: 0	1.41	2.15	2.11	1.43	1.76	2.22	3.65	1.06	1.34
C 20	: 1	0.97	1.55	0.93	1.19	1.13	1.60	1.51	4.90	3.58
C 22	: 0	0.79	21.41	11.55	19.43	17.27	28.12	18.54	32.06	32.35
C 22	: 1	2.38	3.21	3.37	4.36	5.35	10.28	9.74	4.91	2.37
C 23	: 0	1.30	1.11	2.74	3.47	3.29	2.42	3.20	1.35	1.91
C 23	: 1	0.45	2.72	5.70	1.48	3.31	1.30	2.34	1.63	2.25
C 24	: 0	2.50	5.93	7.51	4.30	4.71	3.32	2.05	2.51	2.06
C 24	: 1	2.03	14.38	11.42	3.44	3.86	1.55	8.73	3.22	-
TOTAL		99.97	99.98	99.98	99.94	99.99	99.98	99.97	99.99	99.99

Table 2. Fatty acids repartition among monoglycosylceramides.

		Styles W166K 0 h	W166.W166K 3 h	W166K.T2U 3 h	W166K.W166K 24 h	W166K.T2U 24 h	T2U.T2U 24 h	T2U.W166K 24 h	Pollen W166K	Pollen T2U
C 10	: 0	0.08	0.13	0.10	0.21	0.16	0.17	0.41	0.25	-
C 10	: 1	0.24	0.33	0.15	0.22	0.09	0.18	0.23	0.28	-
C 11	: 0	0.07	0.12	0.06	0.14	0.06	0.12	0.13	0.23	0.05
C 11	: 1	0.08	0.11	0.11	0.23	0.04	0.11	0.15	0.21	0.12
C 12	: 0	0.78	1.91	4.37	2.14	2.39	4.75	4.77	5.38	4.42
C 12	: 1	0.15	0.18	0.30	0.28	0.08	0.28	0.69	0.45	0.74
C 13	: 0	0.10	0.07	0.10	0.32	0.06	0.20	0.36	0.35	0.45
C 13	: 1	0.21	0.10	0.11	0.48	0.03	0.16	0.34	0.40	0.40
C 14	: 0	2.63	1.63	1.24	1.55	0.33	0.51	1.96	0.44	1.42
C 14	: 1	0.32	0.55	0.33	0.29	0.14	0.26	0.22	0.45	0.18
C 15	: 0	1.46	0.77	0.84	0.42	0.27	0.47	2.00	0.61	0.86
C 15	: 1	0.41	0.37	0.22	0.27	0.13	0.22	0.36	0.45	0.29
C 16	: 0	23.36	10.23	3.48	12.31	17.01	19.21	19.90	29.09	20.51
C 16	: 1	3.74	2.37	1.62	2.90	1.96	2.78	3.51	1.30	3.23
C 17	: 0	0.97	0.32	0.31	1.32	0.76	0.71	1.37	1.19	1.02
C 17	: 1	0.58	0.41	0.26	0.51	0.34	0.48	0.62	0.26	0.37
C 18	: 0	13.27	4.69	3.27	10.94	11.79	11.31	16.17	14.37	11.79
C 18	: 1	16.50	5.40	4.77	14.64	22.34	14.52	17.21	14.95	16.64
C 18	: 2	2.87	2.37	2.44	2.45	3.68	2.36	2.97	1.31	2.74
C 18	: 3	0.71	2.47	3.90	1.01	2.14	1.09	1.18	0.72	0.94
C 20	: 0	0.86	1.72	1.01	1.05	3.22	1.67	2.98	1.38	0.32
C 20	: 1	11.40	19.66	29.35	2.38	5.48	6.97	1.99	2.01	2.25
C 22	: 0	13.51	24.42	22.06	36.90	11.28	23.17	13.16	19.60	27.14
C 22	: 1	1.92	1.77	2.24	2.22	5.79	1.62	2.96	2.36	1.26
C 23	: 0	1.04	3.16	3.46	0.96	2.18	1.15	1.12	2.19	0.96
C 23	: 1	1.43	3.08	1.07	1.12	3.07	1.51	0.78	2.44	0.66
C 24	: 0	1.30	11.69	2.55	2.23	3.13	1.37	1.71	2.36	0.34
C 24	: 1	-	-	-	-	0.97	2.14	1.02	0.96	0.48
TOTAL		99.99	99.99	99.99	99.99	99.92	99.99	99.97	99.99	99.98



Table 3. Fatty acids repartition among diglycosylceramides.

		Styless W166K 0 a	W166K.W166K 3 a	W166K.T2U 3 a	W166K.W166K 24 a	W166K.T2U 24 a	T2U.T2U 24 a	T2U.W166K 24 a	Pollen W166K	Pollen T2U
C 10	: 0	0.52	0.35	0.13	0.27	0.33	0.10	0.27	0.73	1.01
C 10	: 1	0.40	0.37	0.28	0.22	0.29	0.38	0.15	0.79	1.20
C 11	: 0	0.21	0.43	0.13	0.14	0.24	0.09	0.10	0.63	0.31
C 11	: 1	0.16	0.12	0.09	0.13	0.08	0.13	0.25	0.59	0.59
C 12	: 0	2.27	4.50	6.31	7.42	0.35	3.90	1.29	3.05	5.48
C 12	: 1	0.29	0.27	0.22	0.33	0.21	0.13	0.12	0.57	0.60
C 13	: 0	0.29	0.15	0.23	0.14	0.23	0.21	0.11	0.60	0.56
C 13	: 1	0.55	0.33	0.22	0.23	0.49	0.17	0.29	0.49	0.44
C 14	: 0	1.37	0.37	0.40	0.46	0.51	1.39	1.75	1.20	1.49
C 14	: 1	0.58	0.32	0.20	0.41	0.65	0.44	0.35	0.50	0.64
C 15	: 0	0.76	0.79	0.33	1.01	0.30	1.00	0.25	1.17	1.78
C 15	: 1	0.69	0.52	0.37	0.52	0.26	0.39	0.22	0.47	0.70
C 16	: 0	19.10	10.25	11.19	10.52	3.79	15.39	13.07	16.28	18.33
C 16	: 1	2.33	2.78	2.77	3.31	0.39	4.54	3.10	4.13	4.18
C 17	: 0	1.77	1.02	1.78	2.79	5.20	1.43	2.56	1.33	2.00
C 17	: 1	0.34	0.50	0.50	0.60	0.42	0.48	0.52	0.73	0.71
C 18	: 0	11.58	7.33	10.58	18.52	2.19	8.35	3.61	15.05	10.32
C 18	: 1	2.96	11.36	18.33	17.19	3.52	13.55	11.25	19.06	13.22
C 18	: 2	1.28	2.97	3.58	3.37	2.25	2.39	2.63	3.31	2.37
C 18	: 3	0.25	1.16	0.52	1.13	2.30	0.32	1.08	0.54	0.75
C 20	: 0	1.24	2.01	1.36	3.32	0.47	1.12	0.75	1.61	0.77
C 20	: 1	2.39	3.05	2.79	1.46	0.31	1.69	0.90	1.09	0.37
C 22	: 0	28.19	24.06	22.44	7.54	54.05	26.55	38.78	16.25	21.36
C 22	: 1	1.65	5.04	1.62	2.29	2.31	2.27	1.00	0.75	0.33
C 23	: 0	1.92	3.42	1.73	5.55	1.29	3.78	1.20	1.85	1.99
C 23	: 1	2.42	5.50	3.27	2.98	2.27	3.26	1.34	2.05	2.57
C 24	: 0	3.45	3.44	4.90	3.24	0.39	2.57	3.91	2.27	1.39
C 24	: 1	1.56	5.67	3.32	5.31	1.40	2.55	2.13	1.14	2.23
TOTAL		99.98	99.99	99.99	100.00	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99

Table 4. Fatty acids repartition among triglycosylceramides.

		Styless W166K 0 a	W166K.W166K 3 a	W166K.T2U 3 a	W166K.W166K 24 a	W166K.T2U 24 a	T2U.T2U 24 a	T2U.W166K 24 a	Pollen W166K	Pollen T2U
C 10	: 0	0.25	0.25	0.30	3.31	3.68	2.32	3.56	1.70	0.81
C 10	: 1	0.17	0.38	0.30	3.51	3.19	2.18	3.20	1.90	1.18
C 11	: 0	0.15	0.37	0.68	2.28	2.50	1.69	2.71	1.50	1.01
C 11	: 1	0.06	0.21	0.53	1.97	2.20	1.51	2.42	1.28	1.05
C 12	: 0	1.20	1.44	1.88	4.53	4.69	3.73	5.46	3.33	1.93
C 12	: 1	0.13	0.24	0.51	1.90	2.10	0.99	2.17	0.98	1.33
C 13	: 0	0.24	0.44	0.65	1.29	1.94	1.13	1.91	0.32	1.31
C 13	: 1	0.13	0.20	0.54	1.15	1.74	0.79	1.32	0.77	1.35
C 14	: 0	1.37	1.99	1.89	1.38	2.51	3.13	2.02	2.07	1.33
C 14	: 1	2.90	2.44	2.35	1.27	1.31	1.26	1.72	1.04	1.61
C 15	: 0	2.14	2.02	2.19	1.37	2.39	3.44	1.99	2.19	2.02
C 15	: 1	0.83	0.66	0.92	0.73	1.38	0.77	0.91	0.49	1.10
C 16	: 0	15.52	18.03	26.16	22.45	39.90	26.33	19.19	22.29	10.22
C 16	: 1	3.46	5.27	4.53	2.90	4.04	4.78	3.25	5.39	3.66
C 17	: 0	2.35	1.46	1.60	1.51	1.92	2.26	2.35	2.14	1.75
C 17	: 1	1.05	0.62	0.70	0.25	0.38	0.72	1.43	1.42	1.26
C 18	: 0	11.35	19.29	14.92	15.49	14.31	19.96	13.14	14.32	6.37
C 18	: 1	19.38	15.96	12.48	5.65	2.59	3.26	3.53	16.30	3.51
C 18	: 2	3.25	2.96	1.15	1.16	3.75	0.24	0.97	2.44	2.15
C 18	: 3	0.36	0.36	0.40	0.69	0.59	0.50	0.79	0.56	1.68
C 20	: 0	1.19	1.24	1.23	1.90	1.79	1.70	2.05	1.23	1.12
C 20	: 1	1.39	1.18	1.40	1.30	1.09	0.95	1.28	0.55	0.54
C 22	: 0	17.56	12.39	12.35	3.33	3.02	7.58	11.77	3.39	42.70
C 22	: 1	0.95	2.45	0.35	1.44	1.13	1.20	1.57	1.98	0.71
C 23	: 0	1.30	1.27	0.50	1.34	1.27	1.44	1.53	0.74	0.46
C 23	: 1	1.36	2.30	1.24	3.47	1.40	1.50	2.68	1.46	1.09
C 24	: 0	1.40	2.64	1.59	2.50	2.24	1.58	2.58	1.19	0.74
C 24	: 1	1.35	1.03	1.25	2.15	1.42	1.05	1.35	1.38	0.50
TOTAL		99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99



Table 5. Fatty acids repartition among tetraglycosylceramides.

		Stylar W166K 3 a	W166K W166K 3 a	W166K T2U 3 a	W166K W166K 24 a	W166K T2U 24 a	T2U T2U 24 a	T2U W166K 24 a	Pollen W166K	Pollen T2U
C 10	0	1.37	1.52	1.85	1.73	0.83	1.13	1.44	1.24	1.59
C 10	1	2.14	1.80	1.80	2.08	1.11	1.15	1.55	1.02	1.37
C 11	0	1.69	1.30	1.35	1.89	0.64	0.60	1.72	0.95	0.98
C 11	1	1.49	1.18	1.16	1.79	0.60	0.40	1.63	0.97	0.86
C 12	0	3.29	2.78	2.41	3.92	1.45	2.04	3.41	2.22	2.96
C 12	1	1.17	0.86	0.56	1.40	0.72	0.16	1.84	0.68	0.69
C 13	0	1.15	0.38	0.96	1.50	0.67	0.47	1.35	0.78	0.64
C 13	1	0.95	0.64	0.39	1.17	0.55	0.15	1.52	0.50	0.47
C 14	0	1.52	1.78	2.07	2.08	0.79	1.35	2.18	1.25	1.34
C 14	1	2.29	2.43	2.98	1.45	0.37	0.73	2.30	1.77	1.56
C 15	0	2.02	1.77	2.34	2.31	0.57	1.96	2.34	1.45	2.37
C 15	1	1.06	0.50	0.72	0.88	0.21	0.36	1.29	0.33	0.51
C 16	0	20.48	19.28	20.61	19.79	2.37	22.83	16.59	18.56	20.01
C 16	1	6.34	5.38	7.55	6.44	0.60	7.84	5.27	4.00	4.35
C 17	0	2.34	2.02	1.99	2.27	0.50	2.39	2.34	1.72	1.71
C 17	1	0.98	0.96	0.83	1.08	0.25	1.01	1.00	0.79	0.77
C 18	0	10.12	11.55	10.08	9.65	1.34	12.37	8.41	10.28	12.38
C 18	1	15.39	14.55	16.10	15.23	0.79	19.00	12.35	10.39	13.73
C 18	2	2.46	2.55	3.14	3.47	0.35	4.25	3.17	2.91	3.03
C 18	3	0.60	0.49	0.47	0.84	0.24	1.55	0.35	1.47	1.65
C 20	0	1.88	3.58	2.23	1.57	0.59	2.16	1.25	2.51	2.78
C 20	1	1.34	4.11	0.95	1.07	0.19	1.06	0.74	0.66	0.91
C 22	0	13.42	11.67	11.47	11.30	79.35	8.77	20.30	26.38	16.36
C 22	1	0.67	0.78	0.98	0.58	3.82	0.63	0.54	1.40	1.84
C 23	0	0.73	0.81	0.98	1.41	0.38	1.40	0.66	1.15	1.19
C 23	1	0.37	1.70	1.30	1.25	0.33	1.60	0.72	1.26	1.02
C 24	0	0.30	1.18	1.27	1.84	0.70	0.99	0.79	1.76	1.32
C 24	1	0.73	1.42	0.95	1.02	0.48	1.43	0.72	1.07	1.29
TOTAL		99.39	99.98	99.99	99.97	99.99	99.99	99.97	99.98	99.98

Table 6. Fatty acids evolution among the various glycosphingolipids with regard to genotype of the pollinated style.

STYLAR GENOTYPE	W166K					T2U				
	CER	MGCER	DGCER	TGCER	TRGCER	CER	MGCER	DGCER	TGCER	TRGCER
O/E RATIO										
OS/ES RATIO										
OU/EU RATIO										
FATTY ACIDS c10 to c15										
FATTY ACIDS c14 to c17										
FATTY ACIDS c18 : 0.1.2.3										
FATTY ACIDS c20 to c24										
SATURATION DEGREE										

+ : SELF POLLINATION - x : CROSS POLLINATION



3.2. - *Pollinations and distribution of the fatty acids in the various GSL according to the aliphatic chain length:*

The evolution of the repartition of the fatty acids in the various classes of neutral GSL is considered in terms of aliphatic chain length, after some self- or cross-pollinations of 8 and 24 hours. For our purpose, we have divided the fatty acids into 3 groups according to the number of carbon atoms of the aliphatic chain, i.e., the short-chained (C10 to C13) the medium-chained (C14 to C17) and the long-chained fatty acids (C20 to C24).

3.2.1. short and medium chained fatty acids:

After 8 hours, self and cross-pollinations are accompanied by a real decrease in the amount of short- and medium-chained fatty acids (with an exception for the C10: 1). After 24 hours, cross-pollination by itself causes a new increase in the amounts of short-chained fatty acids in the MGCER, DGCER and TRGCER. The medium-chained fatty acids display a roughly similar behaviour, and the opposition between self- and cross-pollination is mainly marked at the level of the DGCER, TGCER and TRGCER.

3.2.2. long-chained fatty acids:

The results of this study corroborate our previous observation (Coustaut et al. 1978; Bris and Delbart 1978). Generally speaking 8 hours after cross- or self-pollination, the amounts of long-chained fatty acids increase; after 24 hours, cross-pollination differs from self-pollination by a real decrease in those fatty acids.

3.2.3. C18 chained fatty acids:

The behaviour of the C18 chained fatty acids was considered separately for several reasons. They can be considered as a "pivot" in the analytic classification proposed for the fatty acids as they are just halfway between the medium and long-chained fatty acids. They are also of quantitative importance in the pollen or virgin style extracts. For instance, the stearic and oleic acids are the major fatty acids of both extracts. The study of the evolution of the amounts of those C18 chained fatty acids during pollination leads us to divide the various GSL into two distinct groups: the first one includes CER and MGCER; the other one includes DGCER and TRGCER.

Stearic, oleic, linoleic and linolenic acids of CER, MGCER diminished 8 hours after pollination (compatible or not); after 24 hours, they show a distinctly new increase.

On the other hand, the analysis of the distribution of those same fatty acids in the GSL of the second group follows a novel, more complex evolution, which makes any schematization very difficult. However, cross and self-pollinations are very distinct, especially 24 hours after fertilization. The TGCER seem to be an intermediate group which takes place between the first CER-MGCER (characterized by low amounts of C18 chained fatty acids after self-pollination) and the other one, which has an opposite behaviour.

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

The variations in the composition of fatty acids among the whole GSL have been reported in previous studies (Coustaut et al. 1978; Bris and Deibart 1978). They are characterized by an increase in the amount of the long-chained fatty acids at the expense of the short-chained ones, 8 hours after self- and cross-pollination. This increase is followed, 24 hours after cross-pollination, by a reversal of the repartition profile. On the other hand, self-pollination emphasized the response obtained after 8 hours.

The analysis of the repartition of the fatty acids among the various classes of GSL was made after fractionation and purification of the GSL. It is interesting to observe that:

1) the variation of the distribution of the fatty acids among the CER and MGCER is similar to the one they have among the total GSL. This can be explained by the quantitative importance of these GSL (CER and MGCER) whose weight represents 63 to 86% of the whole neutral GSL. It seems reasonable to state that they are responsible for the general orientation of the distribution of the fatty acids among the total GSL. However, this distribution cannot be generalized, it does not coincide at all with the results obtained for the DGCER and T_R GCCER.

2) there is an obvious connection between the distribution of fatty acids and the length, number (odd or even) of carbon atoms and saturation degree of their aliphatic chain.

In order to schematize our results and to make some possible metabolic interrelations conspicuous we have grouped our results of the evolution of the fatty acids during the fertilization process (Table 7). This includes the evolution of:

- the O/E ratio of the fatty acids with odd (O) or even (E) number of C atoms, regardless of saturation degree; the OS/ES ratio is limited to the saturated fatty acids (S); the OU/EU ratio is restricted to the unsaturated fatty acids (U):

- the repartition of the short chained fatty acids (C10-C13);
- the repartition of the medium chained fatty acids (C14-C17);
- the repartition of the C18 chained fatty acids;
- the repartition of the long chained fatty acids (C20-C24);
- the saturation degree.

Evolution of the same types are made conspicuous with shaded or dotted squares while the white squares to the intermediate responses, which are less marked.

There are two contrasting behaviours: that of the CER - MGCER, and that of the DGCER - T_R GCCER. One might attempt an explanation with respect to the odd and even number of osidic residues contained in the GSL, or/and to metabolic interactions. The CER and MGCER can be considered as metabolic junctions or precursors of the more complex GSL. Pollination will affect the CER-MGCER, which are the first step in the initiation of the metabolic chain, more rapidly than the DGCER- T_R GCCER, which are derived from the former.

But this metabolic chronology is far from being sufficient to account for the physiological differences which lie between the 2 groups. It seems very likely, however, that the two behaviours illustrated by the two responses depend on the length of the oligosaccharidic chain constitutive of the GSL.

It is important to point out that, for the better understanding of the relations that join GSL and pollinations processes in *Petunia hybrida*, the study of the evolution of the fatty acids is of great interest.

Table 7. Fatty acids evolution after pollination.

POLLINIC FATTY ACIDS				STYLAR FATTY ACIDS				
			CER					
c20 : 1	c22 : 0	c23 : 1		c13:0	c15:0	c16:0	c16:1	c18:0
≡ ↗	↗ ↗	↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_3.S_3$	↘ ↗	↘ ↗	↘ ↘	↘ ↗	↘ ↗
↗ ↘	↗ ↘	↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_1.S_2$	↘ ↗	↘ ↗	↘ ↗	↘ ↗	↘ ↗
			MGCER					
c12 : 0		c22 : 0		c14 : 0	c15 : 0	c16 : 0	c16 : 1	
↗ ↘		↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_3.S_3$	↘ ↘	↘ ↘	↘ ↗	↘ ↗	
↗ ↗		↗ ↗	$S_1.S_2 \times S_1.S_2$	↘ ↘	↘ ↘	↘ ↗	↘ ↗	
			DGCER					
c12 : 0	c16 : 1	c18 : 2		c14 : 0		c16 : 0		
↗ ↘	↗ ↘	↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_3.S_3$	↘ ↗		↘ ↘		
↗ ↗	↗ ↗	↗ ↗	$S_1.S_2 \times S_1.S_2$	↘ ↘		↘ ↗		
			TGCER					
c12 : 0	c16 : 0	c18 : 0		c14 : 0	c14 : 1	c15 : 0	c16 : 1	
↗ ↗	↗ ↘	↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_3.S_3$	↘ ↗	↘ ↘	↘ ↗	↘ ↘	
↗ ↗	↗ ↗	↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_1.S_2$	≡ ↘	↘ ↘	↘ ↘	↘ ↘	
			TRGCER					
c20 : 0	c22 : 0	c24 : 0		c15 : 0		c16 : 0		
↗ ↘	↘ ↗	↗ ↘	$S_1.S_2 \times S_3.S_3$	↗ ↘		↗ ↘		
↗ ↘	↘ ↘	↗ ↗	$S_1.S_2 \times S_1.S_2$	↘ ↗		↘ ↗		

THE FIRST ARROW IS ILLUSTRATING THE EVOLUTION OF THE FATTY ACIDS DURING THE 0-8 H PERIOD. THE SECOND ONE REPRESENTS THEM FOR THE 8-24 H PERIOD.

It seems well-established by this analysis (Table 6) that the coexistence of fatty acids of pollinic or stylar character, as it is encountered after cross-pollination, is a requisite condition for the normal development of fertilization. The fact that these fatty acids are constitutive of some strictly membraneous molecules brings a new emphasis on the research undertaken. Some recent data (Friedman 1977; Critchley and Vicker 1977) assign a major role to the fatty acids in the establishment of the membraneous structure, as well as in the control of some physiological properties. Thus ionic permeability, activity of membraneous enzymes and electric properties (membraneous resistance, spike) depend strictly on a given composition in fatty acids, every change of which will induce modifications of those properties. Therefore, membranes most probably play prevailing roles in the pollination process. Some recent data relate that reception of a pollinic recognition signal by the stylar tissues is perceptible at the level of an electrophysiological behaviour (Linskens and Spanjers 1973), but also have major parts in the slow transmission of this ionogenic signal (Linskens and Spanjers 1973; Deurenberg 1977).

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to Misses P. Coors, E. Jans, B. Lacroix and A. Welcker for their technical assistance, and Mr. A.H. Glaap for culturing the plant material.

LITERATURE

- Bris, B. and C. Delbart - The glycosphingolipids of the pollen and the style in *Oenothera missouriensis* Sims, self incompatible species. Incompatibility Newsletter 9, 74-77 (1978).
- Coustaut, D., H.F. Linskens, Y. Moschetto and C. Delbart - Quelques aspects du métabolisme des glycosphingolipides des styles et du pollen chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible. Soc. Bot. Fr.: Actualités botaniques 1-2, 69-77 (1978).
- Critchley, D.R. and M.G. Vicker - In: "Dynamic aspects of cell surface organization". G. Poste and G.L. Nicolson (eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, 307-370 (1977).
- Davis, M.T. and D.F. Silbert - Changes in cell permeability following a marked reduction of saturated fatty acid content *Escherichia coli* K12. Biochim. Biophys. Acta 373, 224-241 (1974).
- Delbart, D. - Evolution des glycosphingolipides chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible, après pollinisation. Thèse de Doctorat 3ème cycle. Lille.
- Delbart, C., H.F. Linskens, B. Bris, Y. Moschetto and D. Coustaut - Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*, a self incompatible species. I. Composition in fatty acids and in long chained bases of pollen and unpollinated style. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C 83, 229-239 (1980).
- Deurenberg, J.J.M. - Evidence against the formation of fast diffusing substances preceding fertilization in *Petunia*. Acta Bot. Neerl. 26, 353-355 (1977).
- Friedman, K.J. - Role of lipids in the *Neurospora crassa* membrane. II. Membran potential and resistance studies. The effect of altered fatty acids composition on the electrical properties of the cell membrane. J. Membrane Biol. 36, 175-190 (1977).
- Gaver, R.G. and C.C. Sweeley - Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long chained bases by gas liquid chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 294-298 (1965).
- Haslam, J.M., T.M. Spithill, A.N. Linnane and J.B. Chappell - The effects of altered membrane lipid composition on cation transport by mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 134, 949-957 (1973).
- Linskens, H.F. and J. Straub - A mutant collection of *Petunia hybrida*. Incompatibility Newsletter 10, 123-131 (1978).
- Linskens, H.F. and A.W. Spanjers - Changes of the electrical potential in the transmitting tissue of *Petunia* styles after cross- and self-pollination. incompatibility Newsletter 3, 81-85 (1973).
- Wojtczak, L. - Effect of fatty acids and acyl-Co-A on the permeability of mitochondrial membranes to monovalent cations. FEBS Lett. 44, 25-30 (1974).

PUBLICATION IV

**Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*,
a self incompatible species**

**III. Evolution of the long chained bases
after self- and cross-pollination**

by C. Delbart,¹ B. Bris,¹ H.F. Linskens² and D. Coustaut¹

¹ *Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté de Pharmacie, Lille, France*

² *Department of Botany, Section Molecular Developmental Biology,
Faculty of Sciences, University of Nijmegen, the Netherlands*

Communicated at the meeting of March 29, 1980

SUMMARY

Indications that changes in cellular glycolipids were related to incompatibility of fecundation process stemmed in part from our previous works. As for transformation or malignant processes, we observed a decrease in levels of more complex glycolipids and changes in their fatty acids distribution. It would be also interesting to know whether the change in glycolipid pattern is accompanied by changes in the distribution of sphingosine and derivatives. Their own antigenic properties made long-chained bases (LCB) of a considerable interest to those studying membrane structure. A comparison of the LCB distribution among various glycosphingolipids (GSL) in cross and self-pollinated styles is made. The results are interpreted as an induction in the pollinated styles of a characterized pollinic metabolism followed by a return to an intermediary metabolism that can promote compatible growth of the pollinic tube. Precisely how the initiation of the fecundation process can produce a modification in the glycolipid biosynthetic machinery of the style is an open question.

RESUME

Nous avons mis en évidence des changements au niveau des glycolipides en relation avec le phénomène d'incompatibilité de fécondation. Comme au cours des processus de transformation ou malins, nous avons enregistré la diminution des taux de glycolipides complexes, et des variations dans leur composition en acides gras. Il nous a semblé intéressant d'étudier la distribution des bases à longues chaînes (LCB). Leurs propriétés antigéniques propres leur confèrent un rôle important au niveau des membranes. Nous avons comparé la distribution des LCB au niveau des glycosphingolipides des styles pollinisés. Il semble qu'il y ait induction dans un premier temps d'un métabolisme à caractère pollinique suivi ensuite par l'installation d'un métabolisme intermédiaire en relation avec la croissance ou non d'un tube pollinique. Il reste à définir comment sont initiés ces changements dans le métabolisme des glycolipides.

1. INTRODUCTION

The physiological events that take place after cross- or self-pollination are results of recognition of the pollen by the pistil. This mutual recognition process, and related exchanges and metabolism, are controlled by mechanisms strictly defined by genetic controls from both partners. Gametophytic incompatibility of fecundation provides definitive evidence for cell recognition, as a pollen carrying a S incompatibility allele is rejected by a style bearing the same S-allele (Linskens 1974; De Nettancourt 1977).

Recent data gave indications that GSL are related to structural and physiological properties of the membrane (Critchley and Vicker 1977). Their antigenic properties, apparently expressed at the cell surface, make glycolipids interesting to those studying the changes in cell surfaces which are associated with the cell recognition process. It is apparent from our preliminary work (Coustaut et al. 1978; Bris and Delbart 1978; Delbart 1978) that it is of interest to consider the eventual relationship between pollination and membrane. We first analysed (Delbart et al. 1980) the evolution of the glycosphingolipids in pollen and unfertilized styles and we now subsequently report the evolution of the distribution of the long-chained bases among the various GSL after cross and self-pollinations. Such long-chained bases (LCB) as sphingosine are implicated in the establishment of a lipidic matrix, thus creating a hydrophobic zone (Karlsson 1971; Ando and Yamakawa 1970), and also in the expression of the haptenic properties of GSL and of their derived recognition capacity (Uemura et al. 1976; Alving and Richards 1977).

Abbreviations:

LCB	long-chained bases
GSL	glycosphingolipids
CER	ceramides
MGCER	monoglycosylceramides
DGCER	diglycosylceramides
TGCER	triglycosylceramides
TrGCER	tetraglycosylceramides
GLC	gas liquid chromatography
TLC	thin layer chromatography

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. - Material:

The present analysis was performed with *Petunia hybrida*, a self-incompatible species. The various clones W166K (self-incompatibility alleles: S₁S₂) and T2U (self-incompatibility alleles: S₃S₃) were provided by the experimental garden of the Botanic Institute of the University of Nijmegen. Our study includes both pollens and unfertilized styles (of S₁S₂ genotype) and also styles which underwent 8 and 24 hours of pollination according to the following combinations:

- compatible (cross-pollination) S₁S₂ × S₃S₃ and S₃S₃ × S₁S₂;
- incompatible (self-pollination) S₁S₂ × S₁S₂ and S₃S₃ × S₃S₃.

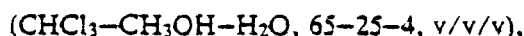
Before it was used the material was lyophilized and stored at -20 °C.

2.2. - *Methods:*

Isolation and identification of the LCB is a complex process involving the following steps: extraction of the total GSL, fractionation of the various GSL classes, isolation and purification of the LCB, and finally, their analysis.

2.2.1. GSL extraction:

Polar lipids were extracted from pollen and styles using Folch's procedure (Folch et al. 1957; Karlsson et al. 1973). After mild alkaline hydrolysis the various CER, MG CER, DG CER, TG CER and T_RGCER were isolated by several chromatographic steps according to the Karlsson methodology (Karlsson et al. 1973). The obtained GSL were then purified by preparative thin layer chromatography (TLC) in the following solvent system:



and developed with Rhodamine (Kates 1972).

2.2.2. GSL hydrolysis:

The various GSL were subjected to acid hydrolysis (1N HCl in CH₃OH with 10 molecules of water) for 23 hours in a nitrogen atmosphere.

2.2.3. Analysis of the LCB composition:

The fatty acids were discarded and the LCB were selectively extracted from the methanolic phase by diethylether under alkaline conditions (Karlsson and Martensson 1968). They were then converted into stable DNP-derivatives by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (Karlsson 1970), and finally into aldehydes by lead-tetra acetate oxydation (Sugita et al. 1976).

The aldehydes were analysed by TLC (Van Dessel et al. 1977) and by GLC (10% DEGS on chromosorb W60-80 mesh, column temperature 150 °C, and a nitrogen stream of 19-20 ml/min) (Karlsson and Martensson 1968; Karlsson 1970).

In order to corroborate the aldehydes identities, a complementary study was performed by oxidizing the aldehydes with KMnO₄ without prior catalytic hydrogenation (Slomiany and Horowitz 1970). The obtained fatty acids were then transesterified by a CH₃OH-H₂SO₄ mixture (Kates 1972), purified by TLC and chromatographed by GLC (10% DEGS on chromosorb W 60-80 mesh AW with a column temperature of 176 °C, and a nitrogen stream of 25 ml/min) (Kates 1972).

3. RESULTS

Twelve aldehydes were identified and they are corresponding to the 24 LCB listed in Table 1. The results of the distribution of LCB among the various GSL are listed in Tables 2 to 6. These results were then analysed with regard to:

- LCB composition of pollen and unfertilized styles;
- LCB evolution after cross and self-pollinations;
- influence of the unpollinated style and pollen genotype.

3.1. - Evolution of the LCB distribution among the ceramides:

It was previously possible (Delbart et al. 1980) to point out that high amounts of heptadecaspheganine (d17 : 0) and hydroxyspheganine (t18 : 0) are characteristic of W166K pollen while heptadecaspheganine (d17 : 1) is encountered more often in T2U pollen. On the other hand, the W166K unfertilized styles can be distinguished by the presence of hexadecaspheganine (d16 : 1). Thus pollen and unfertilized styles differ greatly by their own LCB distribution.

3.1.1. Cross-pollination:

If we consider the influence of cross-pollination on LCB distribution, we can register a marked decrease in saturation degree. Eight hours after pollination the LCB belonging to groups A and C (d16 : 0, t17 : 0 and d16 : 1) decrease, the LCB levels in the other groups increase. Twenty-four hours after pollination the LCB distribution is reversed.

Table 1. Identification of long chained bases.

group	Long chained bases	Aldehydes
A	hexadecaspheganine d16 : 0	C14 : 0
	hydroxyheptadecaspheganine t17 : 0	tetradecanal
B	heptadecaspheganine d17 : 0	C15 : 0
	hydroxyspheganine t18 : 0	pentadecanal
C	hexadecaspheganine d16 : 1	C14 : 1 tetradecenal
D	spheganine d18 : 0	C16 : 0
	hydroxynonadecaspheganine t19 : 0	hexadecanal
E	heptadecaspheganine d17 : 1	C15 : 1
	hydroxyspheganine t18 : 1	pentadecenal
F	nonadecaspheganine d19 : 0	C17 : 0
	hydroxyeicosaspheganine t20 : 0	heptadecanal
G	sphinganine d18 : 1	C16 : 1 hexadecenal
H	eicosaspheganine d20 : 0	C18 : 0 octodecanal
I	nonadecaspheganine d19 : 1	C17 : 1 heptadecenal
J	? d21 : 0	C19 : 0
	? t22 : 0	nonadecanal
K	sphingadienine ? d18 : 2	C16 : 2 hexadecadienal
L	eicosaspheganine ? d20 : 1	C18 : 1 octodecenal

Table 2. Long chained bases distribution among ceramides.

	Virgin styles W166K	W166K.W166K 3 hours	W166K.T2U 3 hours	W166K.W166K 24 hours	W166K.T2U 24 hours	T2U.T2U 24 hours	T2U.W166K 24 hours	Pollen W166K	Pollen T2U
A 416:0 - 417:0	3,23	3,30	2,50	5,32	4,50	4,77	7,91	8,17	5,76
B 417:0 - 418:0	20,30	28,31	22,14	24,37	23,72	24,51	38,51	28,82	26,92
C 416:1	46,53	33,95	5,65	20,30	39,27	9,98	5,03	5,03	4,96
D 418:0 - 419:0	2,55	2,09	3,86	3,20	4,40	4,92	4,30	6,79	3,10
E - 418:1	9,88	15,37	30,82	21,37	14,15	30,49	21,81	27,31	29,33
F 419:0 - 420:0	3,49	5,85	14,93	8,68	6,27	8,20	10,10	9,21	11,29
G 418:1	9,11	7,05	11,91	7,76	5,50	10,59	7,02	10,08	12,86
H 420:0	4,90	4,07	8,48	7,49	2,18	6,53	5,23	4,58	4,36
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturated(sat.)	34,47	43,62	51,91	50,26	41,07	48,93	66,13	37,57	51,94
unsaturated(unsat)	65,52	56,37	48,08	49,72	58,92	51,06	33,86	42,42	48,05
unsat./sat.	1,901	1,292	0,926	0,989	1,434	1,043	0,512	0,736	0,925

Table 3. Long chained bases distribution among monoglycosylceramides.

	Virgin styles W166K	W166K.W166K 3 hours	W166K.T2U 3 hours	W166K.W166K 24 hours	W166K.T2U 24 hours	T2U.T2U 24 hours	T2U.W166K 24 hours	Pollen W166K	Pollen T2U
A 416:0 - 417:0	0,34	1,46	0,51	0,59	0,31	0,72	0,36	2,97	2,73
B 417:0 - 418:0	2,50	4,27	6,04	1,93	1,68	5,24	1,02	8,36	7,38
C 416:1	7,45	14,17	20,36	10,72	6,40	12,18	11,36	6,76	9,55
D 418:0 - 419:0	0,50	3,29	0,70	0,69	0,66	0,84	1,19	1,56	2,07
E - 418:1	2,08	3,93	0,95	1,05	1,38	1,66	1,78	9,66	9,47
F 419:0 - 420:0	0,75	0,65	0,70	0,85	0,37	1,02	0,81	4,16	3,33
G 418:1	30,07	70,25	68,37	30,44	39,68	75,57	76,42	56,26	59,34
H 420:0	5,40	3,39	1,76	3,72	2,31	2,76	4,55	7,66	4,92
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturated(sat.)	10,39	12,06	9,71	7,78	5,33	10,58	10,43	27,31	21,13
unsaturated(unsat)	89,60	87,93	90,28	92,21	94,66	89,41	89,56	72,68	78,86
unsat./sat.	8,623	7,291	9,297	11,85	19,26	8,45	8,586	2,661	3,732



Table 4. Long chained bases distribution among diglycosylceramides.

	Virgin styles W166K	W166K.W166K 3 hours	W166K.T2U 3 hours	W166K.W166K 24 hours	W166K.T2U 24 hours	T2U.T2U 24 hours	T2U.W166K 24 hours	Pollen W166K	Pollen T2U
A 416:0 - 417:0	3,34	2,43	3,46	2,70	0,93	2,68	1,40	0,47	1,33
B 417:0 - 418:0	5,26	36,47	32,82	31,36	36,50	38,47	41,10	46,85	35,56
C 416:1	1,94	12,67	13,45	12,43	13,73	16,02	16,15	15,72	15,52
D 418:0 - 419:0	44,76	13,38	6,78	7,77	5,20	7,14	6,05	5,22	7,06
E 418:1	7,39	2,18	2,68	3,69	2,12	1,98	1,81	1,35	3,01
F 419:0 - 420:0	5,36	16,35	12,48	14,31	17,65	20,32	18,17	16,24	18,50
G 418:1	23,67	6,97	10,74	10,33	7,99	7,35	3,61	7,78	7,90
H 420:0	7,67	9,04	19,58	17,40	15,87	6,03	6,70	5,06	11,11
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturated(sat.)	66,39	78,17	73,12	73,54	76,15	74,64	72,42	74,54	73,56
unsaturated(unsat)	33,60	21,82	26,87	26,45	23,84	25,35	26,57	25,45	26,43
unsat./sat.	0,506	0,279	0,367	0,360	0,313	0,340	0,362	0,341	0,359

Table 5. Long chained bases distribution among triglycosylceramides.

	Virgin styles W166K	W166K.W166K 3 hours	W166K.T2U 3 hours	W166K.W166K 24 hours	W166K.T2U 24 hours	T2U.T2U 24 hours	T2U.W166K 24 hours	Pollen W166K	Pollen T2U
A 416:0 - 417:0	1,34	0,79	2,00	1,49	1,38	1,03	1,10	1,22	1,03
B 417:0 - 418:0	32,41	37,53	39,80	37,34	41,07	35,01	40,14	42,38	36,03
C 416:1	21,07	16,31	15,10	16,04	17,34	15,51	17,34	19,72	16,59
D 418:0 - 419:0	5,74	6,16	5,56	6,00	5,78	5,39	7,11	5,27	5,42
E 418:1	2,67	2,63	2,30	1,46	1,35	1,08	2,11	1,32	1,56
F 419:0 - 420:0	14,04	19,10	16,92	15,19	17,17	13,58	17,19	14,28	12,73
G 418:1	6,23	10,78	8,43	8,72	7,07	6,06	3,00	5,66	5,21
H 420:0	8,66	4,70	3,05	3,26	3,48	3,24	4,35	3,20	3,13
I 419:1 - 420:1	6,23	1,49	1,83	2,69	3,97	18,59	2,05	6,24	17,59
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturated(sat.)	62,69	68,28	72,33	64,08	68,36	58,75	69,39	67,05	58,34
unsaturated(unsat)	37,30	31,71	27,66	35,91	31,13	41,24	30,10	32,34	41,65
unsat./sat.	0,595	0,464	0,382	0,560	0,452	0,702	0,431	0,491	0,714



Table 6. Long chained bases distribution among tetraglycosylceramides.

	Virgin styles W166K	W166K.W166K 3 hours	W166K.T2U 3 hours	W166K.W166K 24 hours	W166K.T2U 24 hours	T2U.T2U 24 hours	T2U.W166K 24 hours	Pollen W166K	Pollen T2U
A 416:0 - 417:0	1,22	1,62	1,59	0,52	1,32	0,54	0,78	1,24	1,35
B 417:0 - 418:0	37,24	47,18	38,07	22,23	39,31	36,26	41,39	33,59	37,56
C 416:1	17,37	18,47	15,30	10,41	17,57	17,75	18,38	16,78	18,77
D 418:0 - 419:0	7,59	4,47	3,14	2,38	3,19	4,38	4,69	6,12	3,74
E - 418:1	1,39	1,53	2,31	1,17	2,16	1,36	1,32	2,32	1,53
F 419:0 - 420:0	17,24	15,02	13,55	25,57	11,93	13,96	13,24	12,14	13,55
G 418:1	3,28	7,12	5,37	4,40	5,12	5,72	6,20	5,18	6,03
H 420:0	4,51	2,14	1,58	2,47	1,52	3,56	1,96	2,57	3,07
I 419:1 - 420:1	4,05	2,44	12,38	1,37	4,55	3,72	4,41	3,07	1,76
J 421:0 - 422:0	traces	traces	traces	11,94	3,16	2,72	2,45	2,05	4,31
K 418:2 (?)	-	-	-	11,55	-	3,35	1,89	4,90	5,08
L 420:1 - 421:1	traces	traces	traces	3,98	4,26	5,97	2,07	4,43	3,54
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
saturated(sac.)	67,30	70,43	63,03	66,71	65,43	61,12	65,11	67,71	63,08
unsaturated(unsat.)	32,09	29,56	36,96	33,28	34,56	38,37	34,88	42,28	36,91
unsat./sac.	0,472	0,419	0,586	0,498	0,528	0,635	0,535	0,712	0,585

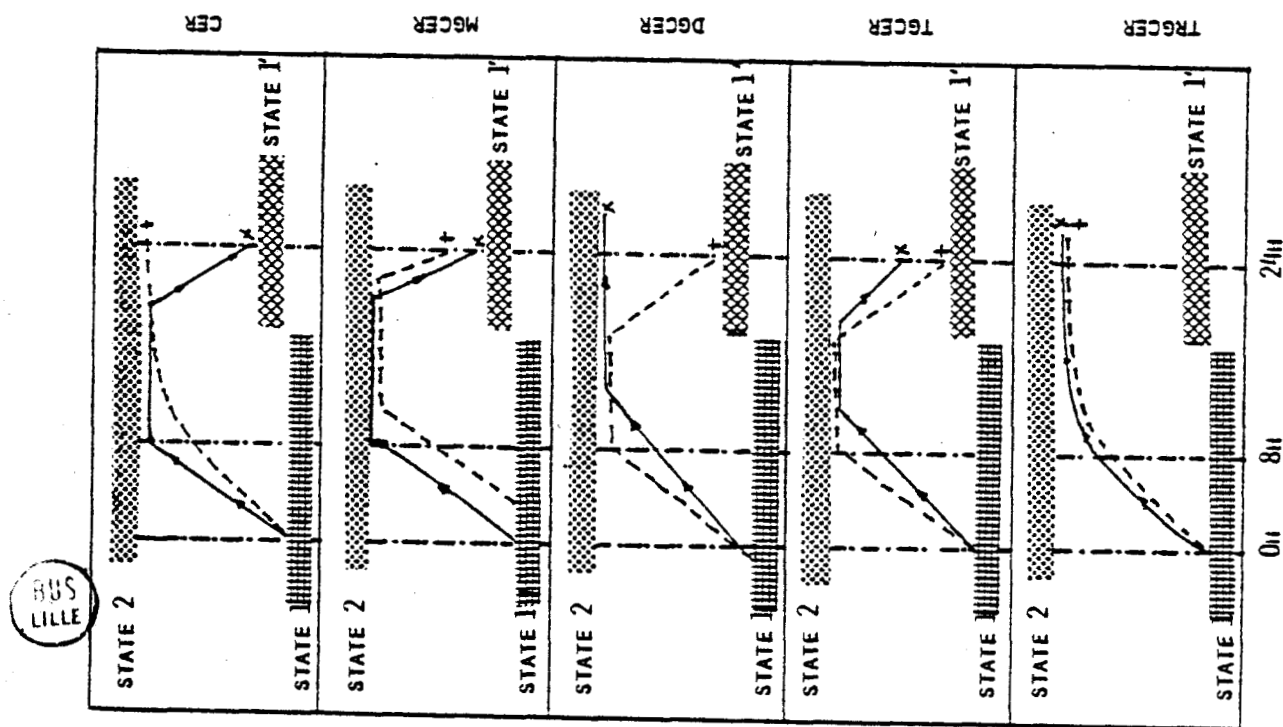


Figure 1. Hypothetic schematisation of the various metabolic inductions.

It seemed valuable to investigate the behaviour of hexadecasphingenine (d16 : 1). This is one of the major bases found in the styles (46, 5%) and is sometimes also encountered in pollen ceramides (5%). Eight hours after cross-pollination its level decreases until only 5%. This value is the same as that found in pollinic distributions (Figure 1). These facts cause us to notice that the first manifestation of pollination is the induction of new metabolism with marked pollinic characteristics (state 2). Later a new increase of the amount of hexadecasphingenine takes place. The pollinic metabolism was temporary and is substituted with a distribution profile which, despite of some perturbations, approaches the virgin style profile (state 1').

3.1.2. Self-pollination:

Self-pollination also disturbs the LCB distribution profile. The modifications are complex and difficult to schematize.

Eight hours after pollination the hexadecasphingenine levels also decrease, but to a less marked degree than after cross-pollination. The LCB levels of the other groups increase, with the exception of sphingosine and eicosasphinganine. Twenty-four hours after incompatible mating, the eight hours distribution profile is confirmed with, for example, hexadecasphingenine still decreasing. There is no return to a perturbed stilar metabolism (Fig. 1).

3.2. - Evolution of the LCB distribution among the monoglycosylceramides:

The LCB distribution among MGCER has been analysed prior to pollination in pollinic and stilar extracts (Delbart et al. 1980). This distribution is basically different from the previous ones encountered among CER. Pollinic MGCER are characterized by high amounts of LCB from B (heptadecasphinganine-hydroxysphingosine) and E (heptadecasphingenine-hydroxysphingenine) groups. Sphingenine (G group), however, is abundant in pollen (57%), and is, in fact, the major LCB in the unfertilized styles (80%).

We now consider the evolution, using pollination, of the LCB in B, C, E and G groups.

3.2.1. Cross-pollination:

Cross-pollination disturbs the LCB distribution in MGCER. As for the CER, the 8 hours pollination treatment induces the augmentation of LCB with pollinic characteristics (B and C groups especially), and decreases stilar LCB (G group). After 24 hours the distribution profile is reversed, as is shown by the decrease of pollinic LCB which is subsequently balanced by a new increase of stilar LCB (Figure 1). The desaturation degree progressively increases.

3.2.2. Self-pollination:

Self-pollination produces, but not so quickly, the same variations as cross-pollination with the exception of a minor LCB belonging to A, D, E and F groups (Fig. 1).

3.3. - Evolution of the LCB distribution among diglycosylceramides:

Pollen and unfertilized styles do not possess the same DGCER. In virgin W166K styles they are characterized by a predominance of LCB from D (sphinganine-hydroxynonadecaspheganine), E (heptadecaspheganine-hydroxysphinganine) and G groups (sphinganine). On the other hand, pollinic DGCER possess LCB from B (heptadecaspheganine, hydroxysphinganine), C (hexadecaspheganine) and F (nonadecaspheganine-hydroxyeicosaspheganine) groups.

3.3.1. Cross-pollination:

Eight hours of cross-pollination reduces the amount of stelar bases (D, E and G groups) and simultaneously augments the levels of pollinic bases of the B, C and F groups. This pollinic profile is confirmed 24 hours after compatible mating (Fig. 1).

3.3.2. Self-pollination:

Eight hours of incompatible pollination is followed by the induction of a temporary pollinic profile. Later on (24 hours) an inversion appears, and a perturbed stelar profile takes place in the style (Fig. 1).

3.4. - Evolution of the LCB distribution among triglycosylceramides

LCB distribution among pollinic and unfertilized stelar TGCER is very similar. However, the bases of stelar extracts belong to C (hexadecaspheganine), E (heptadecaspheganine-hydroxysphinganine) and H groups (eicosaspheganine); both W166K and T2U pollen possess bases from the B (heptadecaspheganine-hydroxysphinganine) group. The T2U pollen is also rich in nonadecaspheganine (I group).

Within 8 hours cross- and self-pollinations induce, however weakly, a pollinic repartition profile. This pollinic profile is characterized by a decrease in levels of the stelar bases. Cross-pollination induces this new profile more rapidly than self-pollination.

Self-pollination then sets up a repartition profile with stelar characteristics. This reversion is weaker in the case of cross-pollination (Fig. 1).

3.5. - Evolution of the LCB distribution among tetraglycosylceramides:

It seems that the LCB of the J, K, L groups, indentifications of which are difficult, mainly belong to pollinic extracts. LCB from D, F, G and H groups are characteristic of stelar T_R GGER.

Cross- and self-pollinations are mostly indicated by the progressive decrease of LCB from D, F, G and H groups, and by the gradual appearance of a pollinic distribution which will be completely established 24 hours after pollination (Fig. 1).

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

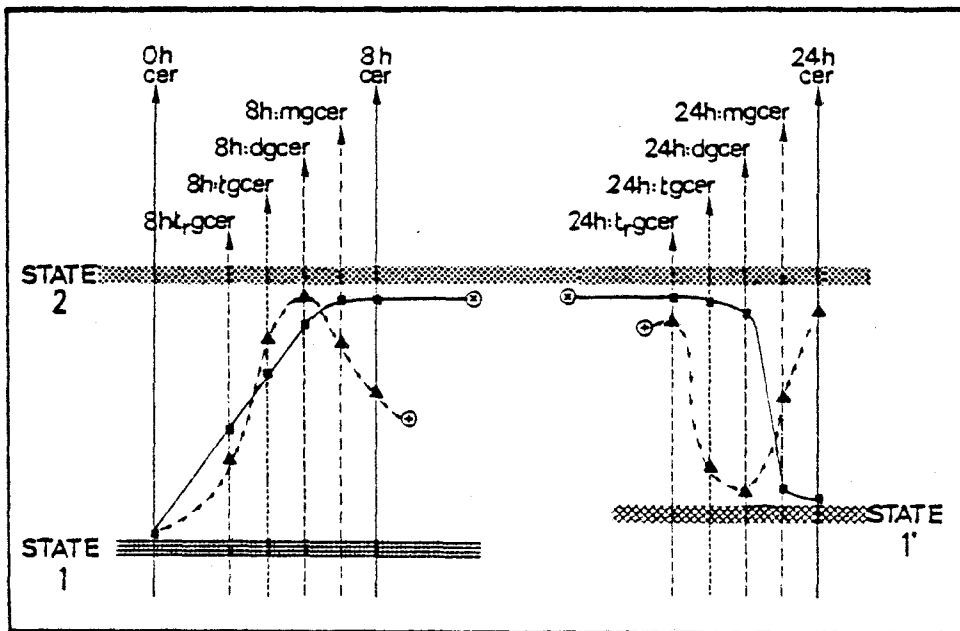
The LCB distribution has been analysed for CER, MGCER, DGCER, TGCER and T_R GGER, in relation to cross- and self-pollinations.

This study brings new details to light on membraneous lipids, and the biochemistry of pollens and styles. LCB distribution varies with pollinic and stylar origin of the extracts. Some quantitative and qualitative variations can be illustrated in the various GSL but generally speaking pollen are rich in heptadecasphinganine and phytosphingosine. The unfertilized styles are characterized by sphingosine.

Cross- and self-pollination induce variations in the LCB distribution. If we consider, for example, the ceramides, cross- and self-pollinations have opposite effects. After the induction of a metabolism with pollinic characteristics (pollinic LCB), self-pollination seems to inhibit every "transition" which will normally ensure the passage of a pollinic metabolism (state 2) to the intermediate metabolism (state 1') needed for the success of fecundation (Fig. 1).

The LCB distribution among various GSL underlines two responses, a quicker one for CER-MGCER, and a slower one for DGCER, TG CER and TRGCER. These may be subject to metabolic delays for the more complex GSL that stem from CER-MGCER.

Figure 2 is presented as an hypothetic metabolic evolution. Three metabolic states are reported: state 1 illustrates the unfertilized style (0 hour), state 2 the pollinic metabolism, and state 1' corresponds to the installation of a perturbed



STATE 1 : INSTALLATION OF THE STYLAR METABOLISM
 STATE 1' : INSTALLATION OF THE PERTURBED STYLAR METABOLISM
 STATE 2 : INSTALLATION OF THE POLLINIC METABOLISM

x : CROSSPOLLINATION
 * : SELF POLLINATION

Figure 2. Hypothetic schematisation of the long chained bases evolution with pollination.

stylar metabolism with a coexistence of both pollinic and stylar parameters. The various GSL are situated according to metabolic chronology, and also according to the results shown in Figure 1. Three phases are identified:

- *phase 1*, during which pollinic metabolism is induced in the style. This induction appears to be earlier and quicker in self-pollination;
- *phase 2*, characterized by opposing responses induced after cross- and self-pollination. Only compatible matings retain the installation of a pollinic metabolism inside the style;
- *phase 3*, during which the opposition between the two pollinations is evident.

The GSL are known to be membraneous constituents but they are also witnesses to the stylar metabolism which is influenced by cross and self-pollination.

It becomes evident that self-pollination may be closely related to some membrane structures unfavorable to the maintenance of a metabolism which has to promote pollen tube growth. This is clearly illustrated by the behaviour of hexadecasphingenine. This LCB, major base of virgin styles, always decreases in value after self-pollination but not after cross-pollination. It seems that its synthesis is not maintained by the incompatible pollen tube. It can be considered as evidence to the architectural membrane conditions that are necessary for pollinic tube growth and for the success of fecundation.

ACKNOWLEDGEMENT

We are thankful to Misses P. Coors, E. Jans, B. Lacroix and A. Welcker for their technical assistance. The assistance of Mr. A.H. Glaap, chief gardener, was appreciated. We thank Mrs. Ann Jenks-Coupland very much for correcting the English text.

LITERATURE

- Alving, C.R. and R.L. Richards - Immune reactivities of antibodies against glycolipids. II. Comparative properties, using liposomes, of purified antibodies against mono-, di- and trihexosylceramide haptens. *Immunochemistry* 14, 383-389 (1977).
- Ando, S. and T. Yamakawa - Oligosaccharide of Forssman-active sheep red cell glycolipid. *Chem. Phys. Lipids* 5, 91-95 (1970).
- Bris, B. and C. Delbart - The glycosphingolipids of the pollen and the style in *Oenothera missouriensis* Sims, self incompatible species. *Incompatibility Newsletter* 9, 74-77 (1978).
- Coustaut, D., H.F. Linskens, Y. Moschetto and C. Delbart - Quelques aspects du métabolisme des glycosphingolipides des styles et du pollen chez *Petunia hybrida*, espèce autoincompatible. *Soc. Bot. Fr.: Actualités botaniques* 1-2, 69-77 (1978).
- Critchley, D.R. and M.G. Vicker - In "Dynamic aspects of cell surface organization". G. Poste and G.L. Nicolson eds. Elsevier North Holland Biomedical press, Amsterdam, p. 307-370 (1977).
- Delbart, C. - Evolution des glycosphingolipides chez *Petunia hybrida*, espèce auto-incompatible, après pollinisation. Thèse Doctorat 3ème cycle. Lille.
- Delbart, C., H.F. Linskens, B. Bris, Y. Moschetto and D. Coustaut - Analysis of glycosphingolipids of *Petunia hybrida*, a self incompatible species. I. Composition in fatty acids and in long chained bases of pollen and unpollinated style. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C* 83, 229-239 1980.

- Dessel, G. van, A. Lagrou, H.J. Hilderson, W. Dierick and G. Dacremont - Quantitative determination of the neutral glycosyl-ceramides in bovine thyroid gland. *Biochimie* 59, 339-348 (1977).
- Folch, J., M. Lees, S. Sloane and O.H. Stanley - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509 (1957).
- Karlsson, K.A. - On the chemistry and occurrence of sphingolipid long-chained bases. *Chem. Phys. Lipids* 5, 6-43 (1970).
- Karlsson, K.A. - Sphingolipid long bases. *Lipids* 5, 878-891 (1971).
- Karlsson, K.A. and E. Martensson - Studies on sphingosines. XIV: On the phytosphingosine content of the major human kidney glycolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 152, 230-233 (1968).
- Karlsson, K.A., B.E. Samuelsson and G.O. Seen - Sphingolipid composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. *Biochim. Biophys. Acta* 316, 317-335 (1973).
- Kates, M. - In: "Techniques in lipidology isolation, analysis and identification of lipids". T.S. Work, E. Work eds. North Holland American Elsevier, Amsterdam (1972).
- Linskens, H.F. - Fertilization in higher plants. North Holland American Elsevier, Amsterdam (1974).
- Nettancourt D. De - "Incompatibility in Angiosperms". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1977).
- Slomiany, B.L. and M.I. Horowitz - The glycolipids of bovine serum. *Biochim. Biophys. Acta* 218, 278-287 (1970).
- Sugita, M., O. Itasaka and T. Hori - Branched long-chained bases from the bivalve *Corbicula sandai*. *Chem. Phys. Lipids* 16 1-8 (1976).
- Uemura, K., A. Hara and T. Taketomi - Chemical and hemolytic properties of sphingolipids modified by ozonolysis and reduction. *J. Biochem.* 79, 1253-1262 (1976).

PUBLICATION V

GLYCOLIPID METABOLISM : ITS CHARACTERISTICS
IN INCOMPATIBILITY REACTION

C. DELBART, B. BRIS, D. COUSTAUT
Laboratoire de Biologie cellulaire
Faculté de Pharmacie
rue du Professeur Laguesse, 59045 LILLE Cedex

Received January, 1982.

INTRODUCTION

Glycosphingolipids (GSL) are ubiquitous membrane components. It is generally assumed that their ceramide moiety is present in the outer leaflet of the membrane bilayer, and that their carbohydrate moiety may extrude towards the outer environment. Subsequently this organization in the membrane confers, 2 possible roles to GSL :

a) GSL contribute to structural rigidity or fluidity of membrane. For example ceramides confer greater structural rigidity than glycerides.

b) GSL are well suited to interact with exogenous ligands through their carbohydrates. They can be interactants for a large number of specific signals, and serve as specific antigens on cell surface (1-2). Dramatic changes in GSL composition are associated with cell growth-control, cellular interaction and differentiation. GSL can interact with various factors such as bacterial toxins, interferon or hormones.

Since gametophytic incompatibility of fecundation provides evidence for cell recognition, it is of interest to consider the eventual relationships between pollination and membrane architecture.

Our previous studies on Petunia hybrida and Oenothera missouriensis (3-5) assumed that a close relation exists between GSL metabolism and pollination. In fact 2 general types of changes were recorded in both flowers :

a) deletion of GSL,

b) synthesis of new glycolipids due to activation of normally unexpressed enzymes.

These results suggest that incompatibility reaction is based on a

highly specific recognition process in which GSL could be involved.

Fatty acids composition of complex GSL of Petunia have been elucidated (6) (7). Our purpose is to compare our data on Oenothera and Petunia and to determine if a general behavior of hydrophobic part can be related with incompatibility reaction.

MATERIEL AND METHODS

1) Materiel

The present analysis was performed on Petunia hybrida and Oenothera missouriensis. The employed clones were for Petunia : W166K ($S_1.S_2$ alleles) and T₂U ($S_3.S_3$) and for Oenothera : S₁ ($S_1.S_1$) and Bg ($S_2.S_4$).

Our present study was conducted on pollen, unpollinated pistils and on cross or selfpollinated pistils (24 hours : Petunia, 15 hours : Oenothera).

2) Methods

The employed methods have been extensively described elsewhere (6) (7). Total lipids are extracted, submitted to mild alkaline hydrolysis. GSL are purified, fatty acids composition of Ceramides (Cer) and monoglycosylceramides (MGCer) was established by GLC.

RESULTS : FATTY ACID (FA) COMPOSITION

We report fatty acid composition of Cer and MGCer (tables 1 and 2). There is no link between S alleles carried by Petunia or Oenothera. Our purpose is only to correlate FA composition with flower parts and with incompatibility reaction..

A - Ceramide

a) Comparison between pollen and unpollinated pistils

Fatty acid compositions are very similar in Oenothera and Petunia unpollinated pistils. Almost one half of the total fatty acid content is represented by C16 : 0, C18 : 0 and C18 : 1. C15 : 0 and C15 : 1 seem to be also characteristic of pistils.

On the other hand, no common features can be drawn between pollen of both flowers. Major fatty acids are respectively C18 : 3 and C20 : 0 in

Oenothera, and C20 : 1, C22 : 0 in Petunia. Pollen also display big heterogeneity in their unsaturation degree which can fluctuate from 30 to 70%.

In general, pistils are mainly characterized by short fatty acids (C14 to C18), while pollen possess high amounts of fatty acids with long aliphatic chain (C18 - C22).

b) Contribution of selfpollination

Surprisingly the evolution of fatty acid composition between unpollinated pistils for both flowers is exactly the same, with only two slight exceptions recorded for C18 : 0 and C22 : 0. Selfpollination induces the same distortions in GSL metabolism. Some general features can be noted : such as enhancement of short fatty acids (C14 - C17) and remarkable decrease in fatty acids with longer aliphatic chain. Radical decrease in unsaturation degree is also characteristic of selfpollination.

c) Contribution of crosspollination

Crosspollination also modifies GSL metabolism. In Petunia, compatible and incompatible matings affect differently the C16 : 0, C18 : 0, C18 : 1 and C20 : 0 fatty acids. In Oenothera they are illustrated by the evolution of C14 : 0, C15 : 0, C18 : 1, C18 : 2 and C20 : 0 content. No easy common features can be drawn, when comparing the responses induced by Oenothera and Petunia. The common enhancement of the C18 : 0 and C20 : 0 content seems to be exception. These divergences were predictable and could be the expression of each genus in compatible pollination.

B - Monoglycosylceramide

a) Comparison between pollen and unpollinated pistils

Fatty acid composition in unpollinated pistils of Oenothera and Petunia are very similar. Moreover same general features, as encountered in Cer, fit MGCer results. Unpollinated pistils are rich in C16 : 0, C16 : 1, C18 : 0 and C18 : 1.

Pollen characters are different. Major FA are respectively C18 : 3 in Oenothera and C22 : 0 in Petunia. Pollen displays also a remarkable heterogeneity in their unsaturation degree which fluctuates from 30 to 70%.

As for Ceramides, pistils are mainly characterized by C14 to 18 FA

while pollen is richer in fatty acids with long and polyunsaturated aliphatic chain.

b) Contribution of selfpollination

Selfpollination induces a marked decrease in FA ranging from C14 to C18 : 0 for both genus. Some distortions are registered with polyunsaturated and long fatty acids which are, for the most part, enhanced by selfpollination.

c) Contribution of crosspollination

A remarkable opposition is registered between Petunia and Genothera, as far as C14 to C17 FA are concerned. On the other hand, unsaturated fatty acids are generally speaking highly increased by crosspollination.

CONCLUSION

Since the introduction of SINGER and NICOLSON'S membrane model, based on lateral and transversal heterogeneity of the lipid bilayer, it is interesting to study the ceramide part of GSL. Lipids, including GSL are characterized by lateral and transversal transition movements. This dynamic state is important in the expression of activities of membrane bound enzymes which are affected by lipidic microenvironment and by its fluidity : for example activity of Na^+/K^+ -ATPase providing for ion translocation depends on the fluidity character of membranes(8).

It is well established that high amounts of glycosylceramides enhance rigidity of membranes(9). The variations with pollination in Cer-MGcer amounts, could induce changes in membrane fluidity and consequently in activities of bound enzymes.

Moreover changes in fatty acid composition alter the lipidic bilayer. Membrane fluidity is enhanced with increased unsaturated fatty acid content (3). As it was observed, selfpollination induces general distortions in fatty acid evolution in both genus. Modifications of saturation degree, and chain length of fatty acids could influence fluidity character of membrane and could alter enzymatic activities necessary for the success of pollination.

ACKNOWLEDGEMENT

We are thank ful to Mrs. I. DEVED for her technical assistance.

TABLE 1 : FATTY ACIDS COMPOSITION OF CERAMIDES

	PETUNIA HYBRIDA					GENOTHERA MISSOURIENSIS				
	Pollen W166K S1.S2	Pollen T2U S3.S3	Styles W166K S1.S2	S1.S2xS1.S2 24 h	S1.S2xS3.S3 24 h	Pollen S1 S1.S1	Pollen Sg S2.S4	Styles S1 S1.S1	S1.S1xS1.S1 15 h	S1.S1xS2.S4 15 h
C14 : C	0,51	1,12	1,05	2,27	2,03	1,13	1,04	2,30	3,39	2,17
C15 : C	0,98	0,47	4,33	1,43	1,94	1,25	0,82	2,94	1,75	3,66
C16 : C	11,48	14,23	22,23	26,30	14,20	10,85	14,08	26,78	34,96	37,04
C16 : I	2,38	2,06	4,70	3,13	3,76	3,83	3,00	6,98	6,26	4,53
C17 : C	0,80	1,04	0,34	1,65	2,60	1,06	0,58	1,82	2,45	2,49
C18 : C	9,89	11,43	11,53	9,95	13,40	6,25	6,33	11,89	18,09	17,80
C18 : I	17,96	19,42	24,46	18,78	24,93	12,19	11,20	22,30	22,23	14,41
C18 : 2	2,37	3,51	10,65	4,85	5,64	5,18	6,17	4,13	2,84	5,10
C18 : 3	0,94	2,41	4,77	1,67	2,60	47,47	45,91	3,06	1,38	5,75
C20 : C	1,47	2,15	1,80	1,75	2,53	7,24	7,80	2,97	2,45	3,98
C20 : I	6,24	4,19	1,24	1,62	1,62	2,29	0,26	0,94	1,08	1,84
C22 : C	44,47	37,95	12,47	26,59	24,74	2,04	2,80	13,67	2,11	1,22
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
unsaturated fatty acids	30,39	31,59	45,82	30,05	38,35	69,96	66,54	37,61	34,79	31,63

TABLE 2 : FATTY ACIDS COMPOSITION OF MONOGLYCOSYLCERAMIDES

	PETUNIA HYBRIDA					GENOTHERA MISSOURIENSIS				
	Pollen W166K S1.S2	Pollen T2U S3.S3	Styles W166K S1.S2	S1.S2xS1.S2 24 h	S1.S2xS3.S3 24 h	Pollen S1 S1.S1	Pollen Sg S2.S4	Styles S1 S1.S1	S1.S1xS1.S1 15 h	S1.S1xS2.S4 15 h
C14 : C	0,56	1,59	2,88	1,75	0,41	0,31	1,10	2,34	1,32	2,63
C15 : C	0,77	0,96	1,60	0,48	0,33	0,10	0,95	2,32	2,21	2,67
C16 : C	25,40	22,95	25,59	13,93	20,93	19,33	22,01	29,59	33,61	32,92
C16 : I	2,25	3,61	14,10	3,28	2,41	2,31	1,05	5,14	5,00	8,39
C17 : C	1,50	1,14	1,06	1,49	0,95	0,51	0,99	2,08	2,58	2,30
C18 : C	18,81	13,19	14,54	12,36	14,50	5,46	4,77	33,59	22,99	18,74
C18 : I	18,90	18,62	18,07	18,57	27,49	6,45	7,25	3,70	18,22	17,00
C18 : 3	2,29	3,07	3,14	2,77	4,53	4,42	1,44	2,23	4,46	12,74
C20 : C	0,91	1,05	0,78	1,14	2,63	57,89	56,17	0,64	5,50	1,58
C20 : I	1,75	0,92	0,94	1,19	3,96	2,24	3,21	2,52	1,21	-
C22 : C	2,54	2,52	12,49	3,26	7,97	0,58	-	0,66	0,36	1,02
TOTAL	24,28	30,37	14,80	41,75	13,88	0,39	1,05	4,68	2,33	-
TOTAL	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99
unsaturated fatty acids	26,92	28,87	38,58	27,02	45,03	71,65	65,91	22,37	33,74	40,73



REFERENCES

- (1) KARLSSON, K.A., 1977. - Aspects on structure and function of sphingolipids in cell surface membrane. In "Structure of Biological membrane". S. ABRAHAMSON, I. PASCHER eds. Plenum Press, New York, London, p. 245-274.
- (2) HAKOHORI, S.-I., 1981. - Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. Annu. Rev. Biochem., 50, p. 733-764.
- (3) BRIS, B., DELBART, C., 1978. - The glycosphingolipids of the pollen and the style in Oenothera missouriensis, selfincompatible species. Incompatibility Newsletter, 9, p. 74-77.
- (4) COUSTAUT, D., LINSKENS, H.F., MOSCHETTO, Y. et DELBART, C., 1978. - Quelques aspects du métabolisme des glycosphingolipides des styles et du pollen chez Petunia hybrida, espèce auto-incompatible. Soc. Bot. Fr. Actualités botaniques, 1-2, p. 69-77.
- (5) BRIS, B., DELBART, C., COUSTAUT, D. et LINDER, R., 1981. - Changes in glycosphingolipids during pollination in Oenothera missouriensis. Phytochem., 20, p. 1255-1258.
- (6) DELBART, C., LINSKENS, H.F., BRIS, B., MOSCHETTO, Y. et COUSTAUT, D., 1980. - Analysis of glycosphingolipids of Petunia hybrida a self incompatible species. I. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C., 83, p. 229-239.
- (7) DELBART, C., BRIS, B., LINSKENS, H.F., LINDER, R. et COUSTAUT, D., 1980. - Analysis of glycosphingolipids of Petunia hybrida a self incompatible species. II. Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C., 83, p. 241-254.
- (8) BOLDYREV, A.A., 1981. - Role of lipids in the functioning of Na, K-ATPase. Studia Biophysica, 84, 153-160.
- (9) CRITCHLEY, D.R., VICKER, M.G., 1977. - Glycolipids as membrane receptors important in growth regulation and cell-cell interactions. In Dynamic aspects of cell surface organization! Cell surface reviews, 3, p. 306-342.

PUBLICATION VI

(Na^+ + K^+)ATPASE IN *OENOTHERA MISSOURIENSIS* POSSIBLE CONNECTION WITH SELF-INCOMPATIBILITY

(C. DELBART, B. HOFACK, H.F. LENSSENS, D. COUSTAUT)

INTRODUCTION

Through the work of WEISENSEEL and JAFFE (15) it is known that in pollen tube, movements of Na^+ and K^+ are particularly intense. In general the membranes in which considerable Na^+ and K^+ transport occurs are particularly rich in Na^+ - K^+ dependent ATPase (EC 3,6,1,3). This enzyme is an integral plasma membrane protein which transports sodium and potassium ions (1). Under physiological conditions it hydrolyzes ATP to achieve the coupled transport of Na^+ outward and K^+ inward against concentration gradients.

The growing pollen tube consists in a single cell that extends into the female reproductive tissues by tip growth, forming a structure that may be millimetres long (12). The major growth current though some pollen tubes enters as K^+ and leaves as H^+ (15). This suggests that an active pump is involved, although the molecular mechanism responsible for these changing fluxes remain unclear.

In an attempt to define further the mechanisms involved in these changing fluxes, we investigated the (Na^+ + K^+)ATPase activity in stigmas and styles which underwent cross and self pollination.

RESULTS

Our present study was conducted on unpollinated pistils of *Oenothera missouriensis* derived from two genetic clones corresponding to the S incompatibility alleles S_1 (S_1S_1) and S_2 (S_2S_4). We also examined pistils which underwent compatible cross-pollination (S_1S_1 x S_2S_4 and S_2S_4 x S_1S_1) and incompatible self-pollination (S_1S_1 x S_1S_1 and S_2S_4 x S_2S_4).

TABLE 1

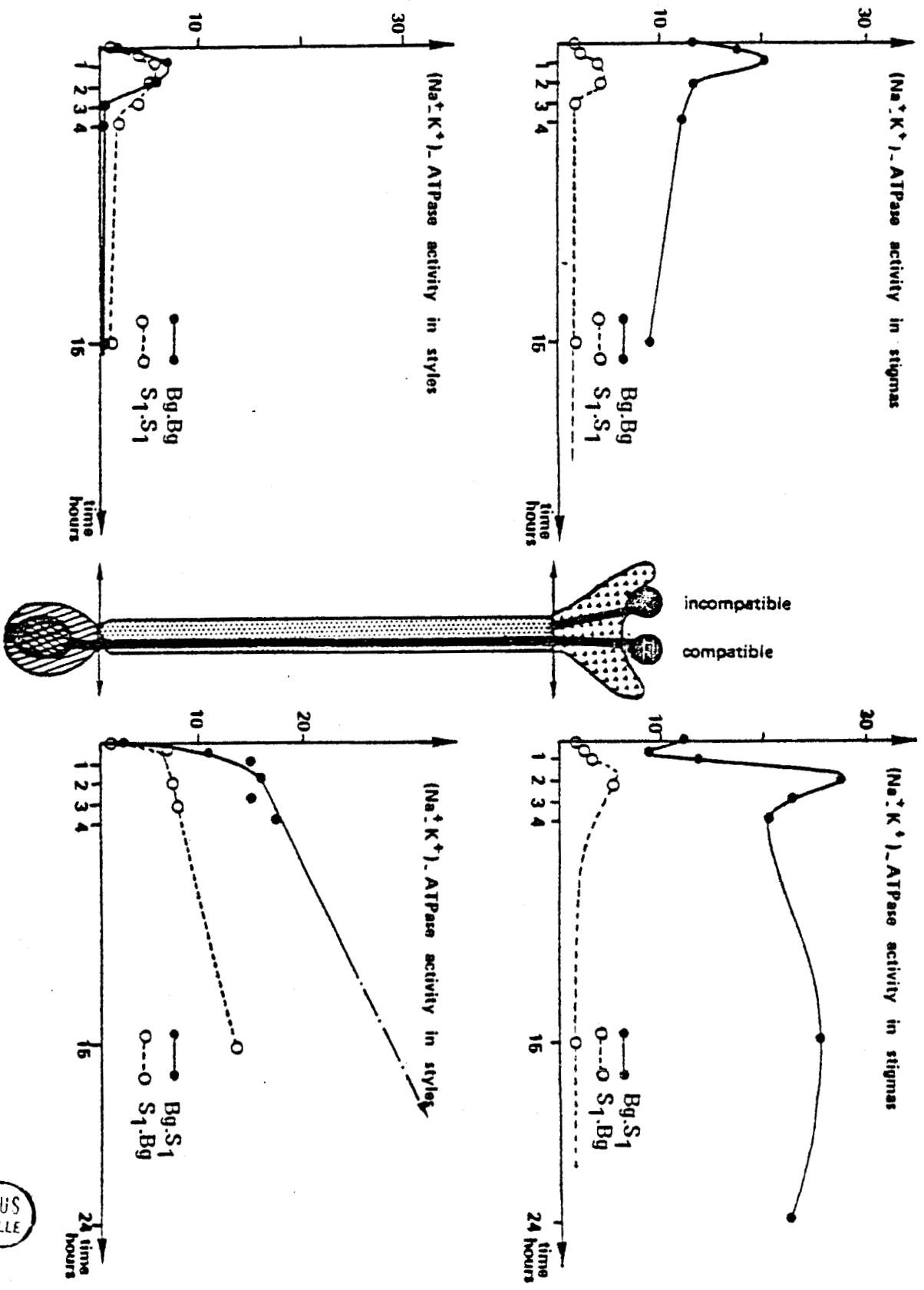
Na⁺ + K⁺ ATPase ACTIVITIES IN PISTILS OF OENOTHERA MISSOURIENSIS

	Duration of pollination	Clone : B _g		Clone : S ₁	
		Styles	Stigmas	Styles	Stigmas
unpollinated	0 h	1,92	12,66	1,33	1,89
Self pollinated Incompatible	30 min.	0	17,24	4,00	2,37
	1 h	6,85	20,10	5,24	3,79
	2 h	5,20	12,99	4,88	3,91
	3 h	0	21,53	4,00	1,89
	4 h	0	12,30	1,78	-
	15 h	0	9,43	0,89	2,01
	24 h			1,60	2,01
Gross pollinated Compatible	30 min.	10,88	8,44	7,10	2,37
	1 h	15,63	13,52	-	3,20
	2 h	16,35	27,88	7,37	5,33
	3 h	15,15	22,81	7,64	-
	4 h	17,52	20,91	-	-
	15 h	41,20	25,89	13,94	2,37
	24 h	-	22,81	9,77	2,37

1 Unité = 1µg Pi liberated in 5 min. per 100 mg fresh tissue.



FIGURE 2 : EVOLUTION OF THE $(Na^+ - K^+)$ ATPASE ACTIVITIES WITH POLLINATION



Our study was divided in two parts : the characterization of the kinetic parameters of the enzyme and study of the evolution of the (Na⁺-K⁺) ATPase activity after a self or cross-matin.

Our results obtained for stigmas and styles are listed tableau 1 and figure 2.

The different parts of the unpollinated pistil do not exhibit the same Na⁺-K⁺ ATPase activities, which are always higher in stigmas.

- Contribution of cross pollination

The ATPase activities are exhausted after a compatible mating. The evolution of those enzymatic activities in relation with the duration of pollination is different in stigmas and styles and mainly reflect physiological functions. In stigmas, the ATPase activities rise to a maximum in the first 2 hours, and then after a short decrease, are maintained at relatively high values. In styles the ATPase activities are more pronounced all along the a investigated period.

- Contribution of self pollination

The ATPases activities are also enhanced after an incompatible mating, but to a lesser extent. In the stigmas, enzymatic activities rise to a maximum in 1 hour, and then slowly return to its first value (0 hour). In style also, after a very small activation (2 hours) the enzyme possesses its lowest activity.

INTERPRETATION

- (Na⁺ + K⁺)ATPase and pollen tube growth control

As (Na⁺ + K⁺) ATPases are correlated with ionic transport, this rise the question of the biological signification of a perturbed ionic transport during pollination.

As the pollen tube enters the tissues of the pistil, it has to ensure metabolic cooperations to assess its growth. All its growth is supported by ionic activation of metabolic pathways. More over WEISENSEEL and al. (15) postulate that the pollen tube has to eliminate protons which accumulate. The result may be the activation of a K⁺/H⁺ pump. That means also, that pollinic ATPases are highly active.

Our results show a striking correlation between pollen tube elongation and the active $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ transport. Indeed after a compatible mating, when the pollen tube tips are still in the stigmatic tissues, the ouabain-sensitive ATPase activity rises to a maximum, then, as the pollen tube extends towards stylar tissues, it regresses while ATPase levels in styles are enhanced.

After a self pollination, the pollen tube grows through the stigmas, but a rejection reaction occurs as soon as it reaches the styles. In this case ATPases are active during a short time.

- Fatty acids composition and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase activity

Alterations of the activity of membrane embedded enzymes result from changes in the fatty acid composition (see for review KIMMELBERG (10), FARIAS and al. (8)). In recent years there is increasing evidence that fatty acids may serve as modulators of membrane functions (SCHEMALZING and al. (13)). The insertion of increasing amounts of unsaturated fatty acids into membranes modulates ATPases activities in a biphasic manner. The number and the position of double bonds, their configuration, and the chain length of the fatty acids proved to be critical for this modulation. Fatty acids with one, or the first of several bonds in position 9 (oleic, linoleic, linolenic acids), can regulate the ATPase activities though :

- a viscotropic regulation. Unsaturated fatty acids may fluidize plasma membrane.

- an electrostatic effects. Free fatty acids increase the density of negative surface charges of cell membranes which may act as regulators of membrane-bound enzymes (AHRENS (2), WOJTECZAK and al (16)).

For instance, oleic acid (C18 : 1) highly activates ATPase activities.

In a compatible mating, the enhancement of membrane fluidity and the optimal incorporation of oleic and linoleic acids in membrane lipids (DELBART (4, 5, 6)) led to a maximal stimulation of ATPase.

After self pollination, the reduction of the previous parameters (membrane fluidity and presence of oleic and linoleic acids (DELBART (4, 5, 6)) led to a decrease, or to an inhibition of enzyme activity.

- (Na⁺ + K⁺) ATPases and lipids turn over

More over, when the influx of K⁺ is lowered, the submaximal ATPases activities were found to increase phospholipids and sulfolipids incorporation in plasma membrane (STUIVER and al. (14)).

The significant decrease in ATPase activities after self mating is in accordance with our previous results in sulfolipids (DELBART (7)). It has been shown that after 15 hours of self pollination there is a pronounced accumulation of sulfolipids.

The evolution of ATPase activities reported here lead to the conclusion that the pollen tube growth control can be achieved through ionic permeability.

The progressively increased fluidity of membranes, the presence of fatty acids that are modulators of ATPases and the (Na⁺ + K⁺) ATPase activity are all in accordance. Taken together, these results give evidence that the pollen tube growth control is achieved through ionic permeability modulation according to PICTON (12) or WEISENSEEL (15).

MATERIALS AND METHODS

1) Tissue source

The present analysis was performed with Oenothera missouriensis Sim. (a self incompatible species) grown in the Botanical Garden, Strasbourg - Lille, France. The different clones have been characterized and isolated by LINDER (11). They were grown in identical environmental conditions to avoid modifications of incompatibility responses. The clones of Oenothera missouriensis used were S₁ (S₁.S₁ alleles) and E_g (S₂.S₄ alleles). When flowering, the floral buds were harvested and the flowers underwent compatible (S₁xE_g and E_gxS₁) or incompatible (S₁xS₁ and E_gxE_g) pollination. The assessment of pollen tubes within styles was performed by cytolocalization of callose plug after staining with anillin blue (9). The duration of pollination was 30 min., 1, 2, 3, 4, 15 and 24 hours. Stigmas and styles are collected separately for further ATPase assay.

2) Enzyme suspension

Stigmas and styles of Oenothera were homogenized in cold medium of pH 7 and final concentration 0,1 M tris, 0,1 M NaCl, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA.

3) Standard Na⁺-K⁺ ATPase assay

The ATPase activity was measured by means of a colorimetric determination of the released inorganic phosphate, by the method of BONTING and al. (3). The enzyme suspension (250 μ l) was added to the reaction mixture to yield a final volume of 0,5 ml and final concentrations of 60 mM NaCl, 30 mM KCl, 10 mM ATP, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 100 mM tris-HCl buffer pH 7,0. Control tubes for ouabain insensitive activity contained 2 mM ouabain in addition to the above components. The reaction was carried out at 30°C for 5 min., stopped by adding trichloroacetic acid (10%). After centrifugation (20 min., 4000 r.p.m.) the released Pi was determined in the supernatant.

4) Inorganic phosphate assay

0,4 ml color reagent containing 4% ferrous sulfate freshly dissolved in 1% ammonium molybdate in 1,15 N sulfuric acid was added directly to 0,4 ml of the previous reaction mixture. Color was allowed to develop for 10 min. at room temperature and optical density read à 700 nm. Specific activity is reported as units which represents μ g of Pi released per 5 min per 100 mg of fresh tissue.

5) Characterization of Na⁺ + K⁺ ATPase in pistils

A variety of kinectic parameters were determined on stigmatic and stylar preparations, to allow a preliminary characterization. The optimum ratio of Na⁺ to K⁺ was determined by varying their concentrations. The effect of K⁺ on the Na⁺ dependence of ouabain sensitive ATP hydrolysis was examined at six K⁺ levels in the range of 0-30 mM and at four Na⁺ levels in the range of 0-133 mM. Maximal activities was achieved with 60 mM NaCl, 30 mM KCl.

The concentration dependence of inhibition by ouabain was examined. The inhibitory effect was nearly optimal in presence of 2 mM ouabain.

The analysis of Mg²⁺ dependency of (Na⁺ + K⁺)ATPase in the presence of 10 mM ATP revealed that the stimulation effect was much more distinct at 2 mM MgCl₂.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALBERS, R.W. - In "The enzymes of Biological membranes". A. MARTONISI ed., Plenum Press, New York, 1976, 3, 283.
- (2) AERENS, M.L. - Biochim. Biophys. Acta, 1981, 642, 252.
- (3) BONTING, S.L., SIMON, K.A. and N.M. HAWKINS. - Arch. Biochem. Biophys., 1961, 95, 416.
- (4) DELBART, C., ERIS, B., LINSKENS, H.F., LINDER, R. and D. COUSTAUT. - Proc. Kon. Ned. Akad Wet C, 1980, 83, 241
- (5) DELBART, C., ERIS, B., LINSKENS, H.F. and D. COUSTAUT. - Proc. Kon. Ned. Akad Wet C, 1980, 83, 255.
- (6) DELBART, C., ERIS, B. and D. COUSTAUT. - Incomp. Newsletter, 1982, 14, 29.
- (7) DELBART, C., ERIS, B., NOUVELOT, A. and D. COUSTAUT. - Phytochem. 1982, 22, 322.
- (8) FARIAS, R.N., BLOJ, B., MORERO, R.D., SIVERIZ, F. and TRUCCO, R.E. - Biochim. Biophys. Acta, 1975, 415, 231.
- (9) KHO, Y.O. and J. BAER. - Euphytica, 1968, 17, 298.
- (10) KIMELBERG, H.K. - "In Cell surface reviews", vol. 3. Dynamic aspects of cell surface organization. G. POSTE, NICOLSON, G.L. eds., pp. 205. Elsevier, North Holland Biomedical Amsterdam.
- (11) LINDER, R. - Année biol., 1954, 30, 501.
- (12) PICTON, J.M. and M.W. STERR. - J. theor. Biol., 1982, 98, 15
- (13) SCHMALZING, G. and P. KUTSCHERA. - J. membrane biol., 1982, 69, 65.
- (14) STUIVER, C.E.E., KUIPER, P.J.C., MARSCENER, H. and A. KYLIN. - Physiol. Plant, 1981, 52, 77.
- (15) WEISENSEEL, M.H. and L.H. JAFFE. - Planta, 1976, 133, 1.
- (16) WOJYCZAK, L. and M. NALECZ. - Eur. J. Biochem., 1979, 94, 99.

APPENDICE TECHNIQUE

SOMMAIRE DES FICHES

	Page
1 : Matériel utilisé.....	T1
2 : Extraction des lipides totaux pour l'étude des glycosphingolipides.....	T3
3 : Couplage des diverses techniques et protocole de purification des glycosphingolipides.....	T5
4 : Hydrolyse alcaline douce. Obtention des glycosphingolipides.....	T6
5 : Chromatographie sur couche mince des glycosphingolipides neutres.....	T8
6 : Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique. Purification des glycosphingolipides.....	T11
7 : Chromatographie d'échange ionique sur colonne de DEAE cellulose. Fractionnement des GSL neutres et acides.....	T13
8 : Chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique.....	T16
9 : Purification des glycosphingolipides par chromatographie sur couche mince.....	T19
10 : Dosage fluorimétrique des glycosphingolipides.....	T21
11 : Hydrolyse acide des glycosphingolipides.....	T24
12 : Préparation des esters méthyliques d'acides gras.....	T25
13 : Etude de la composition en acides gras par chromatographie gaz-liquide.....	T27

14	: Identification des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	T33
15	: Etude de la composition en bases à longue chaîne (BLC) des glycosphingolipides.....	T39
16	: Etude de la composition en oses des glycolipides.....	T50
17	: Dosage de l'activité des (Na ⁺ - K ⁺)ATPases (EC 3, 6, 1, 3).....	T52
18	: Extraction de glycolipides acides complexes.....	T54
19	: Analyse par chromatographie en couche mince de l'extrait brut de glycolipides acides complexes.....	T55
20	: Essais de purification des GSL acides complexes.....	T59
21	: Caractérisation des acides sialiques.....	T60
22	: Dosage par la méthode de WARREN.....	T63
23	: Analyse en spectrométrie de masse des GSL acides complexes.....	T66
24	: Extraction des phospholipides.....	T68
25	: Dosage des phospholipides.....	T70
26	: Dosage des glycérides.....	T72
27	: Détermination du rapport lécithine/sphingomyéline.....	T75
	BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE :.....	T78

FICHE 1 : MATERIEL UTILISE

A - PETUNIA HYBRIDA

Les clones W 166 K (S_1S_2) et T_2U (S_3S_3) de Petunia hybrida proviennent des serres de l'Université de Nimègue où ils sont maintenus et multipliés par le Professeur H.F. LINSKENS.

Dans le tableau ci-dessous sont consignés les clones et les génotypes correspondants ainsi que les différentes pollinisations qui seront analysées.

Clônes	Génotypes	Pollinisation	
		compatibles	incompatibles
W166K	S_1S_2	1) W166K. T_2U (S_1S_2). (S_3S_3)	1) W166K. W166K (S_1S_2). (S_1S_2)
T_2U	S_3S_3	2) T_2U . W166K (S_3S_3). (S_1S_2)	2) T_2U . T_2U (S_3S_3). (S_3S_3)

B - OENOTHERA MISSOURIENSIS

Les clones Bg (S_2S_4) et S_1 (S_1S_1) d'Oenothera missouriensis proviennent des serres de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, où ils sont maintenus et multipliés par Monsieur B. BRIS.

Dans le tableau ci-dessous sont également consignées les différentes pollinisations analysées.

Clônes	Génotypes	Pollinisations	
		compatibles	incompatibles
Bg	S_2S_4	Bg. S_1 $(S_2S_4).(S_1S_1)$	Bg.Bg $(S_2S_4).(S_2S_4)$
S_1	S_1S_1	S_1 .Bg $(S_1S_1).(S_2S_4)$	S_1S_1 $(S_1S_1).(S_1S_1)$

FICHE 2 : EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX POUR L'ETUDE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

d'après FOLCH, J. et coll. - J. Biol. Chem., 1957, 228, 497-509 (T7)
modifiée KARLSSON, K.A. et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316,
317-335 (T15)

INTRODUCTION

Selon la technique préconisée par FOLCH (T6, T7) les organes sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme-méthanol (2/1 - v/v). Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau et agitation, on obtient un déphasage avec passage dans la phase hydro-alcoolique supérieure des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux.

Cependant, ce procédé d'extraction des lipides totaux est un facteur limitant dans l'étude des glycosphingolipides (GSL).

Il faut, semble-t-il, attribuer aux extractions incomplètes les discordances entre les résultats concernant la composition en GSL du rein (KARLSSON, T15), les conditions trop douces d'extractions, décrites par CARTER et coll., T4) ne conduiraient pas à une libération quantitative de l'ensemble des GSL. Les phytosphingolipides sont particulièrement difficiles à extraire et ne le sont que lors des dernières homogénéisations.

Les différentes techniques d'extraction proposées dérivent de celles de FOLCH (T6, T7).

En effet, le meilleur agent d'extraction (SCHMID, T29) reste le mélange CHCl_3 - CH_3OH) dans les proportions 2/1 (v/v). Seules les conditions de température varient.

Afin d'obtenir une extraction complète des GSL, nous avons donc procédé de la manière suivante.

MATERIEL ET METHODE

1) REACTIFS

- solvant d'extraction I : chloroforme-méthanol (2/1 - v/v),
- solvant d'extraction II : chloroforme-méthanol (1/1 - v/v),
- solution NaCl à 9 g/l,
- solution de lavage :

. chloroforme.....	3 volumes
. méthanol.....	47 volumes
. NaCl 9 g/l.....	48 volumes

2) EXTRACTION

Le matériel (20 g de styles ou 1 g de pollen) provenant des divers clônes et croisements est homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur Waring Blendor dans le solvant d'extraction I, à raison de 20 ml de solvant par gramme de tissu, pendant 20 minutes.

Après 2 heures de contact à la température du laboratoire, l'extrait est filtré et le résidu est homogénéisé à 4 reprises à l'aide d'un appareil de Potter, dans le solvant d'extraction I, à raison de 10 ml de solvant par gramme de tissu. Après filtration, le résidu sec est chauffé à reflux pendant 1 heure dans le solvant II.

Les divers surnageants organiques sont réunis et soumis à un partage selon la technique de FOLCH par addition de 1 volume d'une solution de NaCl à 9g/l pour 5 volumes de solvant. Après déphasage, une nuit à +4°C, et élimination de la phase supérieure, la phase inférieure chloroformique est lavée par la solution $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-NaCl 9 g/l}$ (3/47/48 - v/v/v).

La phase inférieure contenant les lipides totaux est évaporée à sec.

Les lipides sont ensuite repris dans un petit volume de solvant I et conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

Deux extractions ont été réalisées pour chaque type de tissu en fonction du génotype et de la pollinisation incompatible et compatible.

FICHE 3 : COUPLAGE DES DIVERSES TECHNIQUES ET PROTOCOLE DE PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

KARLSSON, K.A. et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316,
317-335 (T17)

Afin d'obtenir chaque classe de glycosphingolipides, c'est-à-dire Cer (*), MGCer (*), DGGer (*), TGGer (*) et TrGGer (*), nous avons suivi le protocole préconisé par KARLSSON (T17) qui correspond aux séquences suivantes :

- extraction des lipides totaux (fiche 2),
- hydrolyse des lipides totaux et obtention des GSL totaux (fiche 4),
- purification des GSL totaux par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique (fiches 6 et 8),
- fractionnement des GSL totaux en GSL neutres et acides (fiche 7),
- fractionnement des GSL neutres en Cer, MGCer, DGGer, TGGer et TrGGer (fiche 8),
- purification des Cer, MGCer, DGGer, TGGer et TrGGer par chromatographie préparative sur couche mince (fiche 9).

(*) Abréviations :

Cer : Céramide
MGCer : Monoglycosylcéramide
DGGer : Diglycosylcéramide
TGGer : Triglycosylcéramide
TrGGer : Tétraglycosylcéramide

FICHE 4 : HYDROLYSE ALCALINE DOUCE. OBTENTION DES GLYCO-SPHINGOLIPIDES

KARLSSON, K.A. et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335
(T17)

INTRODUCTION

Les GSL constituent une classe de lipides alcali-résistants. Les glycérophosphatides seront détruits par une saponification.

Le protocole opératoire comporte :

- une étape d'hydrolyse alcaline,
- l'arrêt de cette hydrolyse par neutralisation de l'agent alcalin et acidification du milieu jusqu'à un pH compris entre 2 et 5,
- extraction des GSL par partage et élimination simultanée des molécules et sels hydrosolubles,
- récupération de la phase organique contenant les GSL totaux,

Nous avons utilisé la technique de SCHMIDT modifiée par KARLSSON (T17) qui assure une hydrolyse complète et une oxydation minimale.

MATERIEL ET METHODE

1) REACTIFS

- agent d'hydrolyse : KOH 0,1 M dans du méthanol aqueux ($\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ - 9/1 - v/v),
- HCl 2 M.

2) HYDROLYSE ALCALINE DOUCE

Un gramme de lipides totaux sont repris dans 100 ml d'agent hydrolysant. L'hydrolyse se poursuit en atmosphère d'azote, à l'obscurité sous agitation magnétique et à la température du laboratoire pendant 18 heures.

L'addition de CHCl_3 et d' H_2O jusqu'à des concentrations finales en $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ de 8/4/3 permet le déphasage selon la technique de FOLCH (T7).

Après élimination de la phase supérieure hydro-alcoolique, la phase inférieure contenant les GSL totaux est évaporée à sec. Les GSL sont repris par le mélange solvant $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - 2/1$ (v/v) et conservés à -20°C sous atmosphère d'azote.

Une partie aliquote de la phase supérieure est soumise à une analyse par chromatographie en couche mince afin de vérifier l'absence de GSL dans cette phase.

FICHE 5 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DES GLYCOSPHINGO-LIPIDES NEUTRES

La chromatographie sur couche mince est le moyen le plus aisé pour séparer et identifier un mélange lipidique.

MATERIEL

- Gel de silice H (Merck) à raison de 40 g gel/100 ml d'eau distillée,
- Gel de silice G (Merck) à raison de 50 g gel/100 ml d'eau distillée,
- Etaleur Desaga - plaque de verre 20 cm x 20 cm,
- Epaisseur de la couche de gel : 250 µl-500 µl,
- Application des échantillons à la seringue Hamilton sous courant d'azote afin d'éviter les dénaturations,
- Dépôts : 20 à 80 µl de lipides,
- Cuves de type Desaga (11 x 21 x 21 cm).

SYSTEME SOLVANT

De nombreux systèmes solvants ont été décrits pour assurer la séparation des diverses classes de lipides. Nous avons préféré le mélange suivant :



qui assure la séparation des GSL en fonction du nombre de résidus osidiques présents dans la molécule (ROUSER et coll., T26), KARLSSON et al., (T15)).

DETECTION

1) REACTIFS DE DETECTION GENERALE

a - vapeurs d'iode :

Elles se fixent au niveau des doubles liaisons des acides gras. Les lipides non saturés apparaissent en brun sur fond jaune.

b - Rhodamine 6 G :

Ce réactif est obtenu par dilution extemporanée de 1 volume d'une solution mère de Rhodamine à 50 mg/litre d'eau avec 1 volume de NaOH 4 N.

Après pulvérisation et examen sous lumière ultraviolette des plaques encore humides :

- les phosphatides et lipides acides apparaissent en bleu ou pourpre,
- les lipides neutres et phosphatides neutres en jaune-orange,
- les produits de peroxydation en bleu-gris,
- les pigments de type chlorophyllien et caroténoïde en bleu intense.

Lorsque les plaques sont sèches, les lipides apparaissent en jaune.

2) REACTIFS DE DETECTION DES GSL ET DES GLYCOLIPIDES

a - réactif de révélation des céramides (KARLSSON-PASCHER, T15) :

Par pulvérisation des plaques avec une solution d'acétate cuprique à 3% dans H_3PO_4 à 8% en milieu aqueux.

Après 25 minutes à 200°C, les composés de types céramides apparaissent en brun.

Les composés insaturés apparaissent plus rapidement.

b - réactif à l' α -naphтол révélateur des glycolipides (céramides-sulfolipides et gangliosides) :

Les plaques sont pulvérisées avec une solution d' α -naphтол à 0,5% dans le mélange CH_3OH-H_2O (1/1 - v/v) puis après séchage à l'air libre, avec un mélange acide sulfurique/eau ($H_2SO_4-H_2O$ (95/5 - v/v).

La plaque est ensuite chauffée à 110°C jusqu'à apparition des glycolipides sous forme de taches pourpre-violacé sur fond blanc. Les lipides polaires apparaissent en jaune et le cholestérol en rose gris.

c - réactif à la benzidine spécifique de la liaison amide des GSL :

. Solution I : acide periodique..... 228 mg
eau distillée..... 10 ml

Cette solution est diluée au 1/20 dans l'acétone au moment de l'emploi.

. Solution II : benzidine..... 184 mg
CH₃COOH RP..... 0,4 ml
eau distillée..... 4,4 ml
acétone..... 45 ml

La solution I diluée au 1/20 est pulvérisée sur les plaques ainsi que la solution II 5 minutes après la première.

Les GSL apparaissent en blanc sur fond bleu.

d - réactif à la ninhydrine spécifique des bases libres. Solution révélatrice de :

Ninhydrine..... 0,20 g
dans { butanol..... 95 ml
pyridine..... 5 ml

Après pulvérisation des plaques, les bases à longues chaînes libres apparaissent en rose. Cette coloration est instable.

e - réactif à l'anthrone :

Anthrone..... 0,20 g
H₂SO₄ q.s.p..... 100 g

Après pulvérisation les plaques sont chauffées à 120°C pendant 10 minutes recouvertes d'une plaque de verre, une réaction positive se traduit par l'apparition de taches violacées.

FICHE 6 : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE. PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

KARLSSON, K.A. et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 336-362
(T16)

Les GSL obtenus après hydrolyse alcaline douce sont purifiés par chromatographie sur colonne d'acide silicique équilibrée en CHCl_3 . La charge est de 100 mg de lipides/gramme d'acide silicique et le volume éluant de 10 ml de solvant par gramme d'acide silicique. La vitesse d'élu-tion de 3 ml/mn. L'élu-tion est obtenue par passage successif de :

- CHCl_3 (soit 200 ml),
- CHCl_3 - CH_3OH - 1/3 (v/v) (200 ml),
- CH_3OH (200 ml).

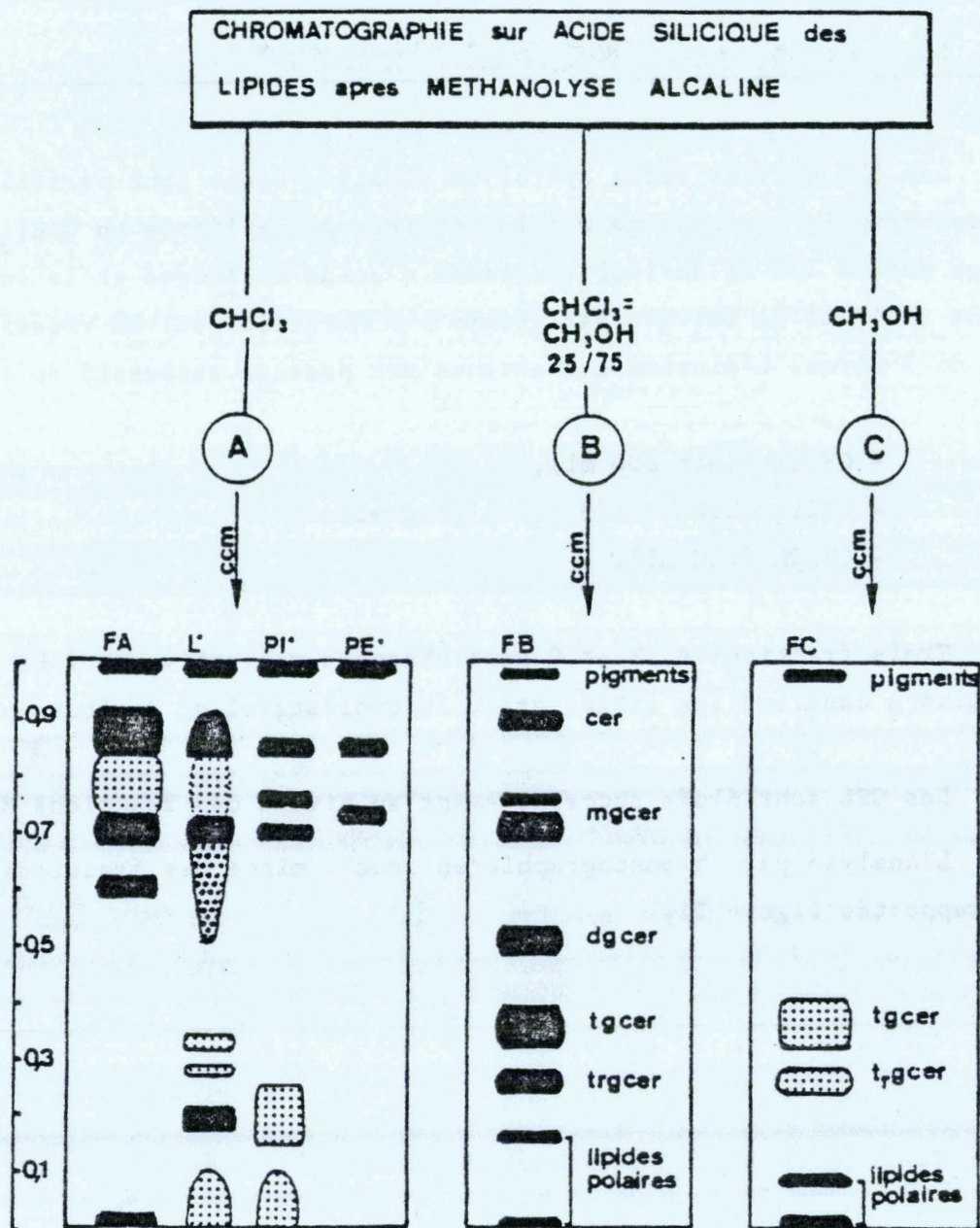
Trois fractions A, B et C sont obtenues respectivement. La première fraction A contient les acides gras, le cholestérol et quelques pigments.

Les GSL sont élués successivement au niveau des fractions B et C.

L'analyse par chromatographie en couche mince des fractions A, B, C est rapportée figure T1.

FIGURE T1

ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES FRACTIONS
A, B ET C SEPARÉES SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE



BUS
LILLE

FICHE 7 : CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE IONIQUE SUR COLONNE DE DEAE CELLULOSE. FRACTIONNEMENT DES GSL NEUTRES ET ACIDES

KARLSSON, K.A. et coll. - Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T17)

ROUSER, G. et coll. - Lipid chromatographic analysis, DEKKER inc N.Y. vol. I, 1967, 99-162 (T27)

INTRODUCTION

La séparation des lipides par chromatographie d'échanges ionique est basée sur l'échange de groupements ioniques. Cependant, des différences de polarité dues à des groupements non ionisés comme les groupes hydroxyl peuvent également intervenir.

Trois grands groupes de lipides sont généralement séparés :

- les lipides non ionisés : neutres,
- les lipides zwitterioniques,
- les lipides acides.

Chacun de ces trois groupes, peut être fractionné en fonction de la différence de polarité et/ou d'acidité.

Deux types de support pour la chromatographie d'échange ionique sont possibles : la DEAE cellulose (= diéthylaminoéthyl-cellulose) et la TEAE cellulose (= triéthylaminoéthyl-cellulose). La première est généralement utilisée pour la séparation des lipides en classes, tandis que la seconde permettra la séparation des lipides ne possédant que des groupements carboxyl comme seuls groupements ionisés (ex. : les acides biliaires et les gangliosides).

MATERIEL ET METHODE

1) PREPARATION DE LA DEAE SELON KARAN-LESTER (T11)

La DEAE cellulose (DE 11 Whatman) de haute capacité d'échange est mise à gonfler dans l'eau distillée. Après deux lavages à l'eau distillée et

élimination des particules trop fines, la DEAE cellulose est mise en contact avec de la soude 5% pendant 30 mn (60 g DEAE - 300 ml de NaOH à 5%), puis elle est lavée par passage d'eau distillée jusqu'à obtention de la neutralité. La DEAE cellulose est ensuite convertie sous forme acétate par un contact de 30 minutes avec $\text{CH}_3\text{-COOH}$ à 10%. L'excès d'acide est éliminé par lavage à l'eau distillée et au méthanol. La DEAE cellulose est alors équilibrée dans le mélange solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ dans les proportions 2/1 (v/v).

2) MONTAGE DE LA COLONNE

On utilise une colonne à chromatographie de 1,5 cm de diamètre et 60 cm de haut munie d'un robinet en téflon dans le bas, d'une tête rodée pour l'adduction de l'azote.

Le mélange de DEAE cellulose et de $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ est versé dans la colonne jusqu'à l'obtention d'une colonne de 20 cm \pm 3 cm de haut. Elle est équilibrée par passage de 200 ml de solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2/1.

3) DEPOT DE L'ECHANTILLON

L'échantillon est repris dans 5 ml de solvant $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2/1 (v/v) et déposé à la partie supérieure de la colonne.

4) ELUTION : PURIFICATION DES GSL NEUTRES ET ACIDES (SELON KARLSSON et al., T17)

Les glycosphingolipides totaux purifiés sont soumis à un fractionnement par chromatographie d'échanges ioniques sur colonne de DEAE cellulose équilibrée en $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2/1 (v/v).

La charge est de 50 mg de lipides/gramme de DEAE cellulose.

L'éluion est assurée par le passage successif de :

- 1°) $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ 2/1 (v/v) à raison de 100 ml par gramme de cellulose,
- 2°) CH_3OH contenant 5% de LiCl à raison de 25 ml par gramme de cellulose.

Deux fractions D et E sont obtenues respectivement : la première fraction D contient les GSL neutres, les GSL acides sont élués au niveau de la fraction E. Afin d'éliminer le LiCl contenu dans le solvant, la fraction E est mise à dialyser 4 jours contre de l'eau distillée. Les GSL acides, contenus dans la phase inférieure après déphasage, sont recueillis et évaporés à sec sous vide et le résidu repris par le mélange CHCl_3 - CH_3OH 2/1 (v/v).

FICHE 8 : CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR COLONNE D'ACIDE SILICIQUE

KARLSSON, K.A.- Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317-335 (T17)

Les GSL neutres totaux sont fractionnés par chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique équilibrée en CHCl_3 selon les conditions suivantes :

- charge de la colonne : 10 à 25 mg de lipides par gramme d'acide silicique,
- volume éluant de chaque fraction : 20 ml/g d'acide silicique,
- vitesse d'élution : 2 ml/mn.

L'élution est réalisée en augmentant la polarité du mélange éluant par des quantités croissantes de CH_3OH .

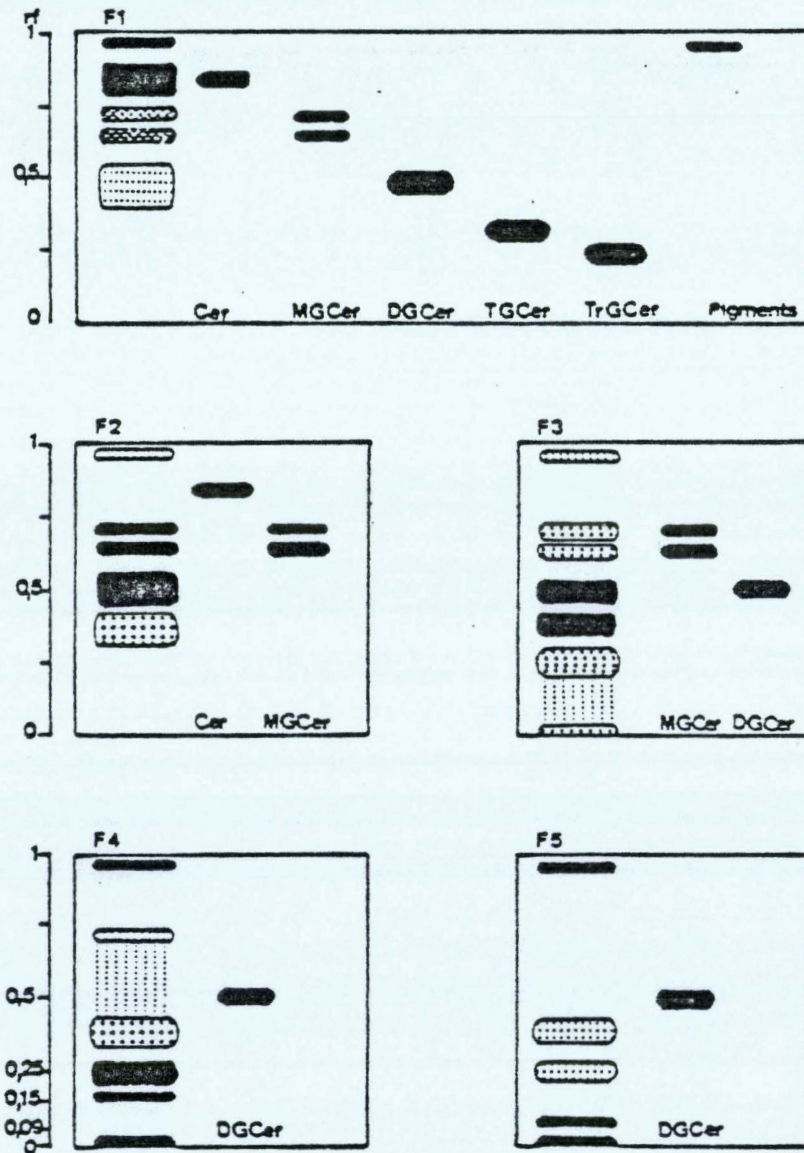
Cinq fractions sont ainsi recueillies :

- la fraction F1 éluee par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions : 98/2 (v/v)
- la fraction F2 éluee par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions : 92/8 (v/v)
- la fraction F3 éluee par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions : 85/15 (v/v)
- la fraction F4 éluee par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions : 45/55 (v/v)
- la fraction F5 éluee par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ dans les proportions : 0/100 (v/v)

La figure T2 rapporte les résultats de la chromatographie en couche mince des 5 fractions. Elles correspondent : fraction 1 (F1) principalement aux céramides et monoglycosylcéramides ; fraction 2 (F2) au mono et diglycosylcéramides ; fraction 3 (F3) en majeure partie aux di et tri-glycosylcéramides ; fraction 4 (F4) en majeure partie aux tétraglycosylcéramides ; fraction 5 (F5) à des lipides très polaires non identifiés.

FIGURE T2

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



Plaque de gel de silice G activée 1 heure à 120°C
 solvant : $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (65 : 25 : 4, v/v/v)
 migration : 13 cm
 révélation : réactif à la Rhodamine 6G
 réactif à l' α -naphтол

FICHE 9 : PURIFICATION DES GLYCOSPHINGOLIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les GSL obtenus au niveau des fractions :

F1 = céramides + (MGCer)

F2 = (MGCer) + DGCer

F3 = DGCer + TGCer

F4 = (TGCer) - TrGcer

F5 = TGCer - TrGcer - lipides polaires

nécessitent une étape supplémentaire de purification par chromatographie préparative sur couche mince en gel de silice afin d'obtenir chaque classe de GSL à l'état pur.

Les fractions correspondant aux divers GSL neutres et acides sont évaporées à sec, reprises dans 100 μ l - 200 μ l de $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3$ (1/2 - v/v) puis déposées dans leur totalité sur des plaques de gel de silice activées 30 minutes à 120°C.

La migration et la séparation des GSL sont assurées par le solvant $\text{CHCl}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (65/25/4 - v/v/v). L'emplacement des taches est révélé par pulvérisation d'une solution de rhodamine 6G et lecture des plaques en fluorescence, afin de ne pas modifier la structure des acides gras contenus dans les divers GSL.

Après séchage des plaques, les taches correspondant aux divers GSL (Cer - MGCer - DGCer - etc...) sont grattées et introduites dans de petites ampoules à décanter. Après addition de CHCl_3 (5 ml) et de CH_3OH (5 ml) l'élution des GSL se fait par agitation vigoureuse pendant 10 minutes.

L'addition de 4,5 ml d'eau distillée et l'agitation pendant une minute permettent le déphasage qui est total après 18 heures à +4°C. La phase inférieure chloroformique contenant les GSL est recueillie et évaporée sous

Le résidu sec repris par 1 ml de mélange solvant CHCl_3 - CH_3OH 2/1 (v/v) est gardé sous atmosphère d'azote à -20°C en tubes scellés.

La pureté des fractions lipidiques est testée par chromatographie analytique en couche mince (fiche technique n° 5), d'une partie aliquote.

FICHE 10 : DOSAGE FLUORIMETRIQUE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

NAOI, M. et coll. - Analytical Biochem., 1974, 58, 571-577 (T20)

INTRODUCTION

Les GSL forment une classe de lipides complexes caractérisés par la présence de N-acyl-sphingosine, liée soit à des hexoses (GSL neutres) ou à des hexoses sulfates (sulfatides) ou à des oligosaccharides contenant de l'acide sialique (gangliosides) ou enfin à la phosphocholine (sphingomyéline).

Seuls les dosages de la sphingosine et des bases homologues permettent d'évaluer la teneur en GSL d'un tissu. En effet, si les divers substituants de la base peuvent exister à des concentrations variables selon les GSL, une seule molécule de sphingosine par molécule de sphingolipide est présente chez tous les GSL connus.

La technique utilisée est celle préconisée par NAOI (T20) quand les GSL peuvent contenir des hexosamines ou céder des amines primaires hydro-solubles.

La sphingosine, libérée par hydrolyse acide des GSL est extraite du milieu aqueux par le diéthyl-éther, puis en présence de fluorescamine donne un complexe fluorescent, dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de sphingosine libérée.

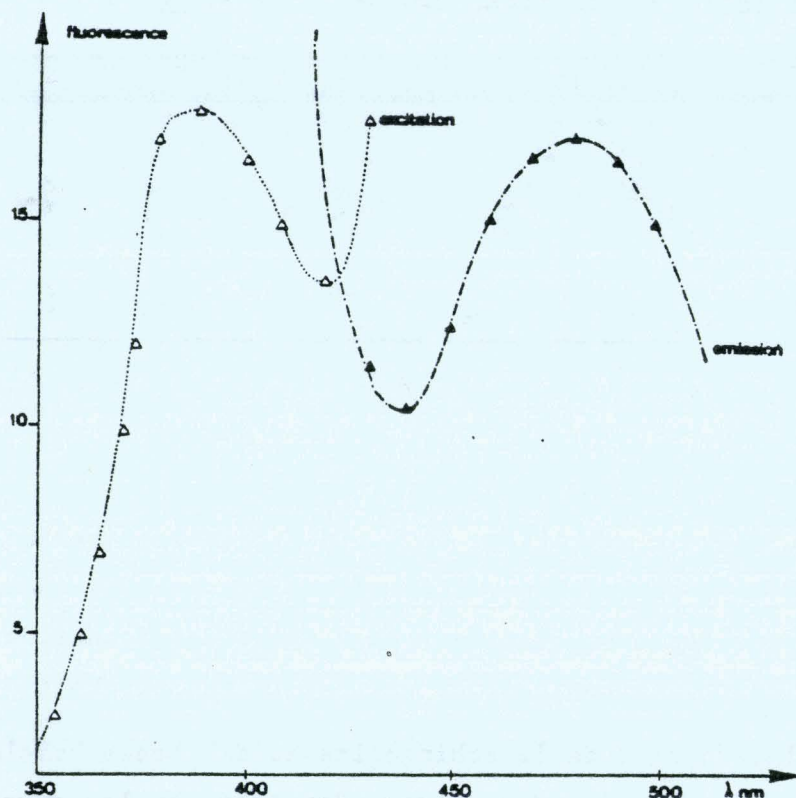
MATERIEL ET METHODE

1) REACTIFS

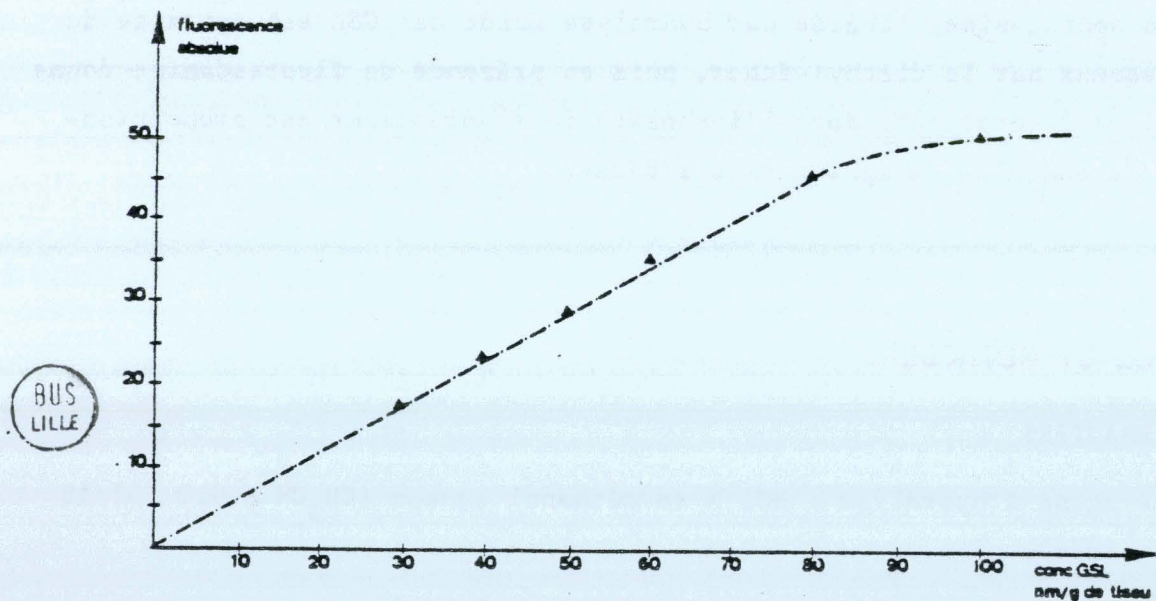
- agent d'hydrolyse : HCl N en méthanol aqueux ($\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ 82/18 (v/v),

FIGURE T3

A) SPECTRE DE FLUORESCENCE



B) COURBE D'ETALONNAGE



- NaOH 2 N,
- tampon borate de sodium 0,2 M de pH 8,0,
- diéthyl-éther,
- diéthyl-éther contenant 0,015% de fluorescamine (Fluram des Laboratoires Roche).

2) METHODE

Les extraits de GSL (1-100 nanomoles) sont chauffés en tubes vissés à 70°C pendant 18 heures en présence de 0,5 ml d'HCl 1 M en méthanol aqueux.

Après refroidissement sur glace, l'hydrolyse est arrêtée par addition de 0,25 ml de NaOH 2 N et 0,75 ml de tampon borate 0,2 M de pH 8,0.

Puis, 1,5 ml de diéthyl-éther sont ajoutés ainsi que 0,5 ml de diéthyl-éther contenant 0,015% de fluorescamine.

Après agitation vigoureuse sur Vortex et déphasage, la phase éthérée supérieure est prélevée. L'intensité de la fluorescence est appréciée sur spectrofluorimètre Zeiss pour une longueur d'onde d'excitation de 385 nm et une longueur d'onde d'émission de 480 nm.

Les spectres d'émission et d'excitation, ainsi que la linéarité de la courbe étalon ont été vérifiés et sont présentés respectivement figure T3-a et figure T3-b.

Les résultats sont exprimés en nanomoles de GSL/g de tissu.

Quatre dosages ont été réalisés pour chaque type de tissu en fonction du génotype et du type de pollinisation.

FICHE 11 : HYDROLYSE ACIDE DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

GAVER, R.G. et SWEELEY, C.C. - J. Amer. oil Chem. Soc., 1965, 42,
294-298 (T8)

INTRODUCTION

Divers types de réactifs acides peuvent assurer la destruction des glycosphingolipides et libérer quantitativement les bases, oses et acides gras. La présence d'eau dans le réactif d'hydrolyse augmente le rendement de cette hydrolyse. Ainsi nous avons préféré la technique préconisée par GAVER et SWEELEY (T8) car elle libère la totalité des bases et minimise la production d'artéfacts indésirables telles la formation de 3-O-méthylsphingosine et celle de la 5-O-méthyl Δ_3 sphingosine.

MATERIEL ET METHODE

1) REACTIF D'HYDROLYSE

- Solution d'acide chlorhydrique dans du méthanol aqueux, préparé comme suit :

- HCl concentré.....	8,6 ml
- Eau distillée.....	9,4 ml
- Méthanol q.s.p.....	100 ml

Obtention d'une solution HCl 1 M contenant 10 M d'eau.

2) PROTOCOLE OPERATOIRE

Deux mg de GSL sont repris par 1 ml du réactif d'hydrolyse. L'hydrolyse se fait à 70°C pendant 18 à 23 heures sous atmosphère d'azote.

Au terme de l'hydrolyse, les échantillons sont refroidis jusqu'à la température ambiante, ce qui permettra après extractions sélectives les analyses ultérieures par chromatographie en phase gazeuse.

FICHE 12 : PREPARATION DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS

INTRODUCTION

L'identification et la répartition des acides gras des différentes classes de lipides se font sous forme d'esters méthyliques par chromatographie gaz-liquide. La fixation d'un groupement méthyl sur la fonction acide des acides gras par une liaison ester, permet d'abaisser la température de vaporisation de ces composés et de diminuer les effets d'adsorption sur le support imprégné de phase stationnaire.

La méthode que nous avons utilisée permet d'obtenir directement par transestérification, les esters méthyliques à partir des lipides.

METHODE

1) EXTRACTION

Après hydrolyse selon le protocole décrit fiche 11, les acides gras libérés ne sont que partiellement estérifiés. Ils sont donc extraits sélectivement par 3 fois 3 ml de n-hexane en vue de subir une transestérification.

2) TRANSESTERIFICATION

Les acides gras contenus dans le n-hexane sont évaporés à sec et repris ensuite par 3 ml de méthanol additionnés de 10 gouttes d'acide sulfurique concentré.

La transméthylation se déroule à 70°C pendant 2 heures.

Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras sont transvasés dans une ampoule à décanter avec 3 ml d'heptane et 3 ml d'eau

distillée. Après agitation et déphasage, la phase supérieure heptanoïque est filtrée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée. Les esters méthyliques sont repris par 50 μ l de chloroforme en vue d'une purification sur gel de silice.

3) PURIFICATION DES ESTERS METHYLIQUES

Il convient donc de purifier les esters méthyliques par chromatographie sur couche mince.

Les esters méthyliques en solution dans le chloroforme sont déposés sur des plaques de gel de silice G activées 10 minutes à 110°C.

Le solvant de migration est le benzène.

Après migration, les fractions sont révélées par pulvérisation d'une solution de Rhodamine 6G. Le spot correspondant aux esters méthyliques, repéré grâce à l'utilisation de témoins, est gratté. Le gel de silice est déposé dans une petite colonne à chromatographie dont l'extrémité inférieure est garnie de laine de verre et élué par le chloroforme.

Après évaporation, les esters sont repris par le sulfure de carbone et analysés par chromatographie gaz-liquide.

FICHE 13 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS PAR
CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE

MATERIEL

La composition en acides gras des différentes fractions a été réalisée sur un appareil Varian 1800, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Deux types de colonnes peuvent être utilisées :

- une colonne de type standard en acier inox, de 3 mètres de long et 3 mm de diamètre, remplie de diéthylène-glycol-succinate (DEGS) à 10% en poids sur un support inerte (chromosorb W) de granulométrie 60/80 mesh AW. L'analyse s'effectue à 176°C, les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 210°C et 220°C environ. Le débit du gaz vecteur (azote R) est de 25 ml/minute à la sortie de la colonne.

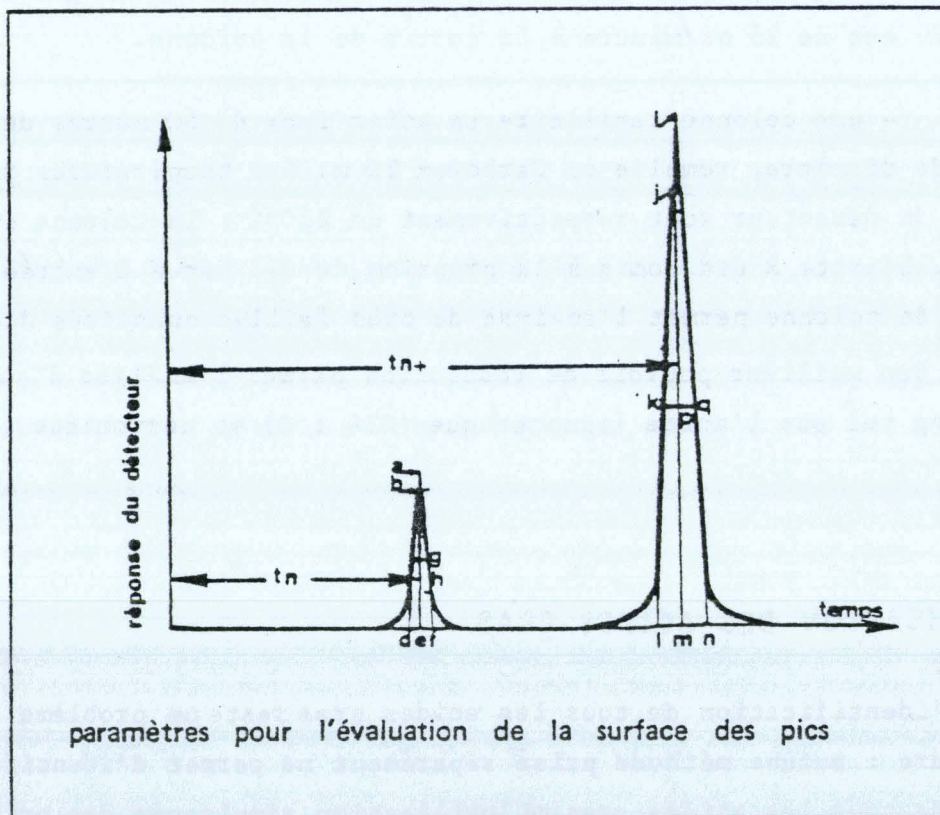
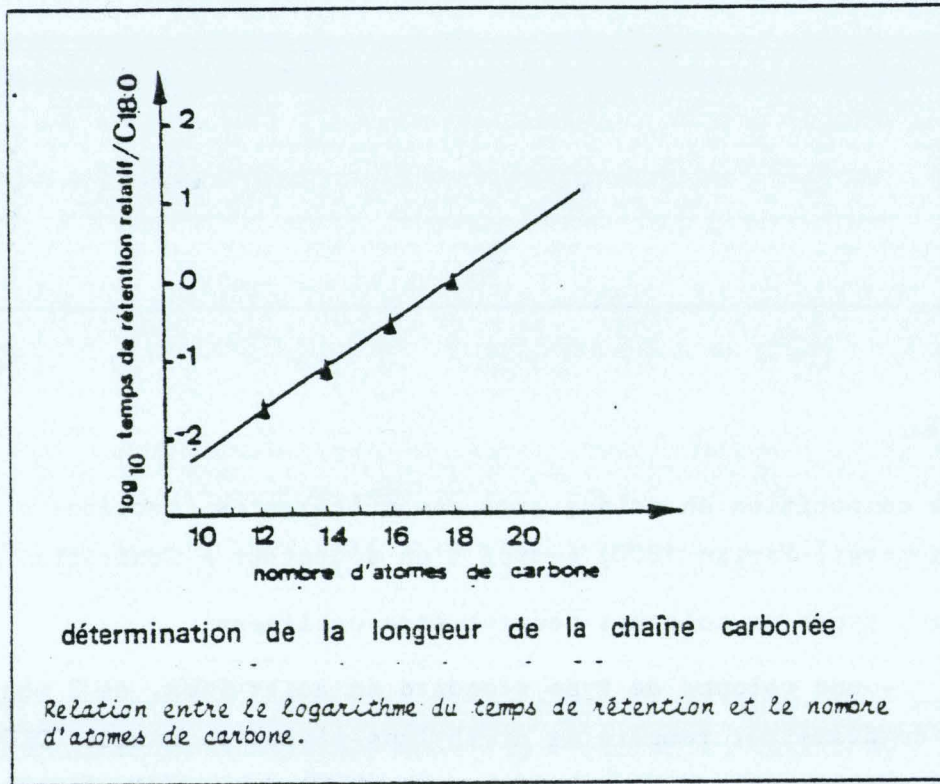
- une colonne capillaire en acier inox de 50 mètres de long et 0,5 mm de diamètre, remplie de Carbowax 20 m. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250°C ; la colonne est stabilisée à 220°C. L'azote R est admis à la pression de 0,3 bar à l'entrée de la colonne. Ce type de colonne permet l'analyse de très faibles quantités d'esters méthyliques. Son meilleur pouvoir de résolution permet l'analyse d'acides gras très long tel que l'acide lignocérique (C24 : 0) et nervonique (C24 : 1).

IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS

L'identification de tous les acides gras reste un problème difficile à résoudre : aucune méthode prise séparément ne permet d'identifier avec certitude tous les acides gras. L'utilisation simultanée des principales méthodes permet cependant d'identifier la plupart de ces acides gras.

FIGURE T4

ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ACIDES GRAS



1) COMPARAISON DES TEMPS DE RETENTION

Cette méthode est classique et rapide. Il suffit de comparer les temps de rétention des pics inconnus, avec ceux obtenus pour les esters d'acides gras témoins commerciaux. Pour un type de colonne, le temps de rétention absolu évolue avec le temps. Le temps de rétention relatif, par rapport à l'acide stéarique (C18 : 0) est constant pour un type de phase stationnaire, de température et de débit d'azote.

2) COMPARAISON DES TEMPS DE RETENTION OBTENUS SUR DES PHASES DE POLARITE DIFFERENTE

Sur une phase polaire (DEGS), la présence d'une double liaison dans la molécule d'acide gras augmente l'adsorption sur la phase stationnaire d'où une élévation du temps de rétention par rapport à l'acide gras saturé de même longueur de chaîne. Cette augmentation est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est plus élevé et que la position de l'une d'elles est plus proche de l'extrémité méthyl de la chaîne.

Sur le carbowax 20 M, tous les acides gras d'une même série (saturés et insaturés) sortent avant les acides gras de la série suivante.

Sur les DEGS l'acide linoléique (18 : 3) et l'acide arachidique (20 : 0) ont des temps de rétention quasi-identique, alors qu'ils sont parfaitement séparés sur carbowax 20 M.

L'utilisation simultanée des deux types de phase et la comparaison des temps de rétention relatifs permettent d'identifier les acides gras à 24 et 22 atomes de carbone saturés ou non.

3) RELATIONS ENTRE LES TEMPS DE RETENTION ET LE NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE

Il existe pour les acides gras homologues d'une même série une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone des molécules (figure T4).

Sur une feuille de papier semi-logarithmique nous portons en abscisse le nombre de carbone de la chaîne (échelle métrique) et en ordonnée le temps de rétention (échelle logarithmique). Ainsi, pour chaque série homologue d'acides gras, nous obtenons une droite et les droites tracées sont parallèles.

Il est possible ainsi, à l'aide des temps de rétention de deux acides gras connus sur un chromatogramme et appartenant à la même série homologue, de tracer une droite et ensuite de déterminer les temps de rétention théorique des autres acides gras de la série et de les comparer à ceux des pics connus.

4) METHODE UTILISANT LES LONGUEURS EQUIVALENTES DE CHAINE CARBONEE ECL

Comme par la méthode précédente, on trace la droite joignant les points obtenus en portant en abscisse le nombre d'atomes de carbone des acides gras saturés et en ordonnée les logarithmes des temps de rétention. Puis en utilisant les temps de rétention des acides :

- . oléique C18..... 1 W 9
- . linoléique C18..... 2 W 6
- . linoléique C18..... 3 W 3

on détermine sur le graphique la longueur équivalente de chaîne carbonée pour les trois types de doubles liaisons W9, W6 et W3.

- . l'acide oléique possède 1 double liaison en W9
- . l'acide linoélique possède 1 double liaison en W6 et 1 en W9
- . l'acide linoléique possède 1 double liaison en W3, 1 en W6 et 1 en W9.

ACKMAN et coll. (T1) supposent que, lorsqu'un acide gras contient plusieurs doubles liaisons, la valeur ECL de l'ensemble de celles-ci est égale à la somme des valeurs obtenues pour ces doubles liaisons prises individuellement. Ils admettent également que si un acide gras possède plus de 3 doubles liaisons, les autres situées entre la liaison en W et l'extrémité carbonyle sont affectées de la valeur ECL de la double liaison W9.

Pour le calcul, on porte le temps de rétention de l'acide oléique en ordonnée et on obtient en abscisse sa longueur équivalente de chaîne. Par différence avec celle de l'acide saturé correspondant (stéarique) on en déduit la valeur ECL de la double liaison W9. Connaissant cette valeur, et en opérant de la même façon, on déduit la valeur de la double liaison en W6 puis en W3.

Si on veut déterminer la nature d'un pic inconnu, on détermine son temps de rétention et au moyen de la droite précédente, on obtient sa longueur équivalente de chaîne carbonée. Puis par différence avec l'acide gras saturé précédent sur le chromatogramme, on déduit l'incrément dû à la somme de ses doubles liaisons. L'incrément est décomposé à l'aide des valeurs ECL des liaisons W3, W6 et W9. Des hypothèses sur le nombre et la position des doubles liaisons sont formulées. Selon les résultats obtenus par d'autres méthodes d'identification, il convient de choisir l'hypothèse la plus probable.

5) HYDROGENATION

La comparaison des chromatogrammes avant et après hydrogénation permet de préciser la longueur de chaîne des acides gras et notamment celle des acides gras insaturés.

EVALUATION DU POURCENTAGE DE CHAQUE ACIDE GRAS

Cette évaluation peut être effectuée par l'une des trois méthodes suivantes. Les paramètres servant à cette évaluation sont définis :

1) TRIANGULATION

Les courbes de GAUSS sont assimilées à des triangles en utilisant les tangentes au point d'inflexion (triangles ADF et ILN), la surface du pic est exprimée par la formule :

$$\frac{\text{hauteur} \times \text{base}}{2}$$

2) MESURE DE LA LARGEUR DU PIC A MI-HAUTEUR ET EN MULTIPLIANT PAR LA HAUTEUR

Les hauteurs des pics (BE - JM) sont mesurées et les valeurs 0,5 h (EH et MP) sont marquées perpendiculairement au sommet de chaque pic. La largeur à la mi-hauteur (CG - KQ) est mesurée en millimètre.

$$\text{surface du pic} = \text{BE} \times \text{CG}$$

Cette méthode, théoriquement précise, est inemployable pour les pics rapides dont les largeurs sont très faibles.

3) PAR LE PRODUIT TEMPS DE RETENTION ABSOLU QUE MULTIPLIE LA HAUTEUR DU PIC

Cette méthode dépend du fait que la largeur du pic est une fonction linéaire du temps de rétention.

La détermination des surfaces des différents pics se fait par la mesure des hauteurs de pic (BE - JM) en millimètre et par la mesure des temps de rétention (OE - OM) en millimètre également.

$$\text{surface du pic} = \text{BE} \times \text{OM}$$

Cette méthode est rapide et précise.

Les proportions relatives des différents acides gras sont exprimées en calculant le pourcentage des surfaces de chaque pic par rapport à la surface totale des pics retenus. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'esters méthyliques.

Aucune méthode de mesure n'est parfaite et l'évaluation des pics très aplatis est entachée d'erreurs importantes.

Les compositions en acides gras présentées ont été réalisées sur colonne de DEGS. Chaque analyse est le résultat moyen de trois injections. L'identification des acides gras a été réalisée en comparant les temps de rétention, en utilisant les relations entre temps de rétention et longueur de chaîne et parfois les ECL. L'évaluation des pourcentages est réalisée par la multiplication du temps de rétention par la hauteur du pic.

FICHE 14 : IDENTIFICATION DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

BIEMANN, K. - In "Mass Spectrometry". Mc GRAW-HILL ed., 1962 (T2)

MURATA, T. - J. of Lip. Res., 1978, 19, 166-171 (T19)

La technique de CPG couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier les esters méthyliques d'acides gras avec certitude même lorsqu'ils se trouvent à l'état de traces ou s'ils présentent une structure particulière.

PRINCIPE

Les esters méthyliques d'acides gras sont séparés classiquement par CPG sur une colonne capillaire de carbowax 20 M (25 m x 0,25 mm) ; à la sortie de colonne, les esters méthyliques sont ionisés par impact d'électrons ; la séparation des ions moléculaires est effectuée par un filtre quadrupole ; la détection est réalisée par un détecteur électrique ; la vitesse de lecture est très rapide, le spectre de masse pouvant être balayé en quelques milli-secondes (appareillage Riber Mag 10-10 associé au système informatique Sydar 121).

ANALYSE D'UN COMPOSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Cinq étapes sont nécessaires pour obtenir le spectre de masse d'un composé :

- l'introduction
- l'ionisation
- la discrimination des ions formés
- la détection des ions
- le traitement des résultats de l'analyse

A) INTRODUCTION DE L'ECHANTILLON

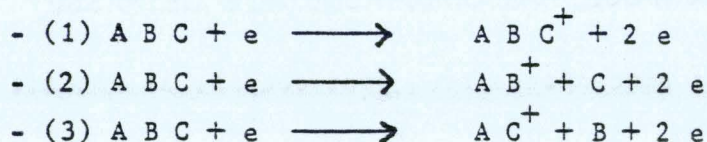
Les échantillons introduits doivent être volatils, c'est-à-dire avoir une pression de vapeur au moins égale à 10^{-2} mm de mercure à une température de 150 à 200°C, température à laquelle est portée la chambre de réception de l'échantillon. Cette condition impose l'analyse des acides gras sous forme d'esters méthyliques.

L'introduction est effectuée de façon indirecte : les acides gras en mélange sont séparés après leur passage sur la colonne de chromatographie (colonne capillaire (25 m x 0,25 mm), carbowax 20 M, température : 130-215°C à 2°/mn, température injecteur : 230°C, gaz vecteur : Helium. L'utilisation du couplage nécessite des dispositifs pour compenser en particulier la différence de pression entre les 2 appareils (1 atm. pour la CPG et 10^{-9} atm. pour la spectrométrie de masse).

B) IONISATION DE L'ECHANTILLON

Le spectromètre de masse utilisé Riber-Mag 10-10 permet l'ionisation par impact d'électrons : les molécules qui diffusent se heurtent à un faisceau perpendiculaire d'électrons émis par une électrode chauffée (fil de rhénium très fin) et attirés par une cathode placée face à l'électrode émettrice. L'énergie des électrons peut être ajustée entre 10 et 100 V, zone d'énergie qui permet le contrôle des processus d'ionisation et de fragmentation. La plupart des molécules organiques a un potentiel d'ionisation voisin de 10 eV (électron-volts) : un accroissement d'énergie de 5 à 10 eV provoque la fragmentation de la molécule.

La production d'ions par impact électronique peut se simplifier ainsi :



La réaction d'ionisation (1) se produit quand l'énergie des électrons atteint le potentiel d'ionisation de la molécule ; (2) et (3) sont 2 possibilités de fragmentation qui sont provoqués quand l'énergie des électrons est élevée, (2) est une simple cassure de la molécule, (3) implique un réarrangement des fragments de la molécule après cassure.

Il a été démontré que le pourcentage d'ions positifs est environ 1000 fois supérieur à celui des ions négatifs : on ne considère dans les spectres analysés que les ions positifs ; l'ionisation d'une molécule se produit très rapidement (10^{-15} secondes environ).

C) DISCRIMINATION DES IONS

L'appareillage utilisé est équipé d'un filtre quadrupole : c'est la combinaison d'un champ électrique continu et d'un champ électrique alternatif de haute fréquence qui effectue la séparation des ions. Ces champs sont appliqués à 4 barreaux métalliques dont l'arrangement spatial est illustré (figure T5) ; les barreaux sont connectés 2 à 2, diagonalement, par rapport à l'axe longitudinal du quadrupole, à des générateurs à potentiel variable et à haute fréquence (megahertz). Cette disposition permet de focaliser les ions dans la région centrale du quadrupole en appliquant aux 2 paires de barreaux des courants alternatifs en opposition de phase : les ions n'atteignent le détecteur que pour un rapport tension alternative/tension continue donné. Le spectre de masse complet s'obtient par augmentation progressive du potentiel tout en gardant le rapport tension alternative/tension continue constant.

D) DETECTION DES IONS

Elle peut être électrique ou photographique.

1°) Détection électrique :

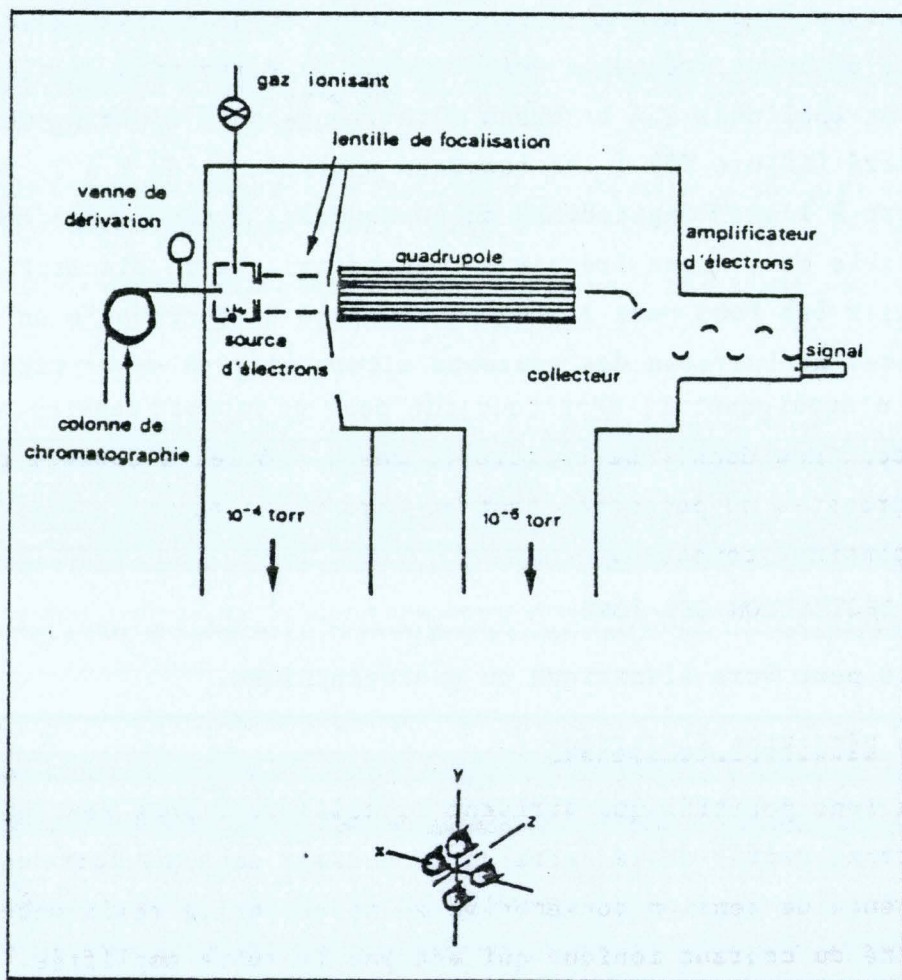
Les ions positifs qui arrivent au collecteur sont neutralisés par des électrons captés de la terre après passage dans une forte résistance. La différence de tension consécutive au niveau de la résistance représente l'intensité du courant ionique qui est par la suite amplifiée.

2°) Détection photographique :

Elle est utilisée pour des analyses précises de la masse des fragments : c'est une plaque photographique de format 5 x 25 cm qui peut contenir 15 à 30 spectres de masse ; les spectres apparaissent sur la plaque sous forme de traits verticaux bien définis, chaque trait correspondant à un ion.

FIGURE T5

SCHEMA D'UN SPECTROMETRE DE MASSE QUADRUPOLE



BUS
LILLE

E) TRAITEMENT DES RESULTATS DE L'ANALYSE

L'arrivée des ordinateurs constitue une étape fondamentale de modernisation des spectromètres de masse qui peuvent être utilisés au maximum de leurs possibilités ; l'informatique aide l'opérateur à calibrer le spectromètre de masse avec des composés de référence.

L'appareil calibré, l'échantillon est introduit ; l'acquisition des résultats commence dès que le balayage du collecteur d'ions par le détecteur est déclenché ; les résultats sont stockés en continu sur disques ou bandes magnétiques. Lorsque l'analyse de l'échantillon est terminée, l'opérateur peut faire ressortir les données acquises selon le programme qu'il a établi au départ.

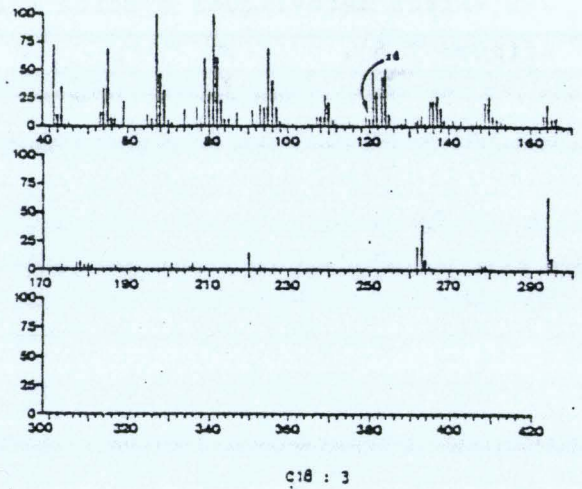
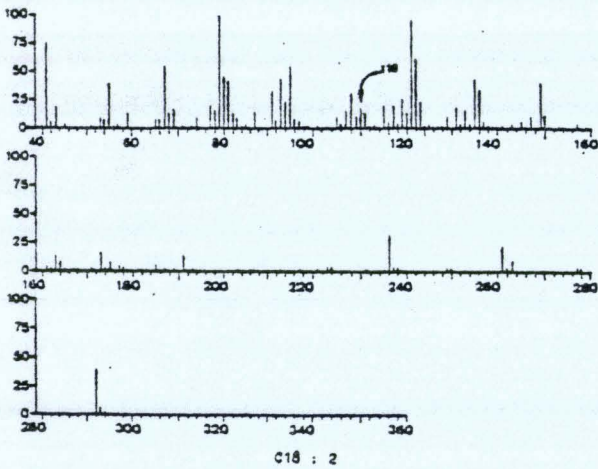
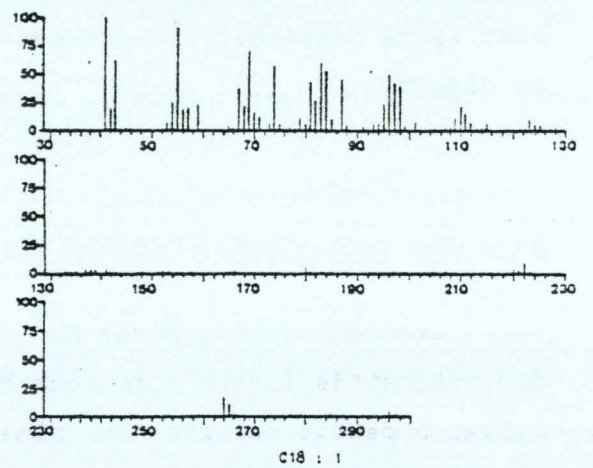
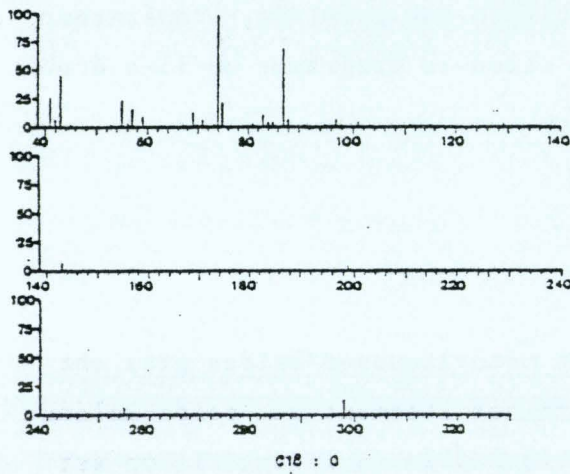
ANALYSE DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS

Les ions moléculaires MH^+ des esters méthyliques d'acides gras ont des intensités fortes ; on peut donc déterminer aisément les poids moléculaires à partir des ions MH^+ même lorsque la taille de l'échantillon est faible ou lorsqu'ils présentent un degré d'insaturation élevé (MURATA, T19).

Les diagrammes suivants présentent les spectres de masse obtenus pour les esters méthyliques d'acide stéarique, oléique, linoléique et linoléinique (figure T 6).

FIGURE T6

SPECTRE DE MASSE PAR IMPACT D'ELECTRONS DES ESTERS METHYLIQUES
D'ACIDES STEARIQUE, OLEIQUE, LINOLEIQUE ET LINOLENIQUE



FICHE 15 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN BASES A LONGUE CHAINE
(BLC) DES GLYCOSPHINGOLIPIDES

INTRODUCTION

La présence de bases à longue chaîne dans les hydrolysats acides de GSL a été démontrée par CARTER. Et, par la suite, les travaux de CARTER et de KARLSSON ont conduit à la classification de ces composés. L'analyse de ces bases impose l'identification des bases par :

- l'évaluation de la longueur de la chaîne carbonée,
- la mise en évidence de l'existence de doubles liaisons,
- la détermination de la position des branchements.

Ces bases peuvent être identifiées par des analyses en chromatographie sur couche mince dans divers solvants et par chromatographie en phase gazeuse (WEISS, T34). Tableau T1, nous avons reporté la classification générale de ces bases.

L'instabilité de ces bases, au cours de l'hydrolyse et après, nous a conduit à retenir le protocole expérimental suivant :

- 1 - libération des bases selon GAVER et SWEELEY (fiche 11),
- 2 - transformation en DNP-Dérivés qui stabilisent les bases, puis études chromatographiques de ces DNP-Dérivés en couche mince et purification,
- 3 - oxydation par le tétraacétate de plomb des DNP-Dérivés en aldéhyde puis analyses chromatographiques en couche mince et en phase gazeuse,
- 4 - oxydation par le permanganate de potassium des aldéhydes en acides gras et analyses chromatographiques en phase gazeuse.

TABLEAU T1

CLASSIFICATION DES BASES A LONGUES CHAINES (D'APRES KARLSSON, 1970)

nombre de C	formule de Shorthand	nom systématique	nom systématique selon IUPAC-IUB	origine	isolé
<i>Bases dihydroxylées non branchées saturées</i>					
12	d12:0	1,3-Dihydroxy-2-aminododecane	2X,3X-dodecaspunganine	A	
14	d14:0	1,3-Dihydroxy-2-aminotetradecane	2X,3X-tetradecaspunganine	A	
15	d15:0	1,3-Dihydroxy-2-aminopentadecane	2X,3X-pentadecaspunganine	A	
16	d16:0	1,3-Dihydroxy-2-aminohexadecane	2X,3X-hexadecaspunganine	A,P	
17	d17:0	1,3-Dihydroxy-2-aminohéptadecane	2X,3X-heptadecaspunganine	A,P	
18	d18:0	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminooctadecane	Sphinganine	A,B,P	*
19	d19:0	1,3-Dihydroxy-2-aminononadecane	2X,3X-nonadecaspunganine	A,P	
20	d20:0	1,3-Dihydroxy-2-aminodécane	2X,3X-icosaspunganine	A,P	*
<i>Bases dihydroxylées non branchées mono-insaturées</i>					
12	d12:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-aminododecène	2X,3X-dodeca-1-aspunganine	A	
13	d13:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-aminotridecène	2X,3X-trideca-1-aspunganine	A	
14	d14:1 ⁴	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminotetradecène	Tetradeca-1-aspunganine	A	*
15	d15:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-aminopentadecène	2X,3X-pentadeca-1-aspunganine	A	*
16	d16:1 ⁴	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminohexadecène	Hexadeca-1-aspunganine	A	*
17	d17:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-aminohéptadecène	2X,3X-heptadeca-1-aspunganine	A	*
18	d18:1 ⁴	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminooctadecène	4-Sphinganine	A	*
18	d18:1 ⁸	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadecène	2X,3X-sphinganine	A	
18	d18:1 ⁸	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadecène	2X,3X-aspunganine	P	
19	d19:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-aminononadecène	2X,3X-nonadeca-1-aspunganine	A	
20	d20:1 ⁴	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminodécane	Eicosa-1-aspunganine	A	*
20	d20:1 ¹¹	1,3-Dihydroxy-2-aminodécane	2X,3X-icoso-1-1-aspunganine	A	
22	d22:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-aminodocosène	2X,3X-docosa-1-aspunganine	A	
22	d22:1 ⁹	Erythro-1,3-dihydroxy-2-aminodocosène	erythro-docosa-1-9-sphinganine	A	*
22	d22:1 ¹³	Erythro-1,3-dihydroxy-2-aminodocosène	erythro-docosa-1-13-sphinganine	A	*
<i>Bases dihydroxylées non branchées di-insaturées</i>					
16	d16:2	1,3-Dihydroxy-2-aminohexadécadiène	2X,3X-hexadecaspungadiénine	A	
17	d17:2	1,3-Dihydroxy-2-aminohéptadécadiène	2X,3X-heptadecaspungadiénine	A	
18	d18:2 ^{4,14}	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminooctadécadiène	4,14-1-aspungadiénine	A	*
18	d18:2 ^{4,8}	Derythro-1,3-dihydroxy-2-aminooctadécadiène	4,8-Sphungadiénine	A	*
18	d18:2 ^{4,13}	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadécadiène	2X,3X-4,13-1-aspungadiénine	A	
18	d18:2 ^{4,12}	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadécadiène	2X,3X-4,12-1-aspungadiénine	A	
18	d18:2	1,3-Dihydroxy-2-aminooctadécadiène	2X,3X-sphungadiénine	A	
20	d20:2 ^{4,11}	1,3-Dihydroxy-2-aminodécadiène	2X,3X-icoso-4,11-1-aspungadiénine	A	
20	d20:2	1,3-Dihydroxy-2-aminodécadiène	2X,3X-icosaspungadiénine	P	
22	d22:2 ^{4,9}	Erythro-1,3-dihydroxy-2-aminodocosadiène	Erythro-docosa-4,9-1-aspungadiénine	A	*
22	d22:2 ^{4,13}	Erythro-1,3-dihydroxy-2-aminodocosadiène	Erythro-docosa-4,13-1-aspungadiénine	A	*
<i>Bases trihydroxylées non branchées saturées</i>					
16	i16:0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminohexadecane	4X-hydroxy-2X,3X-hexadecaspunganine	A,P	*
17	i17:0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminohéptadecane	4X-hydroxy-2X,3X-heptadecaspunganine	A,P	*
18	i18:0	Dribo-1,3,4-trihydroxy-2-aminooctadecane	4D-hydroxy-sphunganine	A,P	*
19	i19:0	1,3,4-Trihydroxy-2-aminononadecane	4X-hydroxy-2X,3X-nonadecaspunganine	A,P	*
20	i20:0	Dribo-1,3,4-trihydroxy-2-aminodécane	4D-hydroxy-icosaspunganine	A,P	*
<i>Bases trihydroxylées non branchées insaturées</i>					
18	i18:1 ⁸	Dribo-1,3,4-trihydroxy-2-aminooctadécène	4D-hydroxy-8-aspunganine	P	*
<i>Bases dihydroxylées branchées saturées</i>					
17	iso d17:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-15-méthylheptadecane	15-Methyl-2X,3X-hexadecaspunganine	A,B	*
18	iso d18:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-méthylheptadecane	16-Methyl-2X,3X-hexadecaspunganine	A,B	
19	iso d19:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-17-méthylheptadecane	17-Methyl-2X,3X-sphunganine	A,B	
20	iso d20:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-18-méthylheptadecane	18-Methyl-2X,3X-nonadecaspunganine	A	
17	antiso d17:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-14-méthylheptadecane	14-Methyl-2X,3X-hexadecaspunganine	A	
19	antiso d19:0	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-méthylheptadecane	16-Methyl-2X,3X-sphunganine	A	
<i>Bases dihydroxylées branchées insaturées</i>					
14	iso d14:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-12-méthyltridecène	12-Methyl-2X,3X-trideca-1-aspunganine	A	
15	iso d15:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-13-méthyltridecène	13-Methyl-2X,3X-tetradeca-1-aspunganine	A	
17	iso d17:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-15-méthylpentadecène	15-Methyl-2X,3X-hexadeca-1-aspunganine	A	
18	iso d18:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-méthylpentadecène	16-Methyl-2X,3X-heptadeca-1-aspunganine	A	
19	iso d19:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-17-méthylpentadecène	17-Methyl-2X,3X-1-aspunganine	A	
15	antiso d15:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-12-méthyltridecène	12-Methyl-2X,3X-tetradeca-1-aspunganine	A	
17	antiso d17:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-14-méthylpentadecène	14-Methyl-2X,3X-hexadeca-1-aspunganine	A	
19	antiso d19:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-16-méthylpentadecène	16-Methyl-2X,3X-1-aspunganine	A	*
20	antiso d20:1 ⁴	1,3-Dihydroxy-2-amino-17-méthylpentadecène	17-Methyl-2X,3X-nonadeca-1-aspunganine	A	
<i>Bases trihydroxylées branchées saturées</i>					
17	iso i17:0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-15-méthylheptadecane	4X-hydroxy-15-méthyl-2X,3X-hexadecaspunganine	A	
18	iso i18:0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-16-méthylheptadecane	4X-hydroxy-16-méthyl-2X,3X-heptadecaspunganine	A	
19	iso i19:0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-17-méthylheptadecane	4X-hydroxy-17-méthyl-2X,3X-sphunganine	A	
21	iso i21:0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-19-méthylheptadecane	4X-hydroxy-19-méthyl-2X,3X-icosaspunganine	A	
19	antiso i19:0	1,3,4-Trihydroxy-2-amino-16-méthylheptadecane	4X-hydroxy-16-méthyl-2X,3X-sphunganine	A	

BUS LILLE

LIBERATION DES BASES A LONGUE CHAINE

Pour les raisons précédemment décrites (fiche 11), nous avons choisi les conditions d'hydrolyse qui assurent la libération de la totalité des bases et qui produisent le minimum d'artéfacts.

Après une hydrolyse acide respectant la configuration des bases, les GSL sont coupés en :

- esters d'acides gras,
- bases à longue chaîne (BLC),
- sucres.

Les acides gras sont extraits dans un premier temps par le n-hexane (3 fois 3 ml) puis analysés en CPG. La phase méthanolique inférieure contient les sucres et les bases (BLC).

Les BLC sont extraites sélectivement par 4 volumes de diéthyléther après alcalinisation du milieu jusqu'à pH 11, par addition de soude 1 N.

Les BLC contenues dans le diéthyléther sont évaporées à sec en vue de la dinitrophénylation.

ANALYSE DES BASES SOUS FORME DE DNP-DERIVES

- 1) OBTENTION DES DNP-DERIVES DES BASES (KARLSSON, T14 ; KARLSSON et coll., T13)

Les BLC (5 mg) sont reprises par 1 ml de méthanol contenant 5 μ l de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène. Après addition goutte à goutte de 4 ml de tampon borate de potassium de pH 10,5, la dinitrophénylation se poursuit à 60°C pendant 30 minutes. Le déphasage est assuré par addition de CHCl_3 , CH_3OH et H_2O jusqu'à obtention de concentrations finales en CHCl_3 - CH_3OH - H_2O - 8/4/3 (v/v/v). Les BLC-DNP dérivés contenus dans la phase inférieure sont récupérés en vue d'une purification et d'une identification par chromatographie sur couche mince.

2) PURIFICATION DES DNP-DÉRIVÉS DES BASES (KARLSSON, 1970, T14 ;
KARLSSON et coll., 1968, T13)

La dinitrophénylation procure des avantages certains comme la perte minimale des composants causée par dégradation, réarrangement et condensation des bases après le clivage de la liaison amide. Cependant, les DNP-Dérivés des bases doivent être purifiés par chromatographie sur acide silicique afin d'éliminer les impuretés et les excès de réactifs et de séparer les bases des bases 5-hydroxylées. Un essai de purification des bases témoins par chromatographie sur colonne d'acide silicique nous a permis de tester la méthode. Pour cela, les tubes à chromatographie sont remplis avec 2 g d'acide silicique équilibré dans le mélange solvant diéthyléther - hexane - 3/7 (v/v).

La séparation chromatographique est assurée par le passage successif des solvants suivants :

- diéthyléther/hexane - 3/7 (v/v) : 1 partie
- diéthyléther/hexane - 3/3 (v/v) : 2 parties
- diéthyléther/hexane - 3/1 (v/v) : 3 parties

à raison d'un volume éluant de 20 ml/gramme d'acide silicique.

- la fraction 1 correspond aux impuretés (excès de réactifs, etc..),
- la fraction 2 contient les DNP-Dérivés des bases,
- la fraction 3 contient les 5-hydroxy DNP-Dérivés des bases.

Mais les très faibles concentrations en bases présentées par notre matériel, ne nous ont pas permis d'appliquer cette méthode de purification par chromatographie sur acide silicique, ainsi testée pour des bases témoins. Nous avons donc utilisé la chromatographie en couche mince pour analyser et purifier les DNP-Dérivés.

3) ANALYSE ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES DNP-DERIVES DES BASES (KARLSSON-MARTENSON, T12)

L'identification des DNP-Dérivés des bases peut se faire par chromatographie en couche mince.

Les DNP-Dérivés peuvent être séparés en di-hydroxy-dérivés saturés ou insaturés et en tri-hydroxy-dérivés, par chromatographie en couche mince sur gel de silice G contenant 2% de borate de Na et activé 30 min. à 120°C.

La migration est assurée par le mélange solvant chloroforme/n-hexane/méthanol dans les proportions 50/50/20 (v/v/v), la dinitrophénylation colorant les BLC en jaune, aucune révélation n'est nécessaire. Les bases hydroxylées saturées migrent le plus loin, suivies par les bases di-hydroxylées insaturées, puis par les bases tri-hydroxylées.

Après grattage des taches individuelles, les DNP-Dérivés des bases ainsi purifiés, sont élués quantitativement par le méthanol.

ANALYSE DES BASES DINITROPHENYLEES SOUS FORME D'ALDEHYDES

1) OXYDATION DES DNP-DERIVES EN ALDEHYDES PAR LE TETRAACETATE DE PLOMB (SUGITA et coll., T32)

Nous avons choisi d'oxyder les DNP-Dérivés des bases par le tétraacétate de plomb et d'analyser les aldéhydes homologues formés.

Au cours de l'oxydation par le tétraacétate de plomb, les bases tri-hydroxylées perdent trois atomes de carbone, tandis que les bases di-hydroxylées n'en perdent que deux. Ainsi :

- la phytosphingosine (t18 : 0) donne naissance à un penta-décanal saturé en C15 : 0,
- la sphinganine (d18 : 0) à un hexa-décanal saturé en C16 : 0,
- et la sphingosine (d18 : 1) à un hexa-décenal en C16 : 1.

De plus, une base di-hydroxylée (par exemple d18 : 0) et une base tri-hydroxylée possédant un atome de carbone supplémentaire (t19 : 0), conduisent après oxydation par le tétraacétate de plomb, au même aldéhyde (dans ce cas à un hexa-décanal C16 : 0) (tableau T2).

FIGURE T2

IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ALDEHYDES
DERIVES DES BASES A LONGUES CHAINES

<i>Bases à longue chaîne</i>		<i>aldéhydes</i>
A	hénadécasphinganine d16 : 0 hydroxyheptadécasphinganine t17 : 0	C14 : 0 tétradécanal
B	héptadécasphinganine d17 : 0 hydroxysphinganine t18 : 0	C15 : 0 pentadécanal
C	hexadécasphingénine d16 : 1	C14 : 1 tétradécénal
D	sphinganine d18 : 0 hydroxynonadécasphinganine t19 : 0	C16 : 0 hénadécenal
E	héptadécasphingénine d17 : 1 hydroxysphingénine t18 : 1	C15 : 1 pentadécénal
F	nonadécasphinganine d19 : 0 hydroxyeicosasphinganine t20 : 0	C17 : 0 heptadécanal
G	sphingénine d18 : 1	C16 : 1 hénadécénal
H	eicosasphinganine d20 : 0	C18 : 0 octodécanal
I	nonadécasphingénine d19 : 1	C17 : 1 héptadécénal
J	? ?	C19 : 0 nonadécenal
K	sphingadiénine ? d18 : 2 ?	C16 : 2 hénadécadienal
L	eicosasphingénine ? d20 : 1 ?	C18 : 1 octodécénal



. Mode opératoire : 2 mg de base sous forme de DNP-Dérivés sont repris par 0,1 ml de benzène contenant 30 mg de tétraacétate de plomb. L'oxydation se déroule à 50°C pendant 1 heure.

Après refroidissement, 5 ml d'eau distillée sont ajoutés au milieu réactionnel, ainsi que 5 ml de n-hexane. Après agitation et déphasage, les aldéhydes à longue chaîne, solubles dans le n-hexane sont recueillis et analysés par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse.

2) ANALYSE DES ALDEHYDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (G. VAN DESSEL, T 33)

La séparation chromatographique sur couche mince des aldéhydes à longue chaîne dérivants des bases dinitrophenylées, est réalisée sur plaque de gel de silice G, dans le système solvant : n-hexane/diéthyl-éther/acide acétique dans les proportions : 90/10/1 (v/v/v).

Les aldéhydes libres, ainsi que les cétones et les plasmalogènes apparaissent en jaune après pulvérisation des plaques avec le réactif à la 2,4-dinitrophenyl-hydrazine et léger chauffage à 120°C.

La séparation des aldéhydes se fait en fonction de la longueur de chaîne et du degré de saturation.

. Mode opératoire :

- plaques de gel de silice G activées une heure à 120°C,
- solvant : n-hexane/diéthyléther/acide acétique - 90/10/1 (v/v/v),
- réactif de révélation : solution de 2,5-dinitrophenyl-hydrazine à 0,4% dans HCl 2 N,
- distance de migration : 13 cm

3) ANALYSE DES ALDEHYDES A LONGUE CHAINE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les aldéhydes à longue chaîne peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse sans conversion préalable en un autre dérivé, en utilisant divers types de phase tels que par exemple :

- . SE 30 à 3% sur chromosorb W-AW DMCS
- . DEGS à 15% sur chromosorb W-H MDS 80-100 mesh
- . EGSSX à 5% sur Gas chromosorb Q 80-100 mesh

a) Conditions opératoires : l'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée sur un appareil Varian muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne standard en inox, remplie de diéthylène-glycol-succinate (DEGS) à 10% en poids sur un support inerte de chromosorb-W de granulométrie 60-80 mesh AW.

La température de la colonne est de 150°C, celle de l'injecteur de 170°C et celle du détecteur de 190°C.

Le débit du gaz vecteur (azote R) était de 19-20 ml/mn en tête de colonne.

b) Identification des aldéhydes à longue chaîne : l'identification des aldéhydes à longue chaîne, comme celle des acides gras est un problème difficile à résoudre.

- La comparaison des temps de rétention des pics inconnus avec ceux obtenus en utilisant des aldéhydes commerciaux est parfois impossible. En effet, les aldéhydes témoins ne sont pas tous commercialisés et il faut les synthétiser à partir, par exemple, des acides gras homologues.

Nous avons utilisé comme témoins, les aldéhydes à longue chaîne provenant de l'oxydation par le tétraacétate de plomb des bases à longue chaîne du commerce.

- le pentadécanal C15 : 0 provient de la phytosphingosine t18 : 0,
- le pentadécéanal C15 : 1 provient de la déhydrophytosphingosine t18 : 1,
- l'hexadécanal C16 : 0 provient de la sphinganine d18 : 0,
- l'hexadécéanal C16 : 1 provient de la sphingosine d18 : 1.

- Il existe également, pour les aldéhydes à longue chaîne, une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone contenus dans la molécule. Cette relation est analogue à celle qui existe pour les acides gras homologues (fiche 13).

Cependant, la longueur de chaîne équivalente à une double liaison est difficile à définir. De plus, contrairement au comportement des acides gras sur le même support, les composés en C15 (saturés ou non) ne précèdent pas les composés en C16 (saturés ou non). Le pentadécéanal est caractérisé par un temps de rétention intermédiaire entre celui de hexadécanal et celui de l'heptadécanal. Cette difficulté rend nécessaire la confirmation de ces identifications par l'emploi d'une autre technique.

c) Evaluation du pourcentage de chaque aldéhyde : cette évaluation peut être effectuée comme pour les acides gras :

- soit par triangulation,
- soit par le produit de la largeur du pic à mi-hauteur, par la hauteur du pic,
- soit finalement par le produit du temps de rétention absolu par la hauteur du pic.

C'est cette troisième méthode que nous avons appliquée.

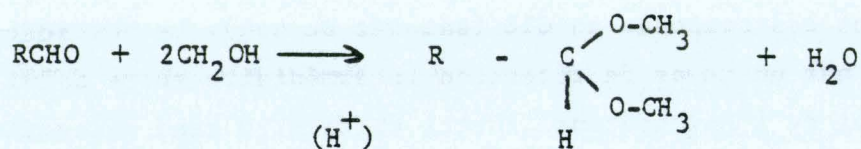
d) Conclusions : l'identification des bases sous forme d'aldéhydes présente un grand désavantage dû à l'instabilité particulière des aldéhydes.

En effet, les aldéhydes et plus particulièrement les aldéhydes à chaîne courte, se condensent et se polymérisent en dimères et trimères qui sont relativement non volatils. Cette polymérisation est accélérée en milieu alcalin.

La transformation des bases à longue chaîne en aldéhydes homologues et l'analyse des aldéhydes par chromatographie en phase gazeuse doivent être réalisées très rapidement afin d'éviter cette polymérisation.

Le deuxième problème concerne l'identification des aldéhydes dont la chaîne carbonée est désaturée. Cette identification ne peut être réalisée que par l'emploi simultané de plusieurs techniques. Les aldéhydes vont donc être transformés en produits volatils stables :

- soit sous forme de diméthyl-acétal



- soit sous forme d'alcool
- soit sous forme d'acides gras

identifiables par chromatographie en phase gazeuse.

Pour des raisons techniques (identité de colonne) nous avons opté pour la transformation des aldéhydes à longue chaîne en acides gras homologues.

ANALYSE DES BASES SOUS FORME D'ACIDES GRAS

Le passage des aldéhydes provenant des bases à longue chaîne constitutives des GSL, en acides gras homologues se fait par oxydation au permanganate de potassium.

Cette oxydation peut avoir lieu :

- soit directement sur le mélange d'aldéhydes,
- soit après hydrogénation catalytique.

Nous avons oxydé directement les aldéhydes à longue chaîne afin de confirmer la nature des bases constitutives des GSL.

Au cours de cette oxydation, les aldéhydes désaturés sont en général partiellement détruits. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse permet seulement de confirmer l'identité des aldéhydes mais elle ne permet pas la vérification du dosage.

1) OXYDATION DES ALDEHYDES EN ACIDES GRAS (SLOMIANY-HOROWITZ, T30)

a) Réactifs :

- solution saturée de KMNO_4
- solution saturée de NaHSO_3
- soude 0,2 N
- H_2SO_4 RP

b) Mode opératoire :

Les aldéhydes sont séchés sous un courant d'azote à 30°C. Ils sont ensuite remis en suspension dans 0,3 ml de NaOH 0,2 N.

Après addition de la solution de KMNO_4 jusqu'à persistance de la coloration (environ 0,3 ml) et agitation vigoureuse pendant 5 minutes, le milieu réactionnel est acidifié par addition de 0,1 ml d' H_2SO_4 RP.

La solution est ensuite décolorée par addition progressive de NaHSO_3 (environ 0,3 - 0,4 ml).

Après filtration si nécessaire, sur filtre Whatman n° 1, les acides gras sont extraits par le diéthyléther (3 x 1,5 à 2 ml).

Les acides gras contenus dans le diéthyléther sont évaporés à sec et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

2) ANALYSE DES ACIDES GRAS

Cette étape nécessite préalablement :

- une étape de transestérification (fiche n° 12),
- une étape de purification des esters méthyliques d'acides gras (fiche n° 12) par chromatographie sur couche mince,
- une injection sur colonne de DEGS à 10% en poids sur support de chromosorb (fiche n° 13).

Les résultats de cette étape confirment les résultats obtenus avec les aldéhydes.

FICHE 16 : ETUDE DE LA COMPOSITION EN OSES DES GLYCOLIPIDES

L'analyse de la copule glucidique des glycosphingolipides a été en partie réalisée dans le laboratoire de Monsieur FOURNET que nous remercions vivement.

Cette analyse nécessite trois étapes :

- méthanolyse,
- trifluoroacétylation ou triméthylsilylation des oses,
- étude par chromatographie en phase gazeuse.

1) PREPARATION DU METHANOL ANHYDRE

Un litre de méthanol et 150 grammes de K_2CO_3 sont chauffés à reflux pendant 2 heures, puis filtrés. Après addition de 50 grammes de K_2CO_3 au filtrat et distillation à $65^\circ C$, le méthanol est recueilli sur Na_2SO_4 anhydre en ayant soin d'éliminer les 20 ml de la fraction de tête et les 100 derniers.

Le méthanol est conservé à la température de $+4^\circ C$ dans un flacon hermétique et filtré juste avant l'emploi.

2) HYDROLYSE DES GSL

Après hydrolyse des GSL et extraction des acides gras, la phase inférieure méthanolique est neutralisée par addition d'acétate d'argent (100 mg) et les oses extraits par le méthanol.

3) METHANOLYSE

Les oses libres provenant de l'hydrolyse des GSL purifiés vont être soumis à une étape de méthanolyse.

250 µg de carbohydrate et 50 µg de méso-inositol jouant le rôle de témoin interne, sont introduits dans un tube en pyrex (Sovirel 92 - Levallois Perret - France) puis sont lyophilisés et desséchés toute une nuit dans un dessiccateur sur P_2O_3 .

Le résidu est repris par 2 ml d'HCl 0,5 M en solution dans du méthanol anhydre.

Les tubes sont scellés et laissés 24 heures à 80°C.

Le méthanolysat est ensuite refroidi et séché sous courant azote à 50°C.

Puis le résidu obtenu après évaporation à sec de cette solution est à nouveau évaporé à sec et ainsi de suite jusqu'à élimination totale de l'acide chlorhydrique.

4) TRIFLUOROACÉTYLATION

L'échantillon sec est repris par 200 µl de dichlorométhane et 200 µl d'anhydride trifluoroacétique.

La trifluoroacétylation se déroule à 150°C pendant 5 minutes sur bac à sable. Après refroidissement, les tubes sont replacés 5 minutes dans le bac à sable. Après un nouveau refroidissement, le mélange est prêt à être analysé par chromatographie en phase gazeuse.

5) CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES DERIVES TRIFLUOROACÉTYLES

Les dérivés trifluoroacétylés des O-méthylglycosides sont chromatographiés sur une colonne en verre (0,3 x 300 cm) remplie avec l'OV 210 à 5% (p/p) sur Varaprot 30.

L'appareil utilisé est un Varian Aérogaph modèle 2100 muni d'un détecteur à ionisation de flamme.

La programmation de la température se fait de 110° à 210° à raison de 1° par minute. Le débit de l'azote vecteur R est de 7,5 ml/mn.

Les concentrations en oses sont calculées par rapport au méso-inositol qui sert de témoin interne.

FICHE 17 : DOSAGE DE L'ACTIVITE DES $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ ATPASES (EC 3, 6, 1, 3)

d'après ROGUS, E. et coll. - J. General physiology, 1969, 54, 188 (T25)
BONTING, S.L. et coll. - Arch. Biochem. Biophys., 1961, 95,
416 (T2)

INTRODUCTION

Le dosage des $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPases (EC 3, 6, 1, 3) impliquées dans le transport actif des ions Na^+ et K^+ repose sur la grande sensibilité de ces enzymes à l'ouabaïne.

En présence d'ions Na^+ et K^+ elles hydrolysent l'ATP. Cependant dans un extrait tissulaire brut, d'autres ATPases ($\text{Ca}^+ - \text{Mg}^+$ dépendantes) ou d'autres hydrolases peuvent dégrader cet ATP. L'activité de ces enzymes contaminant est donc appréciée après inhibition par l'ouabaïne des $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPases.

Le dosage repose :

- sur l'extraction des enzymes,
- le dosage du P inorganique libéré en présence ou non d'ouabaïne par la suspension enzymatique.

La différence entre les valeurs trouvées représentant l'activité des $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPases.

MATERIEL ET METHODE

1) OBTENTION D'UNE SUSPENSION ENZYMATIQUE

Les stigmates et les styles d'Oenothera ayant subi ou non des auto- ou xénopollinisations de durée variable, sont homogénéisés au potter dans un milieu maintenu à +4°C de pH 7 et de concentration finale 0,1 M tris, 0,1 M NaCl, 10 mM KCl et 0,1 mM EDTA.

2) DOSAGE STANDARD DE L'ACTIVITE ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPASIQUE

L'activité des ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPases est appréciée au travers de la détermination colorimétrique du Pi libéré (BONTING et coll.).

250 μl de suspension enzymatique sont ajoutés au milieu réactionnel pour donner un volume final de 0,5 ml et des concentrations finales suivantes : 60 mM NaCl, 30 mM KCl, 10 mM ATP, 2 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA, 100 mM tris-HCl, pH 7,0.

Pour les tubes-contrôle, 2 mM en ouabaine sont ajoutés au milieu réactionnel précédent et subissent une préincubation de 10 minutes.

La réaction se déroule à 37°C pendant 5 min. Elle est arrêtée par addition d'ATCA (10% en concentration finale).

3) DOSAGE DU PHOSPHORE INORGANIQUE LIBERE

0,4 ml de réactif de coloration contenant 4% de FeSO_4 dissous extemporanément dans du molybdate d' NH_4 à 1% dans H_2SO_4 1,15 N sont ajoutés à 0,4 ml de milieu réactionnel.

Après 10 min. à température ambiante la D.O. appréciée à 700 nm.

Une unité enzymatique représente 1 μg Pi libéré en 5 min. par 100 mg de tissu frais.

FICHE 18 : EXTRACTION DE GLYCOLIPIDES ACIDES COMPLEXES

IRWIN, C.C., IRWIN, L.N. - Anal. Biochem., 1979, 94, 335-401 (T10)

INTRODUCTION

En voulant isoler des GSL complexes pouvant être impliqués dans les phénomènes de reconnaissance, nous avons été amenés à utiliser une étape d'extraction un peu différente de celle présentée fiche T2.

En effet l'extraction des lipides selon FOLCH ne permet pas de garder dans la phase organique, les GSL très polaires qui peuvent passer dans la phase aqueuse. Nous nous sommes donc orientés vers la technique proposée par IRWIN et coll., initialement prévue pour les gangliosides des tissus animaux.

MATERIEL ET METHODE

20 mg de tissu végétal sont homogénéisés au potter dans 1ml de solvant d'extraction chloroforme/méthanol - 2/1 (v/v).

Quand les tissus sont bien homogénéisés, la suspension est placée 5 min. à 60°C en tube vissé, puis laissée 4 heures à température ambiante.

La suspension est réhomogénéisée au potter, puis filtrée. Le filtrat correspondant à un extrait lipidique total, est conservé à -20°C et sous azote en vue de son analyse.

Cette microméthode est particulièrement adaptée aux faibles quantités de matériel biologique dont nous disposons.

FICHE 19 : ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DE
L'EXTRAIT BRUT DE GLYCOLIPIDES ACIDES COMPLEXES

HARTH, S. et coll. - Anal. Biochem., 1978, 86, 543-551 (T9)

ZANETTA, J.P. et coll. - Lipids, 1980, 15, 1055-1061 (T35)

INTRODUCTION

L'extrait obtenu par la méthode d'IRWIN a été déposé sur plaque de silice afin d'en tenter une première identification plus globale. Le solvant de migration utilisé était le suivant :

- chloroforme/méthanol/eau - 65/25/4 (v/v/v)

Nous avons donc essayé plusieurs types de révélation des oses : α -naphтол, orcinol et le résorcinol/HCl spécifique des gangliosides. Une énorme tache est apparue, lors de cette dernière révélation.

Nous avons donc utilisé des solvants de migration classique pour la séparation et l'identification des gangliosides.

MATERIEL ET METHODE

De nombreuses techniques ont été proposées pour la séparation des gangliosides. Les plus communes (PENICK et coll. (T22), EBERLEIN et coll. (T5)) utilisent les mélanges solvants suivants :

- a) chloroforme/méthanol/eau - 60/35/8 (v/v/v)
- b) chloroforme/méthanol/NH₄OH 2,5 N - 60/35/8 (v/v/v)
- c) n-propanol/eau - 7/3 (v/v)
- d) n-propanol/NH₄OH conc./eau - 6/2/1 (v/v/v)
- e) n-butanol/pyridine/eau - 3/2/1 (v/v/v)
- f) tétrahydrofurane/eau - 5/1 (v/v)

FIGURE T7

ANALYSE DES GANGLIOSIDES SUR HPTLC DANS LE SYSTEME DE HARTH ET Coll.

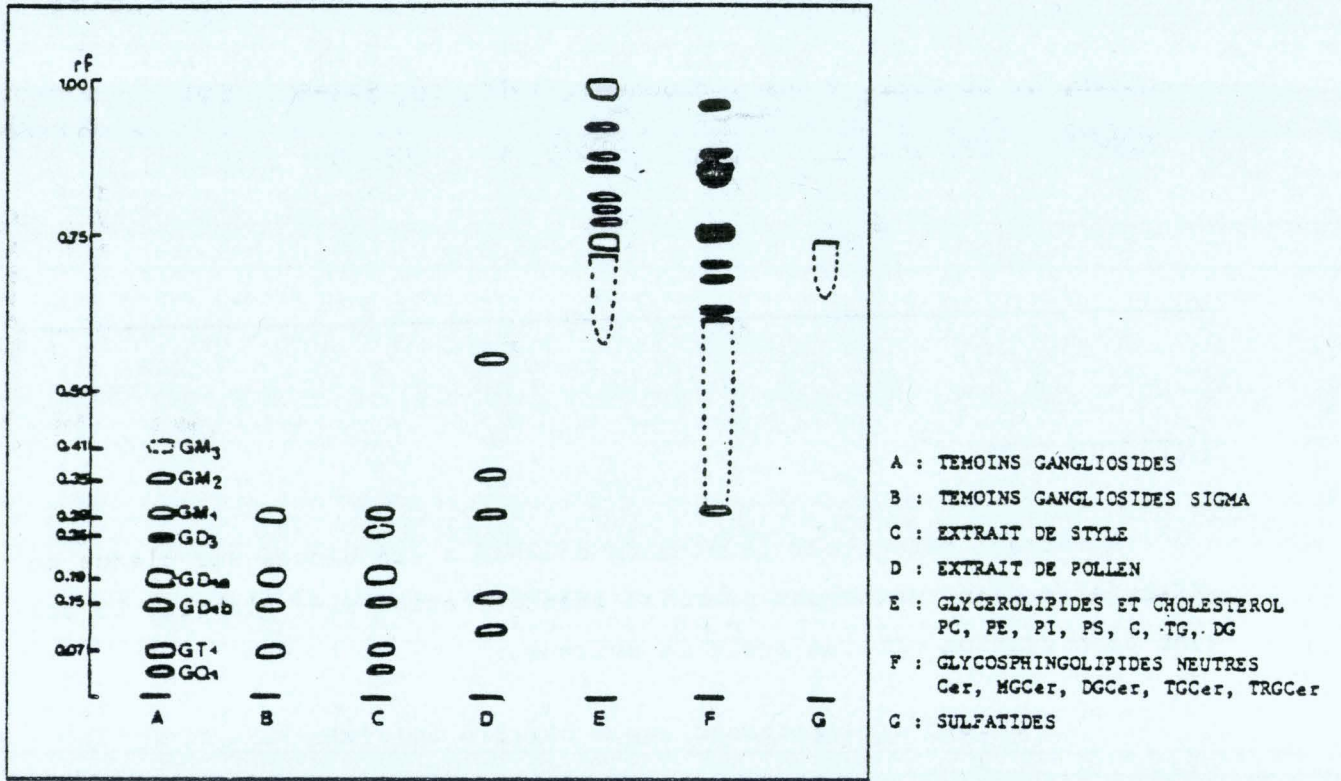
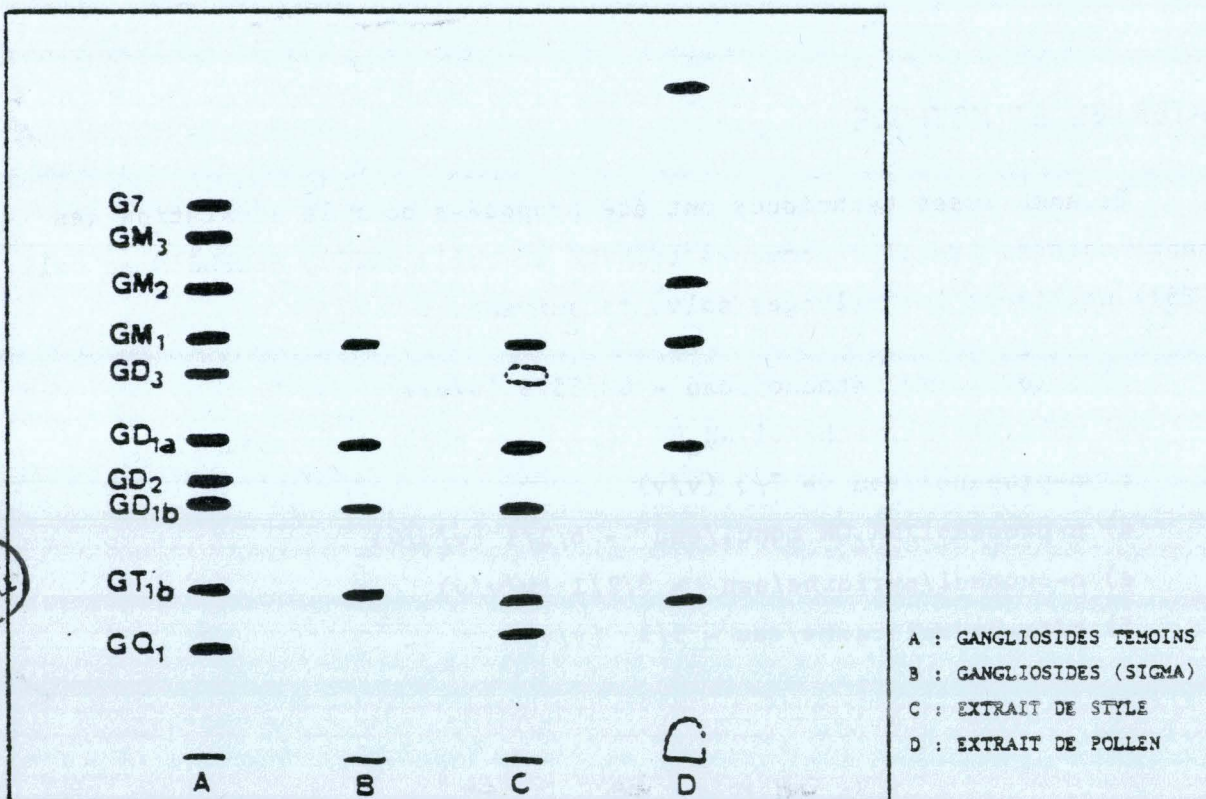


FIGURE T8

ANALYSE DES GANGLIOSIDES SUR HPTLC DANS LE SYSTEME DE ZANETTA ET Coll.



BUS
LILLY

Certaines se font en double dimension (M. OHASHI, T21).

Nous leur avons préféré les techniques proposées soit par HARTH et coll. (pour sa spécificité), soit par ZANETTA et coll. (pour sa rapidité).

1) Système solvant (HARTH et coll., T9)

La séparation des gangliosides est réalisée sur plaque d'HPTLC par une succession de mélange solvant.

La première migration de 20 cm est réalisée dans le chloroforme. Acides gras et stérois migrent avec le front du solvant.

La seconde migration de 15 cm est assurée par le mélange solvant suivant : chloroforme/méthanol/eau - 70/30/4 (v/v/v). Les phospholipides se détachent du reste des lipides.

Le troisième et le dernier solvant permet la séparation des gangliosides. Le mélange utilisé est : chloroforme/méthanol/ CaCl_2 0,25% - 65/35/8 (v/v/v).

Les plaques sont révélées par pulvérisation d'un réactif au résorcinol/HCl.

L'efficacité de ce système a été vérifiée en déposant divers témoins de phospholipides.

Les résultats des migrations sont reportés figure T7.

Aucun phospholipide ne reste au niveau de la zone (8 cm) des gangliosides. Tous les révélateurs et en particulier celui de DRAGENDORFF n'ont pas mis en évidence de lipides dans la zone des gangliosides.

De même les contrôles de la migration des divers GSL neutres, du cholestérol et des glycérolipides ont conduit aux mêmes résultats. Seuls les gangliosides apparaissent.

2) Second système solvant (ZANETTA et coll., T35)

Ici également, la séparation des gangliosides est obtenue sur plaque d'HPTLC mais dans un système solvant moins complexe : acétate de méthyl/n-propanol/chloroforme/méthanol/KCl 0,25% - 25/20/20/20/7 (v/v). En 45 min. et à température ambiante, la migration sur 20 cm et la séparation des gangliosides sont achevées.

Figure T8 nous présentons un exemple de séparation de nos extraits végétaux et d'un mélange témoin de gangliosides.

3) Révélation

Nous avons utilisé le système résorcinol-HCl

. Solution A :

- résorcinol..... 2 g
- E.D. q.s.p..... 100 ml

. Solution B :

- CuSO_4 2,49 g
- E.D. q.s.p..... 100 ml

. Solution de travail à préparer extemporanément

- Solution A..... 10 ml
- Solution B..... 0,5 ml
- HCl RP..... 80 ml

Après pulvérisation des plaques avec le réactif et chauffage 10 min à 120°C, les lipides contenant des acides sialiques apparaissent en bleu violacé.

FICHE 20 : ESSAIS DE PURIFICATION DES GSL ACIDES COMPLEXES

IRWIN, C.C., IRWIN, L.N. - Anal. Biochem., 1979, 94, 335-339 (T10)

INTRODUCTION

Les extraits préparés selon le protocole décrit fiche T18 sont purifiés par chromatographie d'adsorption sur acide silicique.

REACTIFS

- Acide silicique unisil 100-200 mesh
- Solvant n°1 chloroforme/méthanol/eau - 65/25/4 (v/v/v)
- Solvant n° 2 chloroforme/méthanol/eau - 50/50/15 (v/v/v)

MODE OPERATOIRE

Dans une pipette Pasteur de 0,5 cm de diamètre et dont l'extrémité est remplie de laine de verre, est déposé un lit de 2 cm de haut d'acide silicique.

L'extrait lipidique correspondant à 10 mg de tissu est déposé en haut de la colonne de chromatographie.

Après passage de 2 ml de solvant n° 1, seuls les lipides polaires comme les gangliosides restent sur la colonne, ainsi que quelques pigments de nature chlorophyllienne.

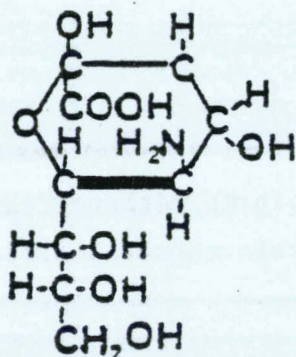
Les gangliosides sont normalement élués par 2 x 1 ml de solvant n° 2. Après le second rinçage, une légère surpression en haut de la colonne permet de récupérer la fraction F 2 sans perte.

FICHE 21 : CARACTERISATION DES ACIDES SIALIQUES

SCHAUER, R. - Methodes in enzymology, 1978, 50 (C), 64-89 (T28)

INTRODUCTION

Les acides sialiques représentent une famille de 15 composés dérivant de l'acide neuraminique.



Acide 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulosonique
ou acide neuraminique

Ces acides sialiques sont fréquemment rencontrés chez les animaux. En dépit de certains travaux, ces acides sialiques n'ont pas encore été trouvés dans les glycolipides végétaux.

La caractérisation de nos glycolipides très particuliers a commencé par une tentative de mise en évidence des acides sialiques.

LIBERATION DES ACIDES SIALIQUES

Les acides sialiques sont libérés de leur liaison glycosidique soit par les acides dilués soit par les neuraminidases (EC 3, 2, 1, 18).

Nous avons testé ces deux méthodes :

1°) Hydrolyse acide

Les glycoconjugués (1-10 mg) sont repris dans 1 ml d'HCl 0,1 N. L'hydrolyse se déroule à 80°C pendant 60 min.

Ces conditions conduisent à la libération complète des acides sialiques des gangliosides. Selon SCHAUER, 20% seulement des acides sialiques sont détruits au cours de l'hydrolyse et les groupements O-acylés sont éliminés.

2°) Hydrolyse enzymatique

Les sialoconjugués (1-10 mg) sont repris par 25 μ l de tampon acétate 1 mM de pH 5, 25 μ l de Ca Cl₂ 0,1 mM et en présence de 25 μ l de Triton X 100, dilué au 1/100e.

150 μ l de neuraminidase de Vibrio cholerae sont ajoutés, ainsi que que 25 μ l d'eau distillée. L'incubation se déroule à 37°C pendant 8 heures, en présence de 25 unités de neuraminidase.

En général l'hydrolyse dure de 30 min. à 24 h en fonction de la nature du glycoconjugué et de l'acide sialique.

Il convient de noter que la liaison de l'acide N-acétyl-4-Oacétyl neuraminique est résistante.

PURIFICATION DES ACIDES NEURAMINIQUES

Après hydrolyse acide, les lipides sont extraits, par addition de chloroforme/méthanol.

Après déphasage la phase aqueuse est déposée au sommet d'une colonne de chromatographie contenant 0,8 ml de Dowex 1 x 2 sous forme formiate.

Les contaminants sont éliminés par passage d'eau distillée (2 ml environ). Les acides sialiques sont élués par 4 ml d'acide formique à 5%.

IDENTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

L'identification par chromatographie en couche mince (CCM) des acides sialiques se fait soit sur plaque de silice, soit sur plaque de cellulose. Les plaques de cellulose subissent une pré-migration dans HCl 0,1 N puis un séchage à l'air libre afin de parfaire la séparation des acides sialiques qui sont extrêmement sensibles à la présence de cations sur les plaques de CCM.

Afin d'identifier avec plus de sécurité nos composés, nous avons utilisé :

- pour les dépôts sur plaque de cellulose les systèmes suivants :
 - a) n-butanol/n-propanol/0,1 N HCl - 1/2/1 (v/v/v)
 - b) n-butanol/pyridine/H₂O - 6/4/3 (v/v/v)
 - c) n-butanol/acide acétique/H₂O - 4/1/5 (v/v/v)

- pour les dépôts sur plaque de silicagel les deux systèmes solvants :
 - d) butanol/acide acétique/H₂O - 2/1/1 (v/v/v)
 - e) n-propanol/H₂O - 7/3 (v/v)

La migration est toujours de 10 cm. Les acides sialiques sont visualisés par pulvérisation d'un réactif au résorcinol/HCl.

FICHE 22 : DOSAGE PAR LA METHODE DE WARREN

SCHAUER, R. - Methodes in enzymology, 1978, 50 (C), 64-89 (T28)

INTRODUCTION

Diverses méthodes ont été proposées pour le dosage des acides sialiques libres (voir pour revue SCHAUER, T28).

Nous avons retenu la méthode de WARREN car elle est sensible et relativement spécifique dans certaines conditions.

Les acides neuraminiques après oxydation périodique libèrent un pré-chromogène le β -formylpyruvate qui en présence d'acide thiobarbiturique donne un chromophore rouge soluble dans les solvants organiques et dont le maximum d'absorption est situé à 549 nm.

MATERIEL ET METHODE

- Réactifs

Solution 1 : Métaperiodate 0,25 M

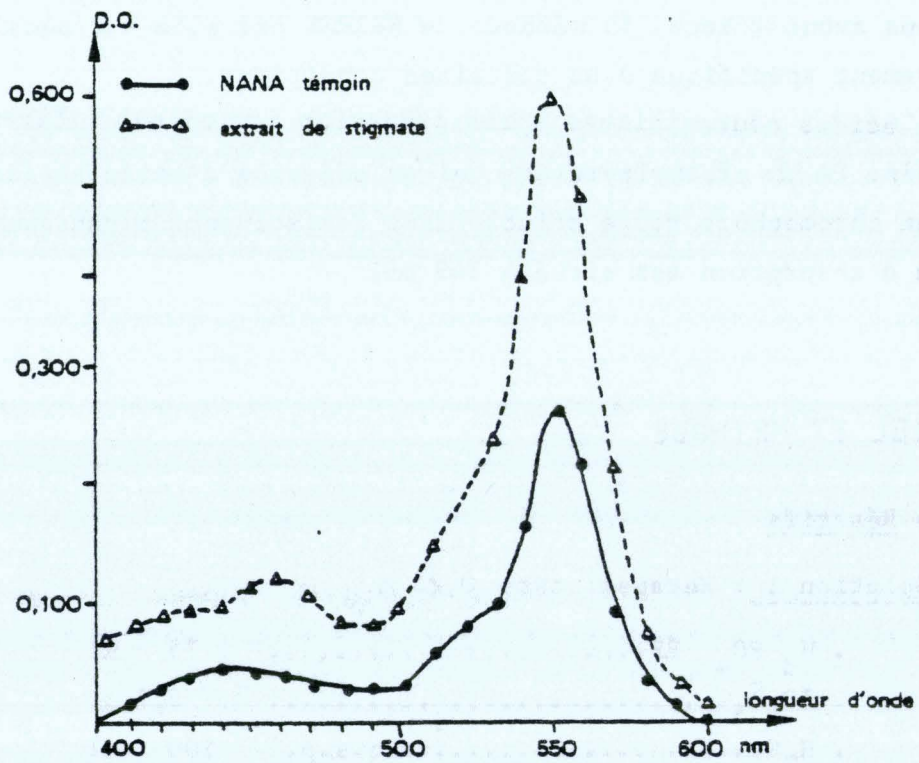
. H ₃ PO ₄ RP.....	75	ml
. IO ₆ H ₅	5,7	g
. H ₂ O.....q.s.p..	100	ml

Solution 2 : Réactif à l'arséniate

. Na As O ₂	5	g
. Na ₂ SO ₄	7,1	g
. H ₂ O.....q.s.p..	100	ml

FIGURE T9

ETUDE SPECTRALE DU CHROMOGENE FORME LORS DU DOSAGE
PAR LA METHODE DE WARREN



Solution 3 : Acide thiobarbiturique

. Acide thiobarbiturique.....	0,9 g
. Na ₂ SO ₄	7,1 g
. H ₂ O.....	q.s.p.. 100 ml

MODE OPERATOIRE

Les acides sialiques sont libérés de leurs glycoconjugués par hydrolyse acide douce (fiche T20) et purifiés par chromatographie d'échange ionique sur colonne de Dowex 1 x 2. Les acides sialiques contenus dans la fraction F2 élués par le formiate sont dosés par la méthode de WARREN.

A 250 µl de solution contenant 2 à 20 µg d'acide sialique sont ajoutés 20 µl de solution de métaperiodate.

Après 30 min. à température ambiante, l'addition de 200 µl d'arséniate permet la destruction de l'excès de periodate. Une coloration jaune apparaît correspondant à la libération de l'iode. Après agitation et décoloration 200 µl d'acide thiobarbiturique sont ajoutés et les tubes sont placés 5 min. à 100°C.

Après refroidissement le chromophore est extrait par 1 ml de cyclohexanone et la densité optique est appréciée à 549 nm et à 532 nm.

Cette méthode n'est pas réalisable sur des extraits bruts de plantes. La libération des acides sialiques et leur purification sur Dowex 1 x 2 sont en effet indispensables, car de nombreux contaminants peuvent interférer dans cette méthode si les extraits ne sont pas purifiés, ce sont le L-fucose, le 2-déoxyribose, les acides 2-ceto-3-déoxyaldoniques (KDO) et les acides gras désaturés.

Il existe une méthode pour apprécier la présence de chromophores ne dérivant pas d'acide sialique : elle réside dans une double lecture à 549 532 et dans l'application d'une formule mathématique.

Nous avons également réalisé cette double lecture, bien que nos extraits aient toujours été purifiés par chromatographie d'échange ionique.

Les spectres d'absorption des chromogènes témoins et de nos extraits sont présentés figure T9.

FICHE 23 : ANALYSE EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE DES GSL ACIDES
COMPLEXES

Les études en spectrométrie de masse du composé libéré après hydrolyse acide du glycolipide complexe ont été réalisées par Monsieur B. FOURNET et Monsieur J.C. MICHALSKI que nous remercions vivement.

Le composé obtenu après hydrolyse acide et purification sur Dowex 1 x 2 (voir Fiche T21) est réduit puis méthylé.

A) REDUCTION

2 mg de composé sont réduits par BD_4Na en excès dans 1 ml de NaOH 0,05 M durant une nuit. La réaction est arrêtée par addition de Dowex 50 x 8 (forme H^+) en batch. Après filtration, la solution est concentrée et l'excès de borate éliminé par évaporation répétée avec du méthanol.

B) METHYLATION

La méthylation a été réalisée suivant la méthode d'HAKOMORI modifiée par FINNE et coll. (*). Toutes les réactions se déroulent à l'abri de l'air, sous courant d'azote. Le produit réduit et lyophilisé est repris par 100 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) et placé 15 min. au bain ultrasonique. 200 μ l de sulfinylcarbanion sont alors ajoutés. La réaction se déroule pendant 1 heure sous ultra-sons. 200 μ l d'iodure de méthyle sont ajoutés au mélange réactionnel préalablement refroidi à $-20^\circ C$. La méthylation s'effectue en 45 min dans le bain à ultra-sons et à température ambiante.

(*) S.I. HAKOMORI. - J. Biochem (Tokyo), 1964, 55, 205-208.

Le produit méthylé est extrait 3 fois par du chloroforme. Les phases chloroformiques sont ensuite lavées à l'eau distillée et séchées sur Na_2SO_4 .

C) PURIFICATION DES DERIVES METHYLES

Le composé méthylé est alors purifié selon la méthode de YAMASHITA et coll. (*), sur une colonne de silicagel (0,5 x 5 cm, Kieselgel 70-325 mesh, Merck). Après un lavage par passage de 5 ml de chloroforme, l'élution des dérivés méthylés est assurée par 20 ml de méthanol/chloroforme - 5/95 (v/v).

D) ANALYSE EN CPG/MS

Les produits méthylés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à un spectromètre de masse (MS).

La séparation chromatographique en CPG a été réalisée sur un appareil Girdell 30 équipé d'une colonne capillaire (0,3 mm x 60 m) d'OV 101 et s'est déroulée en programmation de température (100-230°C à 5°C/min.) et pour un débit du gaz vecteur (N_2) de 20 ml/min.

L'emploi d'un appareil Riber - Mag 10-10 a permis l'identification du spectre de masse du composé.

(*) YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y. et A. KOBATA. - Arch. Biochem. Biophys., 1976, 174, 582-591.

FICHE 24 : EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES

FOLCH, J. and coll. - J. Biol. Chem., 1957, 228, 497-509 (T7)

INTRODUCTION

Les phospholipides sont très facilement extraits par le mélange chloroforme/méthanol (2/1) contrairement aux glycosphingolipides. De plus la présence dans les tissus végétaux de phospholipase D interdit toute élévation de température lors de l'extraction des phospholipides.

Les organes sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme/méthanol. Le méthanol dénature les protéines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau et mélange, on obtient un déphasage avec passage dans la phase supérieure hydroalcoolique des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux à l'état pur.

MATERIEL ET METHODE

1) REACTIFS

- solvant d'extraction chloroforme/méthanol - 2/1 (v/v)
- solution de NaCl à 7,5 g/l
- solution de lavage :
 - . chloroforme/méthanol/eau - 8/4/3 (v/v)
 - . agiter en ampoule à décantier, laisser reposer et récupérer la phase supérieure
 - . mesurer la phase supérieure et addition
 - . agiter jusqu'à dissolution complète

2) EXTRACTION

- 1 g de tissu est homogénéisé dans 20 ml de solvant d'extraction à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turax. Laisser reposer 24 heures et filtrer sur filtre sans cendre en rinçant bien le haut du filtre avec le mélange d'extraction.

- ajouter 4 ml de solution de NaCl à 7,5 g/l et agiter vigoureusement pendant 1 mn.

- abandonner une nuit à température ambiante pour permettre le déphasage. Siphoner la phase hydroalcoolique et laver trois fois la phase chloroformique avec le liquide de lavage.

- les extraits sont ensuite conservés à -20°C sous azote.

FICHE 25 : DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

RAHEYA et coll. - J. Lipid Res., 1973, 4, 695-697 (T24)

INTRODUCTION

Il existe un grand nombre de méthodes pour doser les phospholipides. Invariablement, la conversion du phosphore organique en phosphore inorganique nécessite une hydrolyse acide préalable des phospholipides. Nous avons donc retenu la méthode de RAHEYA et coll. qui n'exige pas cette étape de minéralisation des lipides car la solution chromogénique réagit directement avec le phosphore des phospholipides pour donner un complexe bleu de Prusse.

REACTIFS

- 1) Les solvants : chloroforme et méthanol sont des produits MERCK très purs (analytical grade).
- 2) Solution chromogène :
 - . Solution A : dissoudre 16 g de molybdate d'ammonium dans 120 ml d'eau.
 - . Solution B : prélever 80 ml de la solution A, ajouter 40 ml d'HCl concentré et 10 ml de mercure. Agiter pendant 30 mn et filtrer.
 - . Solution C : mélanger 200 ml d'H₂SO₄ concentré au reste de la solution A et ajouter le mélange obtenu à la solution B.
- 3) Solution chromogène proprement dit :
 - . Prélever 25 ml de solution C, ajouter 45 ml de méthanol, 5 ml de chloroforme et 20 ml d'eau.

METHODE

L'extrait lipidique correspondant à 1-10 μg de phosphore est placé dans un tube corning vissé. Le solvant est évaporé sous courant d'azote.

Le résidu sec est repris par 0,4 ml de chloroforme et 0,1 ml de solution chromogène. Le mélange est porté 85 secondes au bain-marie bouillant et après 10 mn de refroidissement à température ambiante, 5 ml de chloroforme sont ajoutés. Après agitation et repos de 30 mn, la lecture se fait à 710 nm contre un blanc témoin.

Des courbes d'étalonnage relatives aux différentes classes de phospholipides sont établies en utilisant des étalons traités dans les mêmes conditions. La teneur en phospholipides est lue sur la droite.

Il existe une relation linéaire entre la densité optique et la teneur en phosphore pour des valeurs comprises entre 1 à 10 μg de phosphore lipidique.

FICHE 26 : DOSAGE DES GLYCERIDES

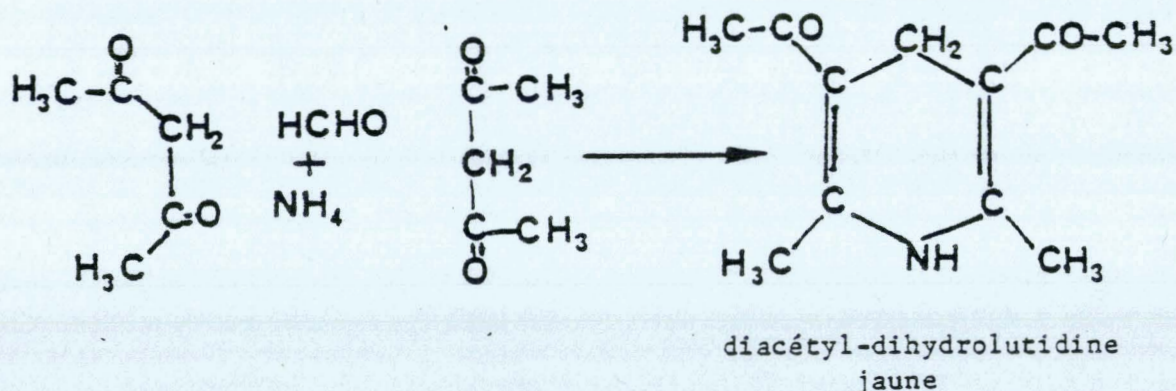
LARTILLOT, S., VOGEL, C. - Feuillet de Biochimie, 1970, 11 (53), 1-4
(T18)

INTRODUCTION

Nous avons préféré ne pas utiliser les dosages enzymatiques des triglycérides tels qu'ils se pratiquent sur les sérums car les extraits chloroformiques après évaporation à sec sont très difficiles à solubiliser dans le milieu aqueux nécessaire à la réaction enzymatique. Nous leur avons donc préféré le dosage classique de LARTILLOT et VOGEL (T18).

Le méthylate de sodium dans l'isopropanol libère le glycérol de ses liaisons esters par une transestérification directe.

Le glycérol libéré est ensuite oxydé par l'acide periodique en aldéhyde formique. Celui-ci condensé avec l'acétylacétone et l'ammoniac selon la réaction de HANTZCH, donne un composé coloré en jaune et fluorescent dû à la 3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine qui peut être dosé par colorimétrie ou fluorimétrie.



REACTIFS

- 1) Mélange solvant : isopropanol/heptane - 35/20 (v/v).
- 2) Solution de tripalmitine à 1 mg/ml dans le mélange solvant précédent.
- 3) Méthylate de sodium 0,1 M dans l'isopropanol anhydre.

Le réactif étant de conservation limitée, il est préférable de le préparer par petites quantités à partir d'une solution mère molaire.

4) Solution periodique

- . Métaperiodate de sodium..... 0,250 g
- . Acide acétique..... 2,5 ml
- . Eau distillée.....q.s.p. 100 ml

5) Réactif colorant

- . Acétate d'ammonium..... 15 g
(dissoudre dans environ 50 ml d'eau)
- . Acétylacétone..... 4 ml
- . Eau distillée.....q.s.p. 100 ml

NOTA : il faut utiliser des solvants de très bonne pureté, notamment exempts d'aldéhydes.

MODE OPERATOIRE

L'extrait lipidique contenant de 0 à 30 µg de glycérolipides est évaporé à sec puis repris par 0,5 ml de mélange solvant.

Le tableau suivant résume la séquence opératoire qui comporte oxydation periodique et coloration.

Séquence opératoire	Analyse	Etalon	Blanc
Extrait	0,5	0,5	0,5
Evaporer à sec. Reprendre par 200 µl d'heptane			
Méthylate de Na	2	2	2
Mélanger et attendre 5 minutes			
Solution périodique	1	1	1
Mélanger			
Réactif colorant	0,5	0,5	0,5
<p>Mélanger et laisser décanter 5 à 10 mn ; sans attendre que la phase inférieure soit complètement limpide, éliminer le surnageant à la trompe à vide.</p> <p>Centrifuger quelques mn à environ 3000 tr/mn pour éliminer le reste de la phase organique.</p> <p>Placer les tubes au bain-marie à 37°C pendant 20 mn.</p> <p>Refroidir les tubes dans un bac à glace.</p> <p>Mesurer les D.O. par rapport au blanc à 410 nm.</p>			

Les résultats sont exprimés en mg de tripalmitine.



FICHE 27 : DETERMINATION DU RAPPORT LECITHINE/SPHINGOMYELINE

STUBER, A. et coll. - Clin. Chim. Acta, 1976, 70, 221-226 (T31)

INTRODUCTION

La détermination du rapport lécithine/sphingomyéline repose sur :

- la séparation par chromatographie en couche mince de la lécithine et de la sphingomyéline.
- leur révélation spécifique par le réactif de DRAGENDORFF.
- l'intégration au densitomètre Sebia des chromatogrammes.
- l'évaluation des surfaces des pics correspondants.

REACTIFS

- Plaque de gel de silice
- Solvant de migration : chloroforme/méthanol/eau - 8/3/0,5 (v/v/v)
- Réactif de DRAGENDORFF :

. solution 1 : $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,7 g
 CH_3COOH 20% q.s.p. 100 ml

. solution 2 : IK 40 g
E.D. q.s.p. 100 ml

. solution de travail à préparer extemporanément :

- solution 1 : 5 ml
- solution 2 : 5 ml
- CH_3COOH RP : 20 ml
- E.D. 100 ml

. solution étalon

- lécithine	1	mg
- sphingomyéline	1	mg
- chloroforme	0,5	ml
- méthanol	0,5	ml

MODE OPERATOIRE

Les extraits lipidiques de 10 ou 20 μ l (correspondant à 10 μ g minimum en lécithine et en sphingomyéline) sont déposés sur des plaques de silice ; la chromatographie (1 h 45) se déroule sur 20 cm dans le système solvant.

Après pulvérisation des plaques par le réactif de DRAGENDORFF, seuls les lipides contenant de la choline sont révélés.

Les chromatogrammes sont enregistrés sur un intégrateur de type Sebia.

BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE

BIBLIOGRAPHIE TECHNIQUE

- T1 ACKMAN, R.G. and S.N. HOOPER. - Additivity of retention data from ethylenic function in aliphatic fatty acids. J. Chromatogr., 1973, 86, 73.
- T2 BIEMANN, K. - Mass spectrometry : organic chemical applications. Mc Gaw-Hill Book Co. ed.
- T3 BONTING, S.L., SIMON, K.A. and N.M. HAWKINS. - Studies on $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ ATPase : I - quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch. Biochem. Biophys., 1961, 95, 416.
- T4 CARTER, H.E., STROBACH, D.R. and J.N. HAWTHORNE. - Biochemistry of sphingolipids. XVIII - Complete structure of tetrasaccharide phyto-glycolipids. Biochem., 1969, 8, 383.
- T5 EBERLEIN, K. and G. GERCKEN. - Thin layer chromatographic separation of gangliosides. J. Chromatogr., 1975, 106, 425.
- T6 FOLCH, J., LEES, A.M., MEATH, J.A. and F.N. LE BARON. - Preparation of lipid extracts from brain tissues. J. Biol. Chem., 1951, 191, 833-841.
- T7 FOLCH, J., LEES, A.M. and G.H. SLOANE STANLEY. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957, 228, 497.
- T8 GAVER, R.G. and C.C. SWEELEY. - Methods for methanolysis of sphingolipids and direct determination of long chain bases by gas liquid chromatography. J. Amer. Oil Chem. Soc., 1965, 42, 294.
- T9 HARTH, S., DREYFUS, R., URBAN, P.F. and P. MANDEL. - Direct thin layer chromatography of gangliosides of a total lipid extract. Anal. Biochem., 1978, 86, 543.

- T10 IRWIN, C.C. and L.N. IRWIN. - A simple rapid method for ganglioside isolation from small amounts of tissue. Anal. Biochem., 1979, 94, 335.
- T11 KARAN, K. and R.L. LESTER. - Characterization of inositol containing phosphosphingolipids from Tobacco leaves. Plant Physiol., 1975, 55, 120.
- T12 KARLSSON, K.A. and E. MARTENSSON. - Studies on sphingosines. XIV - On the phytosphingosine content of their major human kidney glycolipids. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 230.
- T13 KARLSSON, K.A. and G.O. STEEN. - Studies on sphingosines. The existence of phytosphingosine in bovine kidney sphingomyelins. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 798.
- T14 KARLSSON, K.A. - On the chemistry and occurrence of sphingolipid long chain bases. Chem. Phys. lipids, 1970, 5, 6.
- T15 KARLSSON, K.A. and J. PASCHER. - Thin layer chromatography of ceramides. J. Lip. Res., 1971, 12, 466.
- T16 KARLSSON, K.A., SAMUELSSON, B.O.E. and G.O. STEEN. - Detailed structure of sphingomyelins and ceramids from different regions of bovine kidney with special reference to long chain base. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 336.
- T17 KARLSSON, K.A., SAMUELSSON, B.O.E. and G.O. STEEN. - Sphingolipids composition of bovine kidney cortex, medulla and papilla. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 316, 317.
- T18 LARTILLOT, S. et C. VOGEL. - Dosage des triglycérides sériques. Feuille de Biologie, 1970, 11, 1.
- T19 MURATA, T. - Analysis of fatty acid methylesters by a gas-liquid chromatography-chemical ionization mass spectrometry computer system. J. Lip. Res., 1978, 19, 166.

- T20 NAOI, M., LEE, Y.C. and S. ROSEMAN. - Rapid and sensitive determination of sphingosine base and sphingolipid with fluorescamine. Anal. Biochem., 1974, 58, 571.
- T21 OHASHI, M. - A comparison of the ganglioside distributions of fat tissues in various animals by two dimensional thin layer chromatography. Lipids, 1979, 14, 52.
- T22 PENICK, R.J., MEISLER, M.H. and R.H. MACCLUER. - Thin layer chromatographic studies of human brain gangliosides. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 116, 279.
- T23 POLONOSKI, J. - Les sphingolipides. Problèmes actuels de biochimie générale. Mass éd., 1972, 1.
- T24 RAHEJA, R.K., KAUR, C., SINGH, A. and I.S. BHATIA. - New colorimetric method for the quantitative estimation of phospholipids without acid digestion. J. Lip. Res., 1973, 4, 695.
- T25 ROGUS, E., PRICE, T. and K.L. ZIERLER. - Na^+ + K^+ activated ouabain inhibited Adenosine triphosphatase from a fraction of Rat skeletal muscle, and lack of insulin effect on it. Journal of general physiology, 1969, 54, 188.
- T26 ROUSER, G., KRITCHEVSKY, G., HELLER, D. and E. LIEBER. - Lipid composition of beef brain, beef liver and the sea anemone : two approaches to quantitative fractionation of complex lipid mixture. J. Am. Oil Chem. Soc., 1963, 40, 425.
- T27 ROUSER, G., KRITCHEVSKY, G. and A. YAMAMOTO. - Column chromatography and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids. In "Lipid chromatographic analysis". MARINETTI, G.V. ed., 1967, 1, 99.
- T28 SCHAUER, R. - Characterization of sialic acids. Methods of enzymology, 1978, 50 (C), 64.

- T29 SCHMID, P. - Extraction and purification of lipids. II - Why is CHCl_3 - CH_3OH such a good lipid solvent. Physiol. Chem. Phys., 1973, 5, 141.
- T30 SLOMIANY, B.L. and M.I. HOROWITZ. - The glycolipids of bovine serum. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 218, 278.
- T31 STUBER, A., ADAM, J. and G. SZONYI. - A simple and rapid determination of the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluids and in pharyngeal aspirates of new born infants. Clin. Chim. Acta, 1976, 70, 221.
- T32 SUGITA, M., ITASAKA, O. and T. HORI. - Branched long chain bases from the bivalve Corbicula sandaf. Chem. Phys. Lipids, 1976, 16, 1.
- T33 VAN DESSEL, G., LAGROU, A., HILDERSON, H.J., DIERICK, W. and G. DACREMONT. Quantitative determination of the neutral glycosylceramides in bovine thyroid gland. Biochimie, 1977, 59, 839.
- T34 WEISS, B. - Thin layer chromatography and gas liquid chromatography of sphingosine and related compounds. In "Lipids chromatographic analysis". MARINETTI, G.V. ed., 1967, 1, 429.
- T35 ZANETTA, J.P., VITIELLO, F. and G. VINCENDON. - Gangliosides from rat cerebellum : demonstration of considerable heterogeneity using a new solvent thin layer chromatography. Lipids, 1980, 15, 1055.

