

570. AT/01.

THESE

DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée à

811386

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

" HOUARI BOUMEDIENE " D'ALGER

par

D/N/39

Ghouziel KESRI - BENHASSAINE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

ETUDE DU METABOLISME DES LIPIDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU CARTHAME

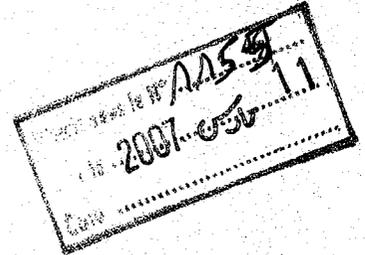
(*Carthamus tinctorius L.*)

Soutenue le 16 Novembre 1985 devant le Jury

Composé de MM.

- | | |
|------------------|--------------|
| - TAYEBI B. | Président |
| - MAZLIAK P. | Rapporteur |
| - CHERIF A. | } Examineurs |
| - CHIKHI A. | |
| - SELSELLET G. | |
| - TREMOLIERES A. | |

THESE



DE DOCTORAT D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

présentée à

B 11386

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
" HOUARI BOUMEDIENE " D'ALGER

par

Ghouziel KESRI - BENHASSAINE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES - SCIENCES

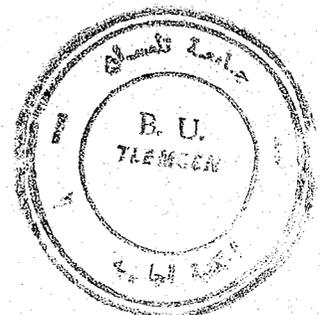
ETUDE DU METABOLISME DES LIPIDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU CARTHAME

(Carthamus tinctorius L.)

Soutenue le 16 Novembre 1985 devant le Jury

Composé de MM.

- | | |
|------------------|--------------|
| - TAYEBI B. | Président |
| - MAZLIAK P. | Rapporteur |
| - CHERIF A. | } Examineurs |
| - CHIKHI A. | |
| - SELSELLET G. | |
| - TREMOLIERES A. | |



Ce travail commencé au laboratoire de Physiologie Végétale de l'U.S.T.H.B. a été en majeure partie effectué au laboratoire de Physiologie Cellulaire (Université Pierre et Marie Curie) dirigé par Monsieur le Professeur MAZLIAK.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur MAZLIAK, qui m'a confié le sujet de cette thèse, m'a accueillie dans son laboratoire de ce travail, j'ai pu bénéficier de sa grande expérience scientifique et pédagogique. Sans son aide, ses encouragements et ses conseils je n'aurais jamais pu le terminer.

Monsieur le Professeur TAYEBI a bien voulu accepter de présider ce jury de thèse. Je lui adresse mes sincères remerciements.

Je remercie Monsieur CHERIF, Professeur à l'I.S.T. de Tunis, Monsieur SELSELLET, Maître de Conférences à l'I.N.A. d'Alger, et Monsieur CHIKHI, Professeur à l'U.S.T.H.B. d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse malgré leurs nombreuses obligations.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur TREMOLIERE, Maître de Recherche au C.N.R.S., de participer au jury de thèse; il m'a guidée avec J.P. DUBACQ et D. DRAPIER dans le domaine des lipides des végétaux. Je leur exprime mes sincères remerciements pour l'aide qu'ils m'ont accordée.

Je tiens à remercier MICHELINE POITTEVIN qui a assuré avec gentillesse et compétence la dactylographie de ce texte et la présentation du mémoire.

Enfin, je remercie chaleureusement tous les amis des laboratoires de Physiologie Cellulaire de Paris VI et du laboratoire de Physiologie Végétale de l'U.S.T.H.B. qui m'ont aidée par leurs encouragements.

SOMMAIRE

Abréviations	6
INTRODUCTION	7
HISTORIQUE	10
A - Formation des réserves lipidiques dans les graines oléagineuses	11
B - Utilisation des réserves lipidiques dans les plantes oléagineuses	15
C - Métabolisme des lipides dans les feuilles	16
CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES	19
A - UTILISATION DU MATERIEL VEGETAL	21
1 - Matériel végétal	21
2 - Conditions de germination	21
3 - Sélection des plantules	21
4 - Culture en champ et floraison	21
5 - Préparation des organites cellulaires	21
a - Chloroplastes	21
b - Microsomes	22
6 - Utilisation des précurseurs radioactifs	23
a - Choix des précurseurs	23
b - Au niveau de la plante entière	23
c - Au niveau des microsomes	24
d - Au niveau des chloroplastes	24
B - METHODES DE DOSAGE	25
1 - Extraction des lipides totaux	25
a - A partir des tissus	25
b - A partir des suspensions d'organites	25
2 - Extraction et méthylation des acides gras totaux	25
3 - Séparation des catégories lipidiques	27
a - Adsorption sur gel de silice	27

b - Chromatographie sur couche mince	27
4 - Extraction et méthylation des acides gras des catégories lipidiques	28
5 - Analyse des acides gras	29
a - Chromatographie en phase gazeuse	29
b - Chromatographie sur couche mince	29
6 - Détermination de la radioactivité	29
a - Des fractions lipidiques	29
b - Des différentes catégories lipidiques	29
c - Des différents acides gras	30
7 - Dosage de protéines	30
8 - Dosage des chlorophylles	30
9 - Expression des résultats	31

CHAPITRE II - SYNTHÈSE DES LIPIDES AU COURS DE LA FORMATION DE L'AKENE ..

A - EVOLUTION DES LIPIDES TOTAUX	34
- Evolution des acides gras totaux	34
B - EVOLUTION DES CATEGORIES LIPIDIQUES	40
1 - Triacylglycérols	40
2 - Diacylglycérols	42
3 - Lipides polaires	43
a - Phospholipides	45
b - Galactolipides	49
Conclusion	52

CHAPITRE III - ETUDE DE LA GERMINATION DES AKENES

A - CROISSANCE DES PLANTULES	58
B - EVOLUTION DES RESERVES PROTEIQUES	58
C - EVOLUTION DES RESERVES LIPIDIQUES	58
D - EVOLUTION DES CATEGORIES LIPIDIQUES	62

1 - Triacylglycérols	62
2 - Diacylglycérols	64
3 - Lipides polaires	65
a - Phospholipides	68
b - Galactolipides	73
Conclusion	74

CHAPITRE IV - ETUDE DU METABOLISME LIPIDIQUE DANS LES PLANTULES EN CROISSANCE

A - ETUDE *IN VIVO* DES VOIES METABOLIQUES

1 - Incorporation de $[1-^{14}C]$ -acétate	78
2 - Incorporation dans les acides gras totaux	78
3 - Incorporation dans les catégories lipidiques	82
4 - Incorporation dans les acides gras des catégories lipidiques	85

Conclusion

B - ETUDE DES MECANISMES DE DESATURATION *IN VIVO*

1 - Etude du marquage des lipides à partir de $[1-^{14}C]$ -oléate	93
a - Incorporation dans la fraction lipidique	93
b - Incorporation dans les acides gras totaux	93
c - Incorporation dans les catégories lipidiques	95
d - Désaturation de $[1-^{14}C]$ -oléate	99
2 - Etude du marquage des lipides à partir de $[1-^{14}C]$ -linoléate	102
a - Incorporation dans la fraction lipidique	102
b - Incorporation dans les acides gras totaux	102
c - Incorporation dans les catégories lipidiques	105
d - Désaturation de $[1-^{14}C]$ -linoléate	108

Conclusion

C - SITES CELLULAIRES DES DESATURATIONS *IN VIVO*

1 - Incorporation de $[1-^{14}C]$ -linoléate dans les différentes fractions cellulaires	111
2 - Incorporation de $[1-^{14}C]$ -linoléate dans les acides gras totaux	113

3 - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans les catégories lipidiques	113
4 - Désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans les différentes fractions	117
Conclusion	120
D - ETUDE DES DESATURATIONS <i>IN VITRO</i>	125
1 - Etude avec les microsomes	125
a - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA	125
b - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques	125
c - Désaturation des résidus $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl	127
Conclusion	129
2 - Etude avec les chloroplastes	130
a - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA	130
b - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques	131
c - Désaturation des résidus $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl	136
Conclusion	137
CONCLUSIONS GENERALES	139
BIBLIOGRAPHIE	144

ABREVIATIONS

Acides gras :

- C16:0 : acide palmitique
- C16:1 : acide hexadécénoïque
- C16:3 : acide hexadécatriénoïque
- C17:0 : acide heptadécanoïque
- C18:0 : acide stéarique
- C18:1 : acide oléique
- C18:2 : acide linoléique
- C18:3 : acide linoléinique

- ACP : "acyl carrier protein" (protéine de transport des groupes acyls)
- AGL : acides gras libres
- AGT : acides gras totaux
- BSA : sérum albumine de Boeuf
- CDP-choline : cytidine diphosphocholine
- CoA : coenzyme A
- 1,2 DAG : 1,2 diacylglycérol
- 1,3 DAG : 1,3 diacylglycérol
- DGDG : digalactosyldiacylglycérol
- DTT : dithiothreitol
- EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
- G-3-P : glycérol-3-phosphate
- Hépès : acide 2-hydroxyéthylpupérazine 2-éthanesulfonique
- LN : lipides neutres
- LP : lipides polaires
- MGDG : monogalactosyldiacylglycérol
- NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
- PA : acide phosphatidique
- PC : phosphatidylcholine
- PE : phosphatidyléthanolamine
- PG : phosphatidylglycérol
- PI : phosphatidylinositol
- POPOP : 1,4 bis 2-(4 méthyl-5-phénylozazoly) benzénoï
- PPO : 2,5 diméthylazazole
- SL : sulfoquinovosyldiacylglycérol
- TAG : triacylglycérol
- Tris : tris (hydroxyméthyl) aminoéthane
- UDP-gal : uridine diphosphogalactose

INTRODUCTION

L'Algérie importe actuellement 220 000 tonnes par an de matière grasse d'origine végétale (végétaux autre que l'huile d'Olive). La capacité de production du pays en graines ou fruits oléagineux est d'environ 20 000 tonnes par an soit 10% à peine des besoins nationaux. C'est pour cette raison qu'une politique d'introduction de nouvelles plantes oléagineuses est actuellement développée en Algérie.

Les premiers essais ont débuté en 1966 avec le Tournesol (*Helianthus annuus* L.) suivis en 1971 par le Carthame (*Carthamus tinctorius* L.), le Soja (*Glycine max.* L.) et le Colza (*Brassica napus* L.). Après plusieurs essais infructueux, tous les efforts se sont portés sur la culture du Carthame. L'introduction de cette plante présente en effet plusieurs avantages :

1°) Cette Composée est très répandue sur les hautes plaines algériennes (surtout en Oranie) où on la trouve à l'état spontané. Cette bonne adaptation de la plante à des conditions édaphiques ou climatiques difficiles la font préférer aux autres plantes oléagineuses citées ci-dessus. De plus le Carthame est tolérant à plusieurs types de sols. Grâce à ses racines pivotantes, la plante peut se développer en milieu semi-aride, sur sol profond. En revanche dans des sols peu profonds, la surface racinaire est peu développée et la productivité baisse.

2°) Les besoins en eau des plantules de Carthame en développement sont assez faibles. Des précipitations de 600 mm/an et même de 400 mm/an peuvent suffire pour assurer une bonne production. Le Carthame peut donc se développer correctement sur de grandes étendues à faibles pluviométries (zones semi-arides).

3°) La contribution des cultures de Carthame dans l'assolement est intéressante. Dans les régions semi-arides, les cultures de céréales doivent toujours être précédées d'une jachère pour permettre un bon rendement. L'introduction des cultures de Carthame dans l'assolement limite la place improductive des jachères et accroît la productivité des terres. L'assolement céréales-jachère pratiqué par les agriculteurs peut être remplacé par un assolement céréales-Carthame. Il s'avère cependant que dans le cas d'une sécheresse automnale, les parcelles de Blé venant après les cultures de Carthame donnent un Blé étioilé pendant les premiers stades végétatifs (Station d'Oum-El-Bouaghi). Dans ce cas on pourrait alterner céréales-Carthame-jachère afin de maintenir la même surface en céréales et réduire la place des jachères.

4°) La richesse en huile du Carthame est remarquable. La teneur en huile des akènes est comparable à celles du fruit d'Olivier, des graines de Tournesol ou d'Arachide (40% par rapport à la masse poids de la matière sèche). De plus, l'huile de Carthame est tout à fait recommandable pour la consommation de table : elle contient 75% d'acide linoléique, acide gras indispensable à l'homme, et présente une très faible teneur (1,8%) en acide linoléique, donc l'autoxydation à l'air est réduite (CHERIF et MAZLIAK, 1978).

Toutes ces raisons incitent à la culture du Carthame dans plusieurs régions de l'Algérie. Des ensemencements bien menés, en grandes surfaces, pourront réduire le déficit en huile du pays.

*

* *

Une étude scientifique de la production des lipides au cours du développement du Carthame, cultivé dans les conditions naturelles offertes par l'Algérie, présente donc un grand intérêt. Une telle étude pourra guider les agriculteurs dans la détermination des moments optimum de récolte, dans la mise en oeuvre des traitements divers (apports d'engrais, arrosages) pour obtenir de meilleurs rendements. Par ailleurs, les sélectionneurs pourront travailler à l'obtention des variétés intéressantes, une fois bien connues la physiologie et la biochimie générale des variétés sauvages.

Sur un plan plus fondamental, le Carthame s'est révélé un bon matériel d'étude pour la biosynthèse des acides gras polyinsaturés (SIMS *et al.*, 1961), (Mac MAHON et STUMPF, 1964, 1966), (VIJAY et STUMPF, 1971), (STYMNE et APPELQVIST, 1978), (ICHIHARA et NODA, 1980, 1982), (STOBART *et al.*, 1983), (BROWSE et SLACK, 1983), (STOBART et STYMNE, 1985). C'était, pour nous, une raison supplémentaire pour aborder, de façon approfondie, l'étude du métabolisme des lipides dans cette plante.

Le présent travail porte donc d'une part, sur la formation des réserves lipidiques au cours de la maturation des semences de Carthame et d'autre part, sur l'utilisation de ces réserves au cours de la germination. Cette dernière étude nous a permis de suivre au niveau du métabolisme la transformation des cotylédons, organe de réserve, en feuilles cotylédonnaires, organes assimilateurs ; cette transformation s'accompagne de la mise en place, dans les chloroplastes qui apparaissent, de lipides membranaires riches en acide linoléique.

Grâce à l'utilisation de précurseurs radioactifs, nous avons mis en évidence les catégories lipidiques impliquées dans la biosynthèse des acides gras polyinsaturés des chloroplastes. Dans la dernière étape de notre travail nous avons tenté de cerner, par des expériences de fractionnement cellulaire, la contribution de chaque organite dans la biosynthèse des acides gras polyinsaturés.

HISTORIQUE

A - FORMATION DES RESERVES LIPIDIQUES DANS LES GRAINES OLEAGINEUSES

Au cours de leur maturation, les graines des plantes oléagineuses s'enrichissent considérablement en lipides. L'accumulation de ces lipides de réserve dans les différentes espèces a fait l'objet de plusieurs travaux : études sur le Carthame (SIMS *et al.*, 1961), le Colza (APPELQVIST, 1975), (CHERIF, 1975), le Lin (CHERIF et MAZLIAK, 1978), le Tournesol (TRIKI, 1981 ; MONGA *et al.*, 1983).

L'accumulation des lipides suit la même cinétique dans toutes les espèces. On distingue en général trois phases dans cette accumulation. La première phase est une période de latence où la synthèse des lipides est faible. Les cotylédons des graines renferment alors très peu de lipides. Durant cette phase de latence, les tissus sont probablement dépourvus d'enzymes intervenant dans la lipogénèse.

La deuxième phase est caractérisée par une synthèse active des lipides neutres et plus particulièrement des triacylglycérols (TAG).

La phase finale est une période où la synthèse lipidique diminue ; ce ralentissement des synthèses coïncide avec la deshydratation des graines. Bien des points demeurent obscurs cependant quant aux mécanismes de synthèse et aux organites cellulaires intervenant dans la formation des TAG.

Grâce aux études au microscope électronique effectuées sur des graines mûres, on sait que les lipides sont contenus dans les "oléosomes" (GURR, 1980). Les oléosomes sont des amas, généralement sphériques, de TAG entourés d'une enveloppe constituée de phospholipides. Plusieurs hypothèses ont été émises concernant l'origine des oléosomes. D'après les travaux de WANNER *et al.* (1981), les oléosomes dérivent de la membrane du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe du plaste.

Dans les akènes de Carthame en développement, plusieurs travaux réalisés "*in vitro*" ont montré que les microsomes sont impliqués dans la désaturation de l'oléyl-CoA. Le linoléate produit est incorporé dans la phosphatidylcholine servant de précurseur pour la synthèse des TAG : STYMNE et APPELQVIST, 1978 ; SLACK *et al.*, 1979 ; BROWSE et SLACK, 1983 ; STYMNE *et al.*, 1983 ; STOBART *et al.*, 1983 ; STOBART *et al.* 1985 ; STYMNE *et al.*, 1984a). Ces résultats indiquent qu'à l'origine l'oléosome est lié au réticulum endoplasmique. La séparation a lieu quand l'oléosome est surchargé en TAG.

Les mécanismes de biosynthèse des TAG commencent à être élucidés. Trois voies biochimiques ont été proposées.

1°) La synthèse des TAG dans les graines oléagineuses se réaliserait de la même façon que chez les animaux, selon la voie décrite par KENNEDY (1961). Cette voie est résumée par le schéma I :

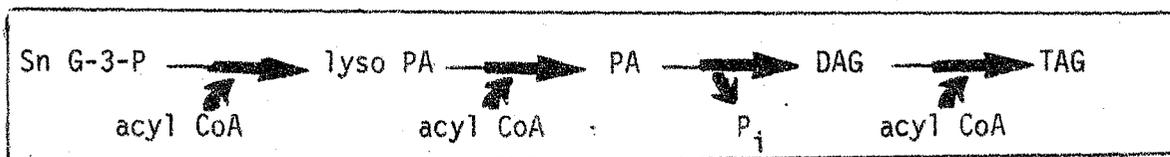


Schéma I - Synthèse des triacylglycérols selon la voie classique.

2°) La deuxième voie de biosynthèse a été proposée récemment par ROUGHAN et SLACK (1982), SLACK *et al.* (1979). En utilisant les cotylédons de Lin, Soja et Carthame en présence de $[2-^3\text{H}]$ -glycérol et de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate, ces auteurs ont montré que les précurseurs sont incorporés d'abord dans la PC, puis dans les DAG et TAG. leurs résultats suggèrent que les DAG proviennent du PC plutôt que de PA. Ces résultats furent confirmés par les travaux de STYMNE et APPELQVIST (1978), APPELQVIST (1980), après utilisation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate sur les microsomes des cotylédons de Carthame. Le schéma II illustre la voie proposée par les auteurs précédents :

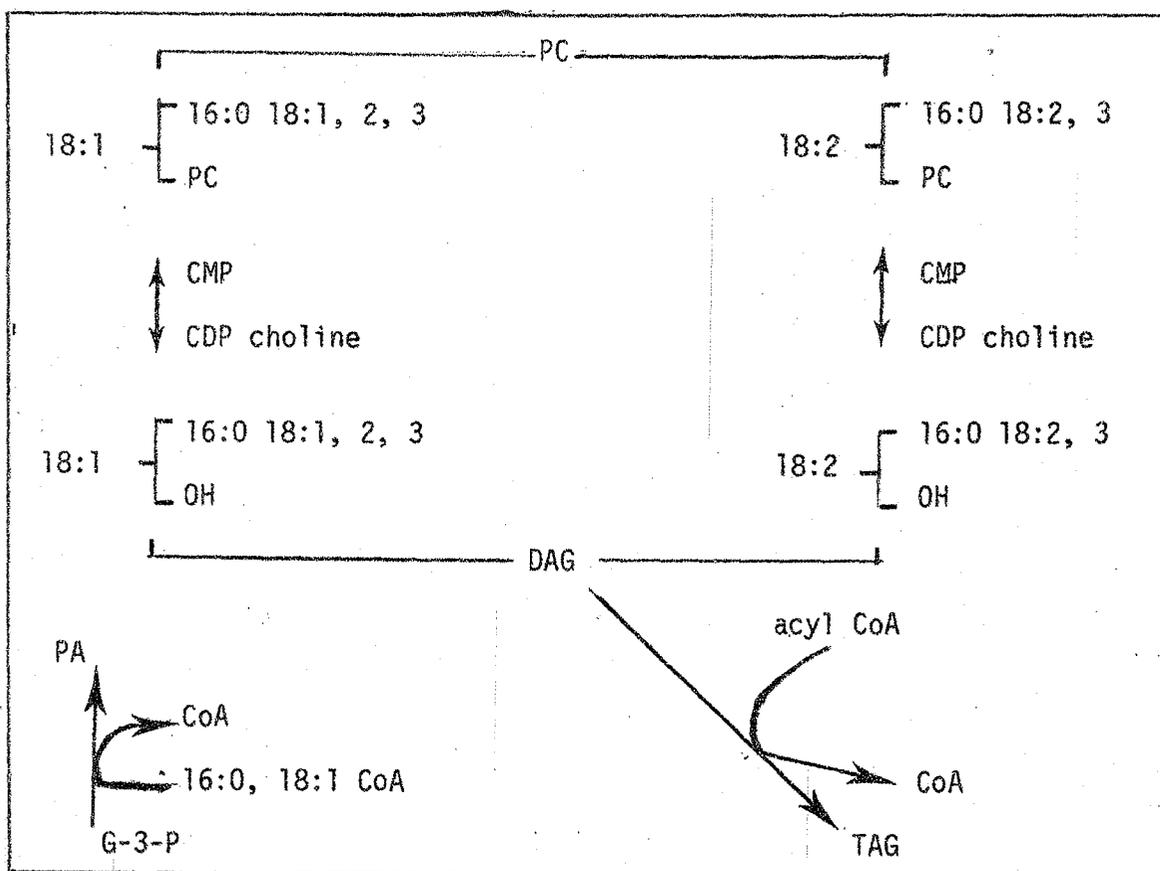
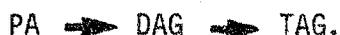


Schéma II - Synthèse des triacylglycérols selon la voie proposée par ROUGHAN et SLACK (1982).

D'après les travaux très récents de STYMNE *et al.* (1983), STOBART *et al.* (1983), STYMNE et STOBART (1984^b, 1985), la synthèse des TAG dans les cotylédons de Carthame se fait principalement selon la voie de KENNEDY. En mettant en incubation des microsomes de Carthame en présence de Sn glycérol-3-P et de

[1-¹⁴C]-oléate ils ont montré que :

- l'oléate de l'oléoyl-CoA est sélectivement transféré en position 2 du PC
- l'oléoyl-PC est désaturé en linoléoyl-PC
- le linoléate nouvellement formé est transformé en acyl-CoA
- finalement se produirait une acylation du Sn glycérol-3-P avec formation d'acide phosphatidique, puis on aurait la chaîne finale de réactions :



Le schéma proposé par STOBART et STYMNE (1985) est le suivant (schéma III) :

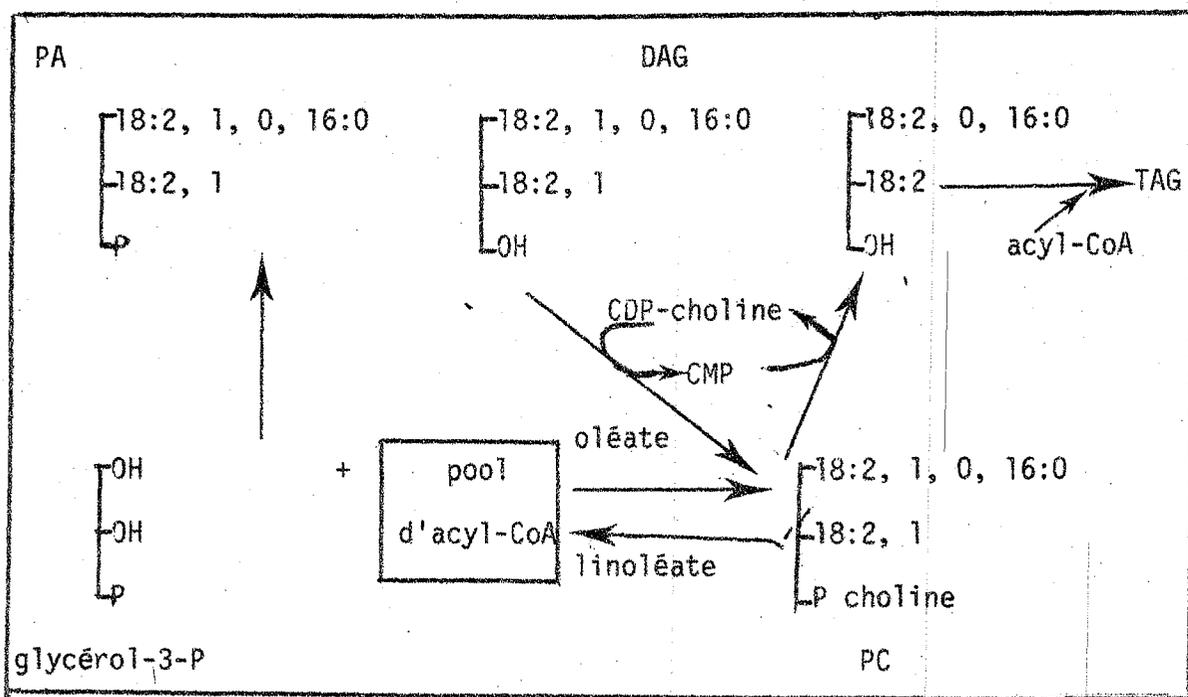


Schéma III - Voie de biosynthèse des triacylglycérols selon STOBART et STYMNE (1985), STYMNE et STOBART (1985)

Ces auteurs ont montré en outre que :

- l'équilibre entre les DAG et le PC est dû à la cytidine 5'diphosphate diacylglycérol choline phosphotransférase (SLACK *et al.*, 1983)

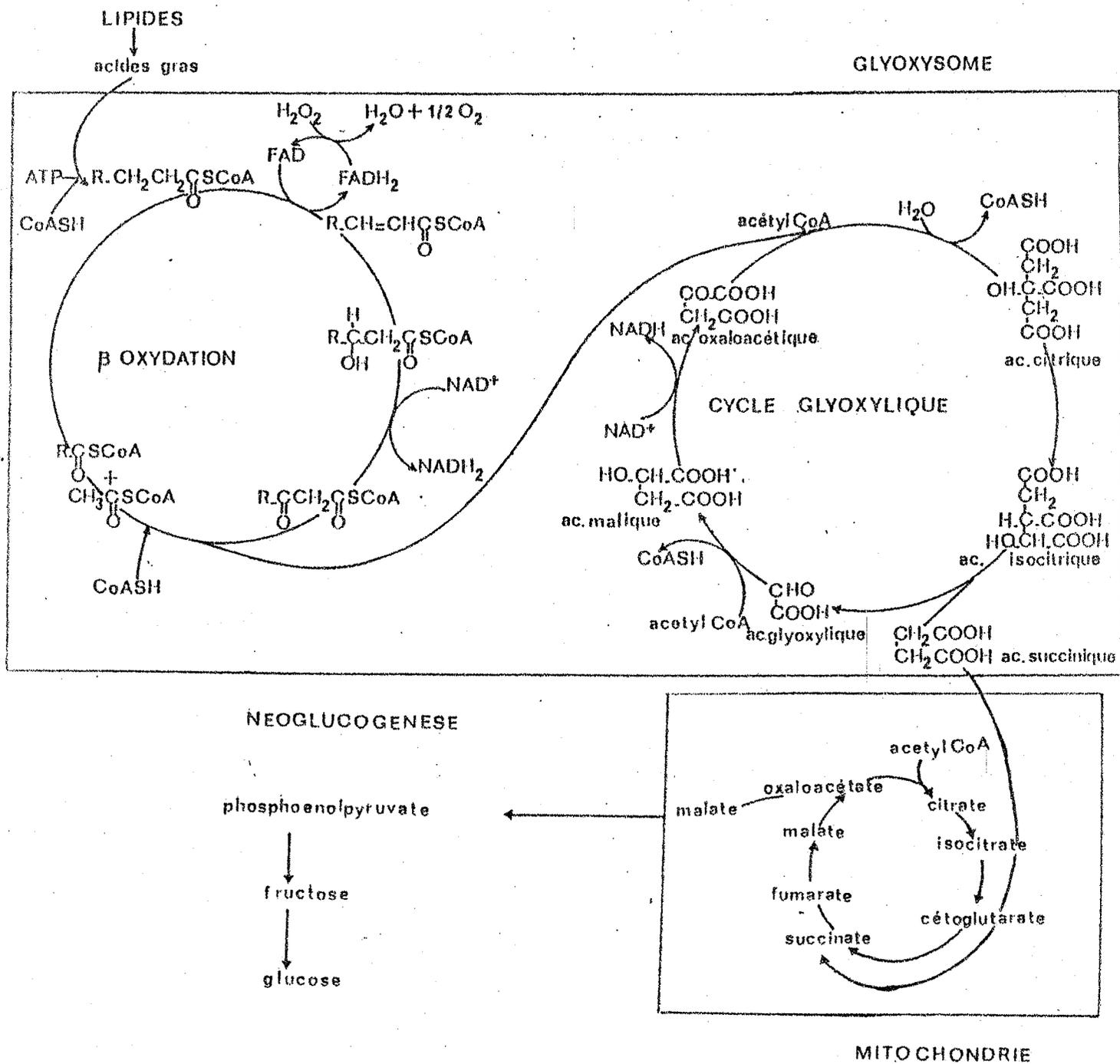


Schéma IV - Conversion des réserves lipidiques en glucides dans les graines oléagineuses (d'après BEEVERS, 1980 ; MAZLIAK et TCHANG, 1983).

- l'échange entre les acyl-CoA et le PC est catalysé par la lysophosphatidylcholine acyl transférase. Cette réaction enzymatique est également réversible (STYMNE et STOBART, 1984a).

B - UTILISATION DES RESERVES LIPIDIQUES DANS LES PLANTES OLEAGINEUSES

Les réserves lipidiques stockées dans les graines oléagineuses sont activement hydrolysées au moment de la germination. Les produits d'hydrolyse sont soit oxydés pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance de la plantule, soit transformés en glucides au niveau de l'embryon. La néoglucogénèse nécessite l'intervention de plusieurs organites cellulaires : oléosomes, glyoxysomes, mitochondries et enzymes solubles cytoplasmiques.

1 - Hydrolyse des réserves

La majeure partie des réserves lipidiques est dégradée pendant les cinq premiers jours de la germination. Cette dégradation est l'oeuvre des lipases présentes dans les cotylédons. Dans l'albumen des graines de Ricin on a pu mettre en évidence deux lipases actives : une lipase acide associée aux oléosomes hydrolysant les tri- et diacylglycérols avec un maximum d'activité au 2ème jour de la germination et une lipase alcaline hydrolysant les monoacylglycérols. Cette enzyme serait liée aux glyoxysomes (MUTO et BEEVERS, 1974). Dans le cas des autres espèces étudiées, une seule lipase alcaline a été détectée.

2 - Le cycle glyoxylique

Les produits de la lipolyse ne s'accumulent pas dans les graines. Les travaux de BEEVERS (1980) dans l'albumen de Ricin montrent qu'ils sont transformés en succinate dans des organites spécialisés, les glyoxysomes, par les enzymes de la β oxydation puis celles du cycle glyoxylique. Les mitochondries interviennent dans la transformation du succinate en malate. Une partie du malate est repris dans le cycle de Krebs et sert de substrat pour les oxydations terminales. L'autre partie est convertie en glucose par les enzymes solubles du cytoplasme. La transformation des lipides en sucres a donc lieu dans des compartiments différents ; elle est facilitée par la proximité des organites cellulaires. La coopération entre organites implique le transport des métabolites d'un compartiment à un autre. Jusqu'à présent les mécanismes de ce transport ne sont pas connus. Les différentes étapes sont résumées dans le schéma IV :

3 - METABOLISME DES LIPIDES DANS LES FEUILLES

Lors de la croissance des plantules de Carthame les cotylédons sont portés par l'hypocotyle. Sous l'effet de la lumière ils verdissent et se transforment en feuilles. Les étiochloroplastes se transforment en chloroplastes.

Les lipides majeurs des tissus chlorophylliens sont les galactolipides riches en acide gras tri-insaturés (l'acide linoléique, $C_{18:3}$). Le mécanisme de biosynthèse des acides gras polyinsaturés commence à être assez bien connu. Deux voies de biosynthèse ont été proposées :

1°) HARRIS et JAMES (1965), TREMOLIERES et MAZLIAK (1974), MAZLIAK (1980) ont montré que l'acide α linoléique ($C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$) se forme après désaturation successives de l'acide linoléique ($C_{18:2}^{\Delta 9,12}$) et de l'acide oléique ($C_{18:1}^{\Delta 9}$).

2°) d'après les travaux de JACOBSON *et al.*, (1973 a, b), KANNANGARA *et al.* (1973), MURPHY et STUMPF (1979 b) réalisés dans le chloroplaste d'Epinard, la synthèse de l'acide linoléique pourrait aussi se faire par élongation de l'acide hexadécatriénoïque ($C_{16:3}^{cis\Delta 7,10,13}$) provenant d'un acide gras tri-insaturé à courte chaîne ($C_{12:3}$). Cependant le mécanisme de la désaturation n'est pas encore démontré et les auteurs de cette hypothèse l'ont pratiquement retirée en 1980 (STUMPF, ¹⁹⁸⁰HAWKE et STUMPF, 1980).

A la suite de nombreux travaux réalisés *in vivo* et *in vitro*, il est admis aujourd'hui que la synthèse des acides gras commence dans le chloroplaste (OHLROGGE *et al.*, 1979 ; MOORE, 1982).

Les acides gras saturés sont synthétisés grâce à l'acide gras synthétase constituée de plusieurs enzymes solubles dans le stroma du chloroplaste. A partir de l'acétyl-ACP et de malonyl-ACP, le palmitoyl-ACP est formé. A cette étape, deux réactions peuvent se produire :

1) l'acide palmitique ($C_{16:0}$) est libéré grâce à une acyl-ACP hydrolase et intégré aux lipides endogènes du chloroplaste.

2) le palmitoyl-ACP en présence d'un malonyl-ACP et d'une élongase donne le stéaroyl-ACP.

1ère étape de désaturation

Le stéaroyl-ACP est désaturé en oléoyl-ACP ($C_{18:0} \rightarrow C_{18:1}^{\Delta 9}$) grâce à la stéaroyl-ACP désaturase, enzyme soluble, présente dans le stroma du chloroplaste des tissus photosynthétiques (NAGAI et BLOCH, 1968 ; JAWORSKI et STUMPF, 1974), ainsi que dans les plastes des tissus non photosynthétiques

(WEAIRE et KEKWICK, 1975). Trois protéines participent en fonctionnement de ce système de désaturation : la NADH-ferredoxine réductase, la ferredoxine et la désaturase. Le NADPH et l'oxygène sont indispensables au fonctionnement du système.

2ème étape de désaturation : ($C_{18:1}^{\Delta 9} \rightarrow C_{18:2}^{\Delta 9,12}$).

Quel que soit le matériel végétal utilisé : Pomme de terre (BEN ABDELKADER *et al.*, 1973), Carthame (VIJAY et STUMPF, 1971) ou feuille de Pois (DUBACQ *et al.*, 1976), la désaturation de l'acide oléique a lieu *in vitro* dans les microsomes (culot de centrifugation rassemblant les membranes du réticulum endoplasmique, des fragments de tonoplaste, golgi, plasmalemma, etc...). Cette désaturase est due à un système enzymatique membranaire lié principalement sinon exclusivement au réticulum endoplasmique.

Ce système enzymatique est constituée d'au moins trois protéines : la NADH oxydase, le cytochrome b_5 et la désaturase. Comme dans le cas de la première désaturase, le NADH et l'oxygène sont nécessaires à son fonctionnement (MAZLIAK, 1980). Il est admis aujourd'hui que le substrat réel de la désaturase est la molécule d'oléoyl-phosphatidylcholine. Quand les microsomes sont incubés en présence d'oléoyl-CoA, le précurseur est incorporé dans la phosphatidylcholine et l'oléoyl-PC est désaturé en linoléoyl-PC (DUBACQ *et al.*, 1976 ; STYMNE et APPELQVIST, 1978 ; SLACK *et al.*, 1979).

3ème étape de désaturation ($C_{18:2}^{\Delta 9,12} \rightarrow C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$).

Cette dernière étape est la moins bien connue. La linoléoyl-désaturase exige les mêmes cofacteurs que les deux premiers systèmes enzymatiques mais son site cellulaire d'action est mal défini. Les études effectuées *in vivo* avec du $^{14}CO_2$ et du $[1-^{14}C]$ -oléate comme précurseurs montrent que la désaturation du linoléate a lieu dans les microsomes, puis que le linoléate formé est ensuite transféré dans les galactolipides du chloroplaste (WILLIAMS *et al.*, 1976 ; ROUGHAN *et al.*, 1979b ; STOBART *et al.*, 1980 ; BROWSE et SLACK, 1981). En revanche, les études *in vivo* réalisées avec du $[1-^{14}C]$ -acétate comme précurseur montrent que la désaturation du linoléate pourrait se faire directement dans les galactolipides (BOLTON et HARWOOD, 1978 ; OHNISHI et YAMADA, 1982).

D'un autre côté, les études *in vitro* sont en faveur d'une coopération entre différentes fractions cellulaires pour la synthèse de l'acide linoléique des plastes (TREMOLIERES *et al.*, 1980 ; OHNISHI et YAMADA, 1980 ; DRAPIER *et al.*, 1982 ; DUBACQ *et al.*, 1984).

Dans l'hypothèse de la coopération nécessaire entre compartiments cellulaires, les étapes de la biosynthèse de l'acide linoléique se résument de la façon suivante :

1. A partir de l'acétate, le chloroplaste synthétise les acides gras saturés tel que le palmitoyl-ACP et le stéaryl-ACP. La première désaturation se fait également dans cet organite cellulaire.
2. L'oléoyl-ACP est hydrolysé et l'acide oléique est transformé en oléoyl-CoA par l'enveloppe du chloroplaste (JOYARD et DOUCE, 1977), puis exporté dans le cytoplasme.
3. L'oléoyl-CoA est désaturé dans le réticulum endoplasmique et se trouve sous la forme de linoléoyl phosphatidylcholine.
4. La linoléoyl phosphatidylcholine est
 - a) soit désaturée dans le réticulum endoplasmique et la linoléoyl-PC produite est transférée au chloroplaste
 - b) alternativement, la linoléoyl-PC serait transférée dans le chloroplaste et désaturée en linoléoyl-PC ; le reste "diacylglycérol" de cette molécule est alors intégré dans une molécule de galactolipide (MGDG). On peut aussi supposer que la désaturation du linoléate en linoléate se produit dans une autre molécule que la PC : soit les DAG ou le MGDG. Les sites cellulaires distincts de synthèse et de désaturation qui interviennent supposent l'existence d'une protéine de transfert des phospholipides facilitant les mouvements de lipides entre organites et la biosynthèse des acides gras polyinsaturés (JULIENNE *et al.*, 1981 ; YAMADA et OHNISHI, 1982).

On constate donc un certain désaccord entre les conclusions tirées des études *in vivo* d'un côté (BOLTON et HARWOOD, 1978) et celles tirées des essais *in vitro*. Par ailleurs les auteurs ne s'accordent pas sur la nature des molécules (phospho- ou galactolipides) servant de support à la désaturation du linoléate en linoléate. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de reprendre l'étude des mécanismes de biosynthèse des acides gras polyinsaturés dans les feuilles cotylédonnaires de Carthame exposées à la lumière.

CHAPITRE I

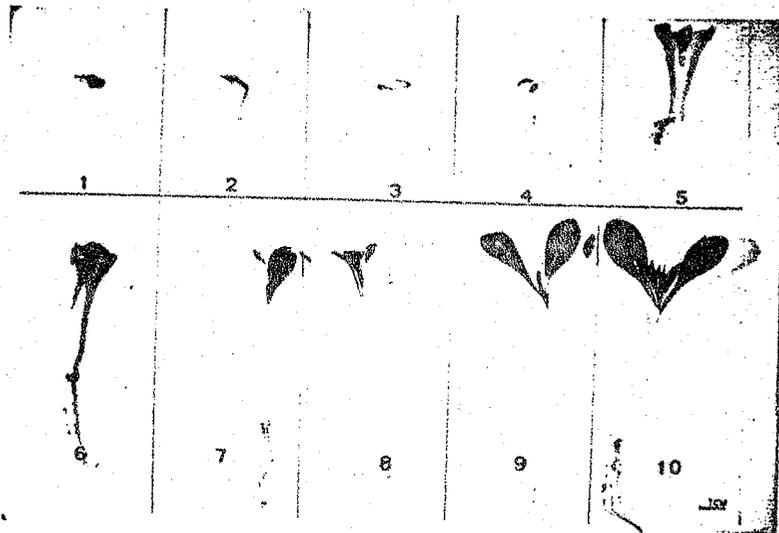


FIGURE 1 - Diagramme illustrant la germination des graines et la croissance des plantules de Carthame

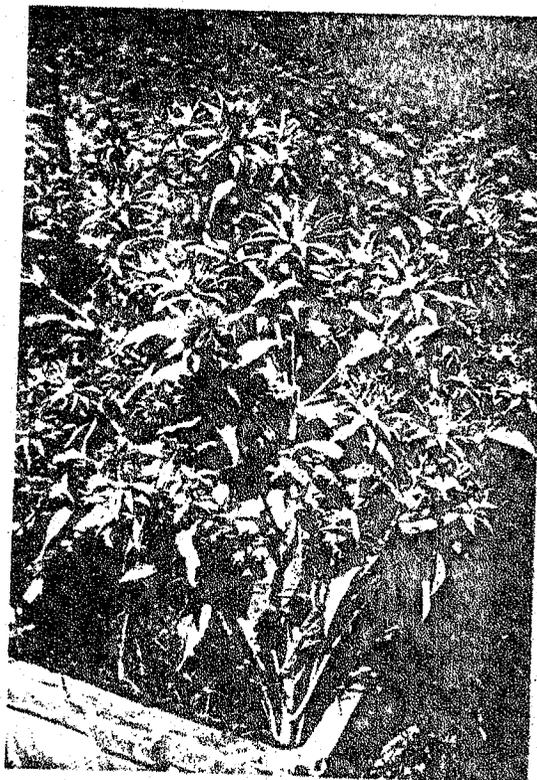


FIGURE 2 - Capitules de Carthame

MATERIEL ET METHODES

A - UTILISATION DU MATERIEL VEGETAL

1 - Matériel végétal

Les akènes de Carthame (*Carthamus tinctorius* L., variété S 400) utilisées proviennent de la station agronomique d'El Khemis (Algérie).

2 - Conditions de germination

Les semences sont mises à imbiber pendant toute une nuit sous eau courante puis à germer dans de la vermiculite à la température de 27°C à l'obscurité. Les bacs sont recouverts d'une feuille de papier d'aluminium afin de maintenir une humidité constante. Au 4ème jour, les bacs sont placés dans une pièce de culture réglée dans les conditions suivantes : éclairement : 10 heures en lumière blanche ($12 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$) à la température de 25°C, 14 heures d'obscurité à la température de 20°C.

3 - Sélection des plantules

Afin d'avoir le même stade physiologique, les plantules retenues pour les différentes analyses sont sélectionnées suivant la longueur de la radicule (aux premières heures de la croissance) puis suivant la longueur de l'hypocotyle. Les stades suivants sont ainsi retenus : jour 2 : radicule 7 mm ; jour 3 : hypocotyle 2 à 3 mm ; jour 4 : 10 mm ; jour 5 : 14 à 16 mm ; jour 6 : 21 mm ; jour 7 : 27 mm ; jour 8 : 33 mm ; jour 9 : 40 à 42 mm ; jour 10 : 43 à 45 mm (Fig. 1).

4 - Culture en champ et floraison

Les graines de Carthame plantées en Janvier donnent leurs récoltes au mois de Juin. Les plants adultes de Carthame portent 17 à 25 capitules. Le prélèvement des akènes est effectué toutes les semaines depuis le début de la floraison jusqu'à la maturation complète (Fig. 2).

5 - Préparation des organites cellulaires

a - Chloroplastes

Les chloroplastes sont préparés selon la technique de MILLS et JOY (1980). La composition du milieu de broyage est la suivante :

Tricine (N-tris (hydroxyméthyl) méthylglycine) 50 mM, sorbitol 330 mM, EDTA disodique 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA 0,1%. Le pH est ajusté à 7,9 avec de la potasse 6 N. Le chlorhydrate de cystéine 1 mM est dissous avant le broyage. Les feuilles cotylédonnaires sont broyées à la température de 4°C à l'aide d'un mixer pendant 5 secondes à la vitesse maximale. Le volume du milieu de broyage représente le double de la masse du matériel végétal. Le broyat est filtré sur quatre épaisseurs de gaze qui sont fortement pressées, puis sur deux couches de tissu miracloth (Chicopee Mills inc. USA).

Le broyat est déposé avec précaution dans des tubes de centrifugation contenant 14 ml de milieu additionné de percoll (solution de silice complexée à du polyvinylpyrrolidone). La composition de ce milieu est la suivante : Percoll 40 ml, tricine 50 mM, sorbitol 330 mM, BSA 0,1%. La solution est ajusté à pH 7,9 à l'aide de la potasse 6 N. On complète à 100 ml avec de l'eau distillée.

Après centrifugation à $2\ 500 \times g$ pendant 2 mn 20 s, les chloroplastes intacts franchissent la barrière de percoll. Le surnageant contenant les chloroplastes brisés, est jeté et les parois du tube essuyées soigneusement. Le culot de chloroplastes intacts est remis en suspension dans le milieu d'incubation de composition suivante : Hepes 25 mM, sorbitol 330 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, EDTA (disodique) 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $MnCl_2$ 1 mM, DTT 0,5 mM, KH_2PO_4 0,3 mM. Le pH est ajusté à 7,9 avec de la soude 6 N (ROUGHAN *et al.*, 1979a).

b - Microsomes

Les cotylédons sont broyés doucement au mortier avec du milieu de broyage de composition suivante : Tris 100 mM, saccharose 400 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA 0,1%. Le pH est ajusté à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique. Le chlorhydrate de cystéine (3 mM) est ajouté juste avant le broyage (DUBACQ *et al.*, 1976).

Le broyat est filtré à travers deux couches de tissu miracloth, puis soumis à une centrifugation différentielle :

- une 1ère centrifugation à $3000 \times g$ pendant 5 mn, donnant le culot de plastides
- une deuxième centrifugation du surnageant à $25\ 000 \times g$ pendant 20 mn donnant le culot mitochondrial

- une troisième centrifugation du surnageant post-mitochondrial à $100\ 000 \times g$ pendant 60 mn donnant le culot de microsomes. En fait, cette fraction est composée de vésicules dérivant de plusieurs types de membranes : réticulum endoplasmique, plasmalemme, appareil de golgi, les enveloppes de chloroplastes cassés ainsi que les thylakoïdes.

Le culot microsomal est remis en suspension dans un milieu d'incubation identique à celui du milieu d'incubation des chloroplastes, puis homogénéisé à l'aide d'un appareil de potter.

6 - Utilisation des précurseurs radioactifs

a - Choix des précurseurs

- L' [$1-^{14}C$]-acétate de sodium (54 mCi/mM) (C.E.A., France), précurseur des acides gras permet de suivre la formation de toutes les chaînes aliphatiques.
- L'acide [$1-^{14}C$]-oléique (56 mCi/mM) et l'acide [$1-^{14}C$]-linoléique permettent de suivre la biosynthèse des acides gras polyinsaturés et l'incorporation de ces acides gras dans les différentes catégories lipidiques. Ces acides sont fournis à la plante sous forme de sels d'ammonium synthétisés de la manière suivante : à 1 mM de précurseur radioactif sont ajoutés 4 ml d'éther éthylique ammoniacal (obtenu par barbotage pendant 1 minute de gaz ammoniacal maintenu dans la glace. Le mélange est asséché sous azote puis repris dans un volume défini de tampon tris-HCl pH 8,0.

L' [$1-^{14}C$]-oléoyl CoA (6 mCi/mM) est fourni par Amersham, USA. L' [$1-^{14}C$]-linoléoyl-CoA (10 mCi/mM) est préparé au laboratoire selon la méthode de GOLDAM et VAGELOS (1961). Ces précurseurs sont utilisés comme substrat de l'oléoyl et linoléoyl désaturases dans les expériences *in vitro*.

b - Au niveau de la plante entière

Avant d'être transplantées dans des fioles contenant de l'eau distillée, les plantules sont trempées dans une solution de gel de silice (5 mg pour 10 ml d'eau distillée). En séchant, les cotylédons cireux sont recouverts d'un léger film de silice permettant la rétention des précurseurs et leur incorporation dans les tissus.

Les différents précurseurs [$1-^{14}C$]-acétate de Na^+ , [$1-^{14}C$]-oléate et [$1-^{14}C$]-linoléate de NH_4) sont déposés en microgouttes (à l'aide d'une seringue) sur les cotylédons.

Deux expériences ont été réalisées.

1 - Après des temps différents de marquage (30 min, 1 heure, 1,5 heure, 2 heures, 3 heures et 24 heures), les cotylédons sont rincés abondamment à l'eau distillée, détachés de l'hypocotyle et mis dans de l'eau bouillante. L'ébullition est maintenue pendant 5 à 10 minutes afin de stopper toute réaction enzymatique.

Après refroidissement dans de la glace pilée, les tissus sont broyés à l'aide d'un Ultra Turrax et l'extraction des lipides est effectuée.

2 - Le $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate d'ammonium est déposé dans les mêmes conditions que précédemment sur les cotylédons. Après 3 heures de marquage, les cotylédons sont broyés dans un mortier, à 0°C, avec du milieu de broyage utilisé pour la préparation des microsomes (voir paragraphe 5 b). Le broyat est filtré à travers 2 couches de miracloth, puis soumis à quatre centrifugation : une centrifugation à $120 \times g$ pendant 2 mn afin d'éliminer tous les débris cellulaires ; une centrifugation à $3\ 000 \times g$ pendant 5 mn nous permet de récupérer la fraction chloroplastique ; une centrifugation à $20\ 000 \times g$ pendant 20 mn nous donne le culot mitochondrial et une dernière centrifugation à $100\ 000 \times g$ pendant 1 heure, le culot des microsomes.

Les culots obtenus sont remis en suspension dans 1 ml de milieu d'incubation et l'extraction des lipides est réalisée aussitôt.

c - Au niveau des microsomes

La suspension microsomale (400 à 600 μg de protéines) est mise à incuber en présence de 2,5 mg de BSA (1 g/l), de MgCl_2 (24 nM), de NADH (1 mM) et de 3,2 nmoles de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl CoA. Le volume final est de 250 μl . L'incubation s'effectue à 25°C avec agitation constante (100 cycles/minute). La réaction est arrêtée par l'extraction lipidique. L'incubation en présence de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléoyl-CoA se déroule de la même manière.

d - Au niveau des chloroplastes

La suspension de chloroplastes (250-300 μg de chlorophylles) est mise à incuber en présence de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl CoA ou $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléoyl-CoA, d'ATP (1 mM), de CoA (1 mM), du G-3-P 1 mM, et dans certains essais d'UDP-gal (1 mM). Le volume final est ajusté à 0,25 ml avec le milieu d'incubation. Les incubations ont lieu dans un bain marie agité et éclairé, température de l'eau 25°C, vitesse d'agitation 100 cycles/minute, éclairage composé de 14 lampes Ersas de 40 W.

A la fin de l'incubation, le milieu est complété à 1 ml et l'extraction des lipides est effectuée.

B - METHODES DE DOSAGE

1 - Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux s'effectue selon la méthode de BLIGH et DYER (1959).

a - A partir des tissus

Le matériel végétal (environ 1 g) est broyé rapidement dans 10 ml de méthanol, 10 ml de chloroforme et 5 ml d'eau de fixation (ayant servi à ébouillanter les plantules). Après centrifugation à $5\ 000 \times g$ pendant 10 mn, la couche inférieure chloroformique est prélevée. Après évaporation totale du solvant, le résidu sec est repris dans une quantité connue de chloroforme si les analyses sont faites immédiatement ou conservé dans un mélange benzène/éthanol (4/1, V/V) à -20°C dans un tube fermé sous azote.

b - A partir des suspensions d'organites

Les fractions cellulaires (chloroplastes, mitochondries ou microsomes) sont fixées à l'aide de 2 ml de méthanol froid. Après agitation, sont ajoutés successivement 2 fois 1 ml de chloroforme froid et 1 ml d'eau salée (1% NaCl : M/V). Chaque addition est suivie d'une homogénéisation au vortex. Après centrifugation à $2\ 000 \times g$ pendant 10 mn, la phase inférieure chloroformique contenant les lipides est prélevée, asséchée et reprise comme précédemment dans un volume connu de chloroforme.

2 - Extraction et méthylation des acides gras totaux

Les acides gras totaux sont préparés et méthylés selon la méthode de CARREAU et DUBACQ (1978). Une partie aliquote de l'extrait lipidique (50 μl) est prélevée et asséchée sous azote en même temps que le témoin interne : l'acide heptadécanoïque ($\text{C}_{17:0}$). On ajoute successivement 0,2 ml de méthylate de sodium et 0,2 ml de méthanol-HCl. Après chaque addition le tube est homogénéisé et placé à 50°C pendant 3 minutes. Après refroidissement, les esters méthyliques sont extraits par un mélange pentane-eau (10/1, V/V). La phase pentanique est prélevée, séchée sous azote et le résidu sec est repris dans un volume connu de méthanol.

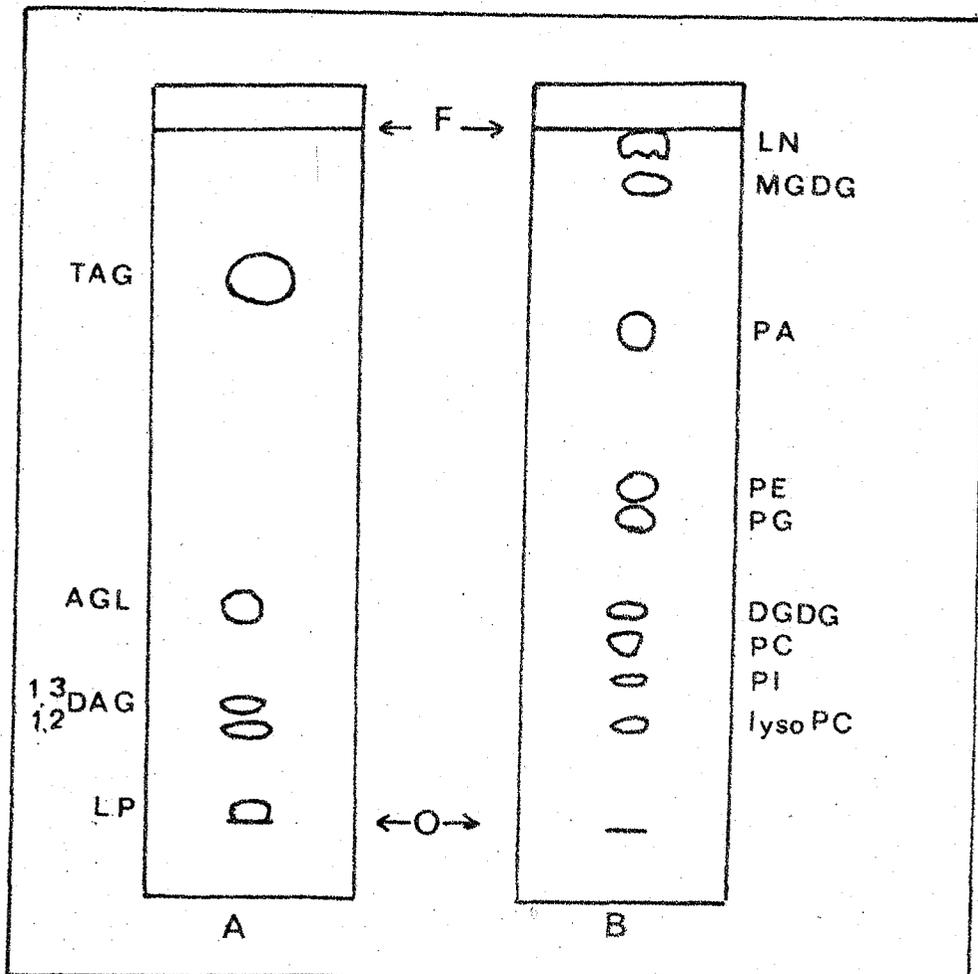


FIGURE 3 - Séparation de lipides de Carthame par chromatographie sur couche mince.

A - Séparation des lipides neutres

B - Séparation des lipides polaires

3 - Séparation des catégories lipidiques

a - Adsorption sur gel de silice

L'étude des lipides polaires, dans les premiers stades de la germination, s'est révélée difficile à cause de la richesse en lipides neutres des cotylédons. Il nous a fallu séparer les catégories lipidiques selon la méthode de HORSTEIN *et al.* (1967).

La solution lipidique est asséchée sous courant d'azote et reprise avec 2 ml d'éther sulfurique. Après addition de 0,6 g de silice préalablement activée à 110°C, on centrifuge à 20 000 x *g* pendant 10 mn. Le surnageant contient les lipides neutres et au culot de silice sont fixés les lipides polaires. Le culot est lavé plusieurs fois à l'éther de pétrole et les surnageants récupérés après centrifugation.

Le culot est repris avec 2 ml de méthanol lavé trois fois et centrifugé. Le surnageant final contient les lipides polaires. Après évaporation, les deux fractions sont reprises dans un volume connu de chloroforme ou dans un mélange toluène-éthanol (4/1, V/V).

b - Chromatographie sur couche mince

La séparation des catégories lipidiques et des lipides polaires s'effectue par chromatographie sur couche mince (0,25 mm de gel de silice étalé sur plaque de verre). L'extrait lipidique est déposé au bas de la plaque sous courant d'azote afin de prévenir toutes réactions d'oxydation.

- Séparation des lipides non polaires

La séparation est réalisée selon la technique de MANGOLD (1961-1964) (Fig. 3 A). La phase mobile est constituée par le mélange de solvants suivant : éther de pétrole - éther éthylique - acide acétique (70/30/0,4, V/V). En fin de migration, la plaque est séchée et les lipides sont relevés par pulvérisation de révélateurs (voir paragraphe suivant). La lecture se fait sous ultra-violets ($\lambda = 280$ nm) et les spots identifiés selon le Rf des témoins.

- Séparation des lipides polaires

La technique utilisée est celle de LEPAGE (1967) (Fig. 3 B). Le développement est réalisé dans un mélange suivant : chloroforme, acétone, méthanol, acide acétique, eau : 50/20/10/10/5/, V/V). Les différents lipides sont identifiés par pulvérisations de révélateurs spécifiques.

- Révélation des lipides

- Vapeur d'iode : la plaque est plongée dans une cuve hermétiquement fermée dont l'atmosphère est saturée de vapeurs d'iode. Les lipides apparaissent sous forme de taches jaunes.

- Primuline (WRIGHT, 1971). La solution (10 mg de primuline dissous dans 100 ml d'acétone/eau, 80/20) est pulvérisée sur la plaque. La lecture se fait sous U.V. Les lipides apparaissent en bleu.

- α naphtol : la pulvérisation de la solution α naphtol (0,5 g α naphtol dissous dans 100 ml de méthanol eau 50/50, V/V), suivie d'une pulvérisation de mélange d'acide sulfurique/eau 50/50, V/V) révèle les galactolipides qui apparaissent en violet et le sulfolipide en rose.

- ninhydrine : 0,2 g de ninhydrine sont dissous dans 100 ml d'acétone. Après séchage à l'étuve à 110°C, la phosphatidyléthanolamine (groupement amine) apparaît en rose.

- Réactif de Dragendorff : le réactif est constitué de 2 solutions.
Solution I : 17 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 100 ml d'acide acétique/eau (80/20, V/V).

Solution II : 40 g de KI sont dissous dans 100 ml d'eau.

La Solution à pulvériser est constituée de 4 ml de solution I, de 1 ml de la solution II et de 14 ml d'eau. La phosphatidylcholine apparaît en orange.

- Réactif de zinzadze : le réactif est constitué de 2 solutions.
Solution I : 40,11 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{Mo}_2\text{O}_7$ sont ajoutés à 1 l de H_2SO_4 25 N.
Solution II : 1,78 g de molybdate sont dissous dans 500 ml de la solution I.
La solution à pulvériser est constituée de 1 volume de la solution I et 1 volume de la solution II. Après rinçage de la plaque (par pulvérisation d'eau distillée), les phospholipides apparaissent en bleu.

4 - Extraction et méthylation des acides gras des catégories lipidiques

Après révélation des spots à l'aide de la primuline, les lipides adsorbés sur la silice sont grattés et élués par 5 ml d'un mélange chloroforme-méthanol (2/1, V/V). Après 1 heure d'éluion à la température de 4°C, 1 ml d'eau est ajouté. Après homogénéisation, deux phases se forment. La phase inférieure contenant les lipides est prélevée et évaporée sous azote (SIEBERTS et HEINZ, 1977). Les esters méthyliques des acides gras sont préparés selon la technique de CARREAU et DUBACQ (paragraphe 2).

5 - Analyse des acides gras

a - chromatographie en phase gazeuse

L'analyse des esters méthyliques des acides gras est réalisée sur un chromatographe Girdel sur colonne capillaire de 30 m de longueur et 0,33 mm de diamètre. La phase stationnaire est le polyéthylène glycol. Le gaz vecteur est l'hélium fourni à la pression de 0,4 bar. La température du four est fixée à 180°C. La détection se fait par ionisation de flamme. La surface des pics d'esters méthyliques est donnée par un intégrateur relié au chromatographe. La quantité de chaque acide gras est calculée par comparaison avec l'étalon interne (C_{17:0}). On admet que le détecteur présente le même coefficient de réponse pour toutes les chaînes aliphatiques en C₁₆ et C₁₈.

b - Chromatographie sur couche mince (HULANICKA *et al.*, 1964)

Les plaques de silice sont plongées pendant 30 sec. dans une solution de nitrate d'argent 8% (80 g d'AgNO₃ dans 1 litre d'éthanol/eau (8/2; V/V)). Après séchage des plaques à la température de 100°C, les esters méthyliques sont déposés sous azote. Le développement est réalisé dans le mélange de solvants préconisé par MANGOLD (1961-1964) (éther éthylique, éther de pétrole, acide acétique (30/70/0,4, V/V)). Après migration et séchage, les acides gras sont révélés par pulvérisation à la 1-2 dichlorofluorescéine (0,2% dans de l'éthanol). La lecture se fait sous U.V.

6 - Détermination de la radioactivité

a - Des fractions lipidiques

Une partie aliquote de l'extrait lipidique est prélevée pour un comptage de la radioactivité en scintillation liquide. Le mélange scintillant a la composition suivante : 0,5% de 2,5 diméthylazazole (PPO), 0,5% de 1,4 bis (2,4-(méthyl 5 phénylozazolyl) benzène par litre de toluène (POPOP). Les échantillons sont comptés dans un appareil intertechnique (série SL 3000) possédant un standard externe pour corriger automatiquement le "quenching" dû à l'échantillon.

b - Des différentes catégories lipidiques

Après séparation des différentes classes lipidiques ou phospholipidiques par chromatographie sur couche mince, la plaque est mise en contact avec un film sensible (Kodak). Après un temps d'exposition variant entre 4 jours et 10 jours, l'autoradiographie est révélée. Les spots sont

repérés par superposition du film et de la plaque de chromatographie, puis la silice est grattée et la radioactivité est comptée par scintillation liquide comme précédemment.

c - Des différents acides gras

Après méthylation et extraction des esters méthyliques, la radioactivité est déterminée par scintillation liquide.

- Si les esters méthyliques d'acides gras sont faiblement radioactifs, ceux-ci sont séparés par chromatographie sur plaque de nitrate d'argent et la radioactivité de chaque acide gras est comptée.
- Si les esters méthyliques sont suffisamment marqués, l'analyse est effectuée par radiochromatographie en phase gazeuse (chromatographe en phase gazeuse Barber Colman-nuclear, Chicago). Les acides gras sont séparés sur une colonne de 3 m de longueur et diamètre 1/4 de pouce. La phase stationnaire est le butane-diol succinate (15%) sur un support chromosorb traité à l'hexaméthylidisilézane (60 à 80 mesh). La phase mobile est l'argon et la température du four est de 190°C. Les acides gras sont séparés en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée d'une part et en fonction du degré d'insaturation de cette chaîne d'autre part. A la sortie de la colonne se trouve un diviseur.
- 1/10ème du courant gazeux est dirigé vers un détecteur à ionisation de flamme. L'enregistrement graphique permet d'identifier et de calculer la masse des acides gras.
- 9/10ème du courant gazeux passe dans un four à combustion contenant de l'oxyde de cuivre porté à 750°C. Les molécules de CO₂ radioactifs provenant des acides gras sont détectés par un compteur proportionnel de radioactivité. Le chromatogramme de radioactivité se superpose au chromatogramme de masse. Par triangulation, la surface des pics est calculée et le pourcentage de radioactivité de chaque acide gras est déterminée par rapport à la radioactivité totale.

7 - Dosage de protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY *et al.* (1951).

8 - Dosage des chlorophylles

La teneur des chlorophylles des tissus est déterminée selon la méthode d'ARNON (1949).

9 - Expression des résultats

Les résultats des dosages sont rapportés soit à une paire cotylédons, soit à un akène.

Les activités de biosynthèse sont exprimées en nmoles de précurseur incorporé par paire de cotylédons ou en nmoles de précurseur incorporé par mg de protéines ou par mg de chlorophylle.

CHAPITRE II

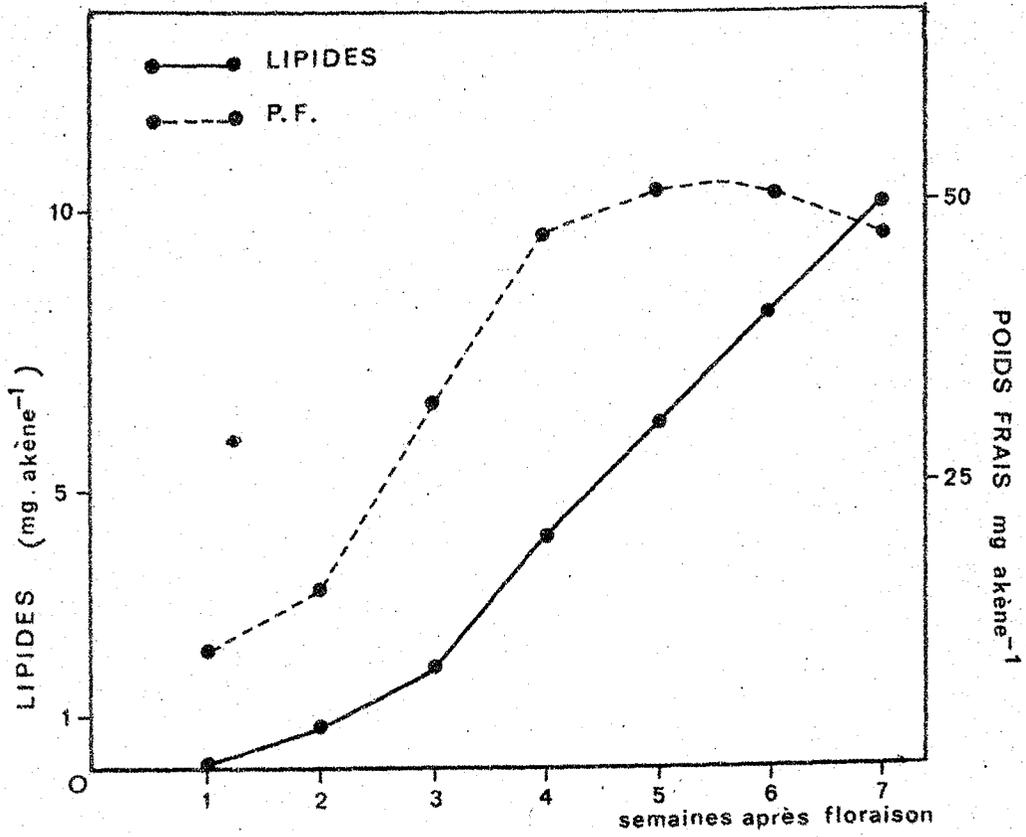


FIGURE 4 - Accumulation des lipides au cours de la formation de l'akène

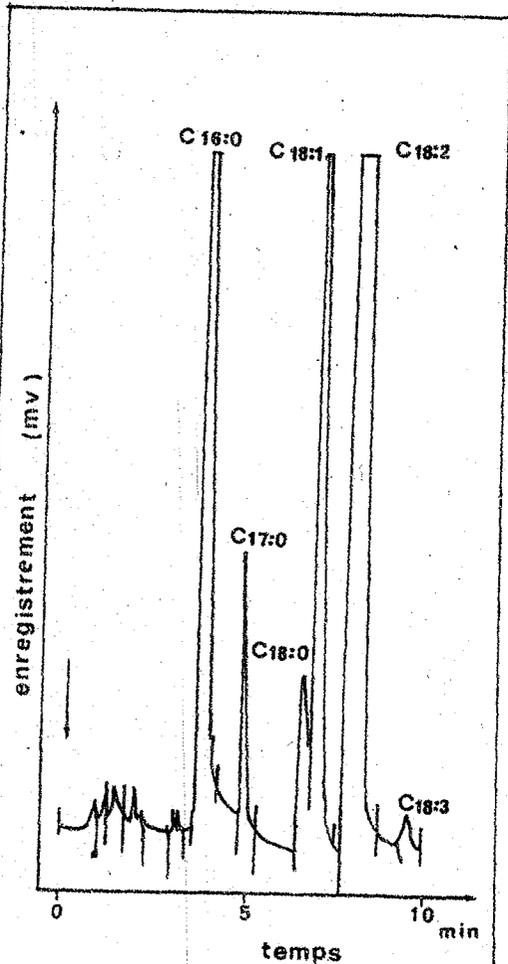


FIGURE 5 -Chromatogramme des esters méthyliques d'acides gras présents dans l'akène de Carthame, quatre semaines après la floraison

SYNTHÈSE DES LIPIDES AU COURS DE LA FORMATION DE L'AKÈNE

A - ÉVOLUTION DES LIPIDES TOTAUX

La figure 4 représente l'évolution de matière fraîche ainsi que l'accumulation des lipides dans l'akène en formation.

Le poids de matière fraîche augmente beaucoup à partir de la 2^{ème} semaine après la floraison pour se stabiliser à la 5^{ème} semaine. Passée la sixième semaine, la perte de poids de l'akène est due probablement à la déshydratation accompagnant la maturation. On peut distinguer deux phases principales dans l'accumulation des lipides :

1. Une phase d'accumulation lente jusqu'à la 2^{ème} semaine après la floraison.
2. Une phase d'accumulation très rapide passée la 3^{ème} semaine après la floraison.

On remarque que cette courbe d'accumulation des lipides n'est pas tout à fait identique à celles des autres semences oléagineuses telles que le Lin, Tournesol, Colza (CHERIF, 1975 ; CHERIF et MAZLIAK, 1978). Elle ne se termine pas par un plateau. Les essais ont porté sur les akènes provenant de cultures faites sur deux années consécutives : 82/83, 83/84. Il est possible que la récolte ait eu lieu avant la fin de l'accumulation des matières grasses, bien qu'à la septième semaine après la floraison, le poids de matière fraîche d'un akène soit stabilisé depuis trois semaines. SIMS *et al.* (1961) sur une variété de Carthame cultivée en Inde, ont trouvé que l'accumulation des lipides cessait avant la septième semaine (30^{ème} et 40^{ème} jours après la floraison). On constate donc soit des différences variables dans le rythme de formation des lipides chez le Carthame, soit des différences liées aux climats différents des deux stations. En effet, comme l'ont montré plusieurs travaux, la lipogénèse est sous la dépendance de plusieurs facteurs : température (ICHIHARA et NODA, 1980), quantité d'eau reçue pendant le développement (SUKHIJA *et al.*, 1980)

Évolution des acides gras totaux

Les principaux acides gras présents dans l'akène de Carthame sont : l'acide palmitique (C_{16:0}), l'acide stéarique (C_{18:0}), l'acide oléique (C_{18:1}), l'acide linoléique (C_{18:2}) et l'acide linoléique (C_{18:3}) (Fig. 5). Ces acides gras ont été trouvés dès le début de la formation de l'akène (tableau I). A la première semaine, on remarque que les acides gras insaturés représentent déjà 68% de la masse des acides gras totaux et l'acide gras majeur est l'acide linoléique (48%). Tous les acides gras commencent à

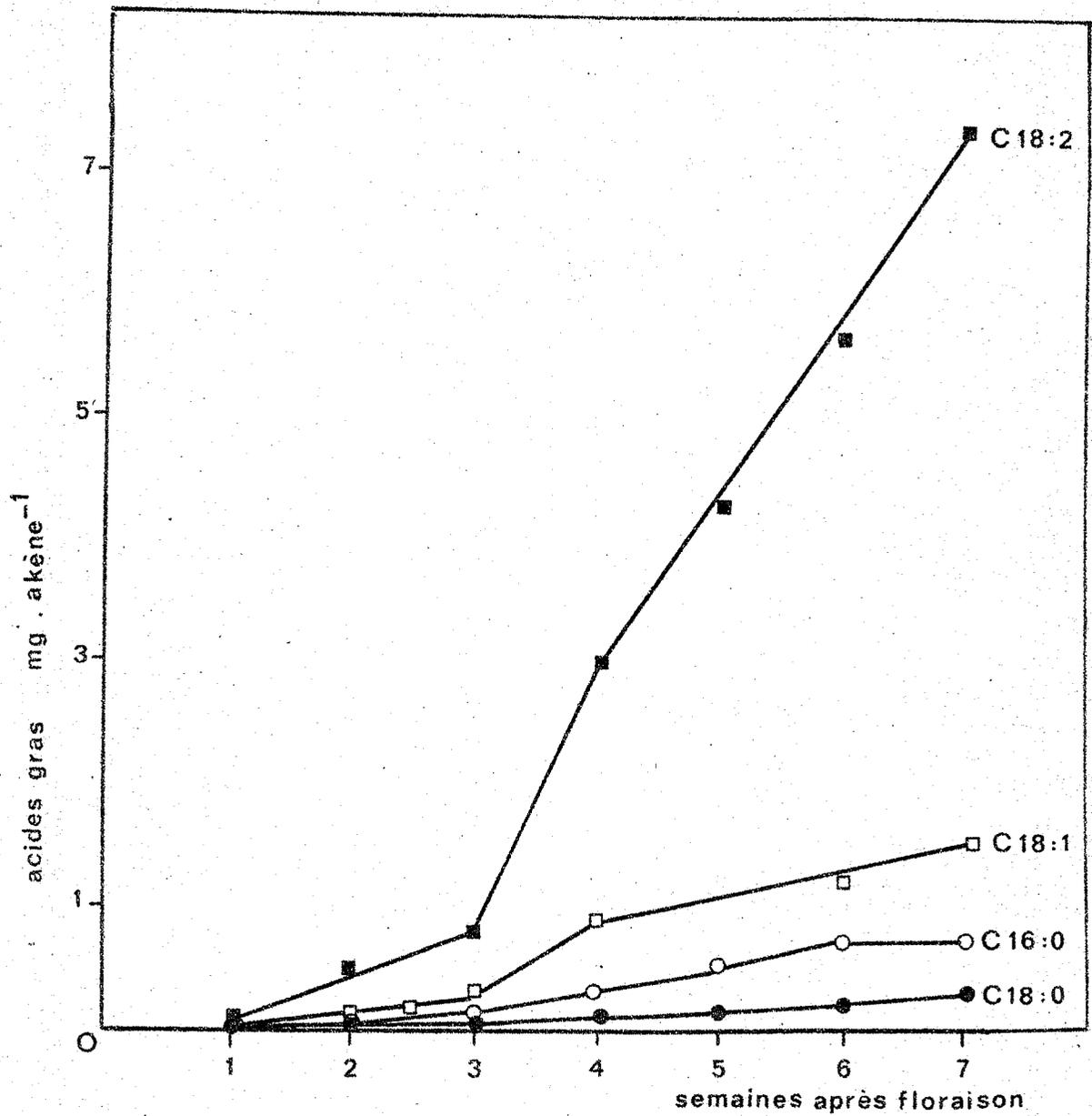


FIGURE 6 - Evolution des acides gras totaux dans l'akène de Carthame en formation

s'accumuler à partir de la deuxième semaine après la floraison (fig. 6). On note une augmentation préférentielle des acides gras insaturés : l'acide linoléique passe de 0,84 mg/semence à 7,41 mg et l'acide oléique de 0,12 mg à 1,52 mg en fin de maturation de l'akène. L'acide linoléique accuse une baisse à partir de la troisième semaine : il passe de 0,052 mg à 0,026 mg/semence. Les acides gras saturés augmentent également lors de la formation de la semence. L'augmentation de l'acide palmitique est plus importante que celle de l'acide stéarique.

L'étude des proportions relatives des acides gras montre des variations importantes (tableau I).

TABLEAU I - Composition en acides gras totaux des akènes de Carthame en formation

semaines après la floraison	% de la masse des acides gras totaux				
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	17,2	14,7	8,0	48,2	11,9
2	13,4	3,7	14,4	68,4	----
3	10,2	2,8	10,3	72,1	4,5
4	9,2	3,2	14,3	73,3	----
5	8,4	2,9	15,6	72,4	0,4
6	9,3	3,4	15,5	71,2	0,1
7	7,2	3,0	15,3	74,2	0,3

Les acides gras saturés diminuent en pourcentage à partir de la deuxième semaine après la floraison. L'acide palmitique passe de 17% à 7% à la maturation de l'akène, tandis que l'acide stéarique baisse de 14% à 3%. L'acide oléique double presque son pourcentage au cours du développement de la semence : de 8% en début de formation à 15% dans l'akène mûr. L'acide linoléique, déjà présent en grande proportion une semaine après la floraison, présente une augmentation de pourcentage importante pendant les trois premières semaines du développement de la graine et forme finalement 74% des acides gras totaux à la maturation.

L'acide linoléique, caractéristique du tissu vert, présent en quantité importante dans l'akène immature en début de formation subit une baisse importante à partir de la troisième semaine et se retrouve à l'état de traces (0,3%) dans l'akène mûr.

Conclusion

Dans l'akène de Carthame en formation, l'accumulation des acides gras est faible pendant les premières semaines après la floraison, puis leur masse augmente jusqu'à la maturation de la semence. Nous n'avons pas observé de phase finale de ralentissement de l'accumulation des lipides comme dans les autres plantes oléagineuses (MAZLIAK, 1968).

Dès la première semaine après la floraison, on remarque que l'huile de Carthame est riche en acides gras polyinsaturés (68%). Le taux d'insaturation au cours de la maturation de l'akène augmente et passe à 90%. La synthèse de l'acide linoléique dans les graines en formation est à peu près connue. L'acide oléique et linoléique apparaît à partir du 10ème jour après la fertilisation (MAC MAHON et STUMPF, 1966).

L'acide linoléique proviendrait de deux désaturations successives de l'acide gras saturé (CHERIF, 1975 ; CHERIF *et al.*, 1975).

La première désaturation a lieu dans les plastes de la graine et requiert de l'O₂ et du NADPH. Le substrat est le stéaryl-ACP et le produit de désaturation l'oléoyl-ACP. Ce dernier produit est hydrolysé avec libération d'acide oléique. Sous l'action de l'acyl-CoA synthétase, l'acide oléique est transformé en oléyl-CoA.

L'oléyl-CoA, exporté dans le cytoplasme, est ensuite incorporé dans la PC sous forme de β oléoyl-PC et désaturé en β linoléoyl-PC (STYMNE et APPELQVIST, 1978). Le schéma V résume ces étapes.

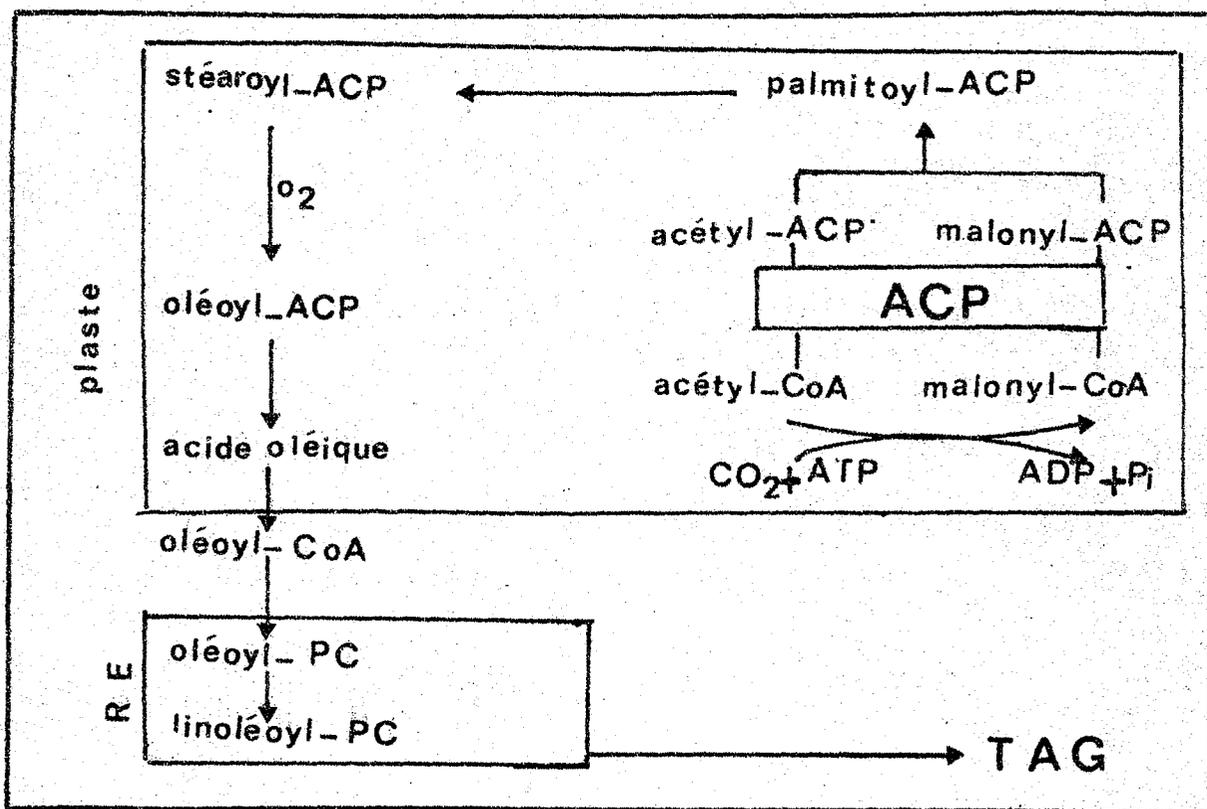


Schéma V - Coopération plaste - réticulum endoplasmique pour la biosynthèse de l'acide linoléique

Ces systèmes de désaturation et plus particulièrement l'oléyl désaturase peuvent être affectés par la température. On a remarqué que l'huile provenant des cultures sous climats chauds est plus riche en acide oléique. Plusieurs travaux ont confirmé l'effet inhibiteur des températures élevées sur les désaturases (ICHIHARA et NODA, 1980 ; TREMOLIERES *et al.*, 1982 ; BROWSE et SLACK, 1983). Deux hypothèses ont été proposées. La température agirait indirectement soit sur la solubilité de l'oxygène dans le milieu (HARRIS et JAMES, 1969), soit sur la fluidité membranaire (KASAI *et al.*, 1976). Nos résultats montrent que les akènes de Carthame (*Carthamus tinctorius* L., var. S 400) ont un fort pourcentage en acide linoléique. Le développement de l'akène se situe aux mois de Juin - Juillet où les températures moyennes de la région d'El Khemis avoisinent 30°C. Il semblerait donc que les désaturases soient très actives dans la variété de Carthame étudiée malgré les températures ambiantes élevées.

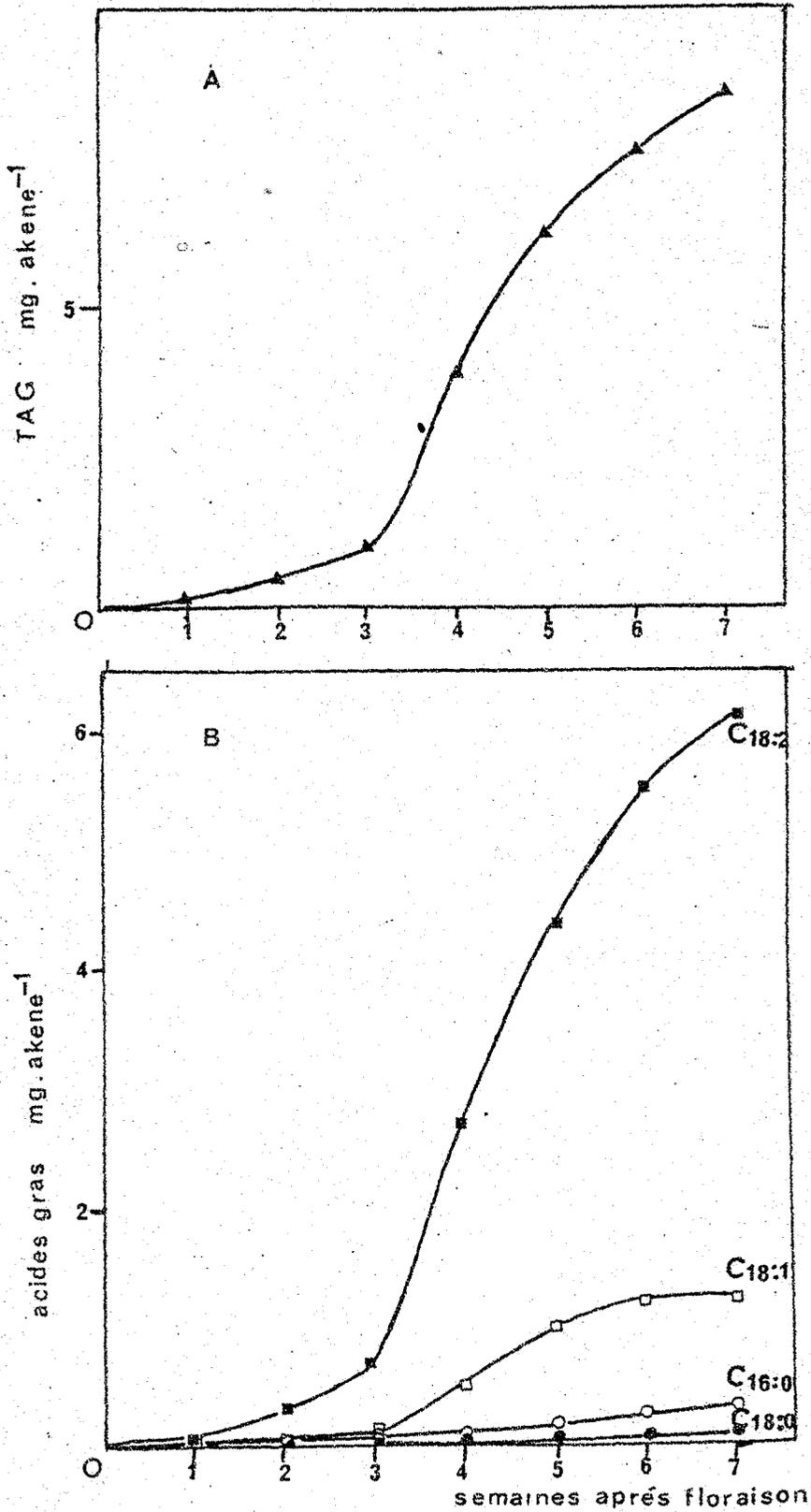


FIGURE 7 - Evolution des triacylglycérols dans l'akène de Carthame en formation

A - Evolution de la masse

B - Evolution des acides gras

B - EVOLUTION DES CATEGORIES LIPIDIQUES

1 - Triacylglycérols

La courbe représentant l'accumulation des triacylglycérols montre trois phases principales (fig. 7 A). Une première phase couvre les deux premières semaines après la floraison, pendant laquelle la synthèse est faible.

Une deuxième phase va jusqu'à la 5ème semaine au cours de laquelle l'accumulation des triacylglycérols est importante. Leur masse passe de 0,54 mg à 6,10 mg/akène.

Pendant la troisième phase, la synthèse des triacylglycérols est plus lente. Cette période coïncide avec la maturation de la graine.

La masse des acides gras des triacylglycérols augmente au cours de la formation de l'akène. Tous les acides gras augmentent à partir de la deuxième semaine. On note cependant une augmentation plus importante des acides gras insaturés (fig. 7 B).

Les variations des proportions relatives des acides gras des triacylglycérols sont représentées dans le tableau II. On remarque, que pendant les deux premières semaines, la composition des triacylglycérols reste stable. On note un pourcentage important de l'acide linoléique (60%) et la présence de l'acide linoléique (7%).

A partir de la 3ème semaine le pourcentage de l'acide linoléique continue d'augmenter alors que celui que l'acide linoléique baisse ; cet acide n'est plus détecté à partir de la 4ème semaine. A partir de la 5ème semaine la composition en acides gras des triacylglycérols est à peu près fixée.

TABLEAU II - Evolution de la composition (en %) en acide gras des TAG au cours de la maturation de l'akène.

Semaines après floraison	Composition (en %) en acides gras du TAG				
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	19	2,4	11	60	7
2	19	2,3	12	60	6,3
3	13	1,1	11	73	1,4
4	9,1	2,0	14	74	0,1
5	8	1,9	17	73	---
6	7,4	1,8	16	73	---
7	7	1,6	15	75	---

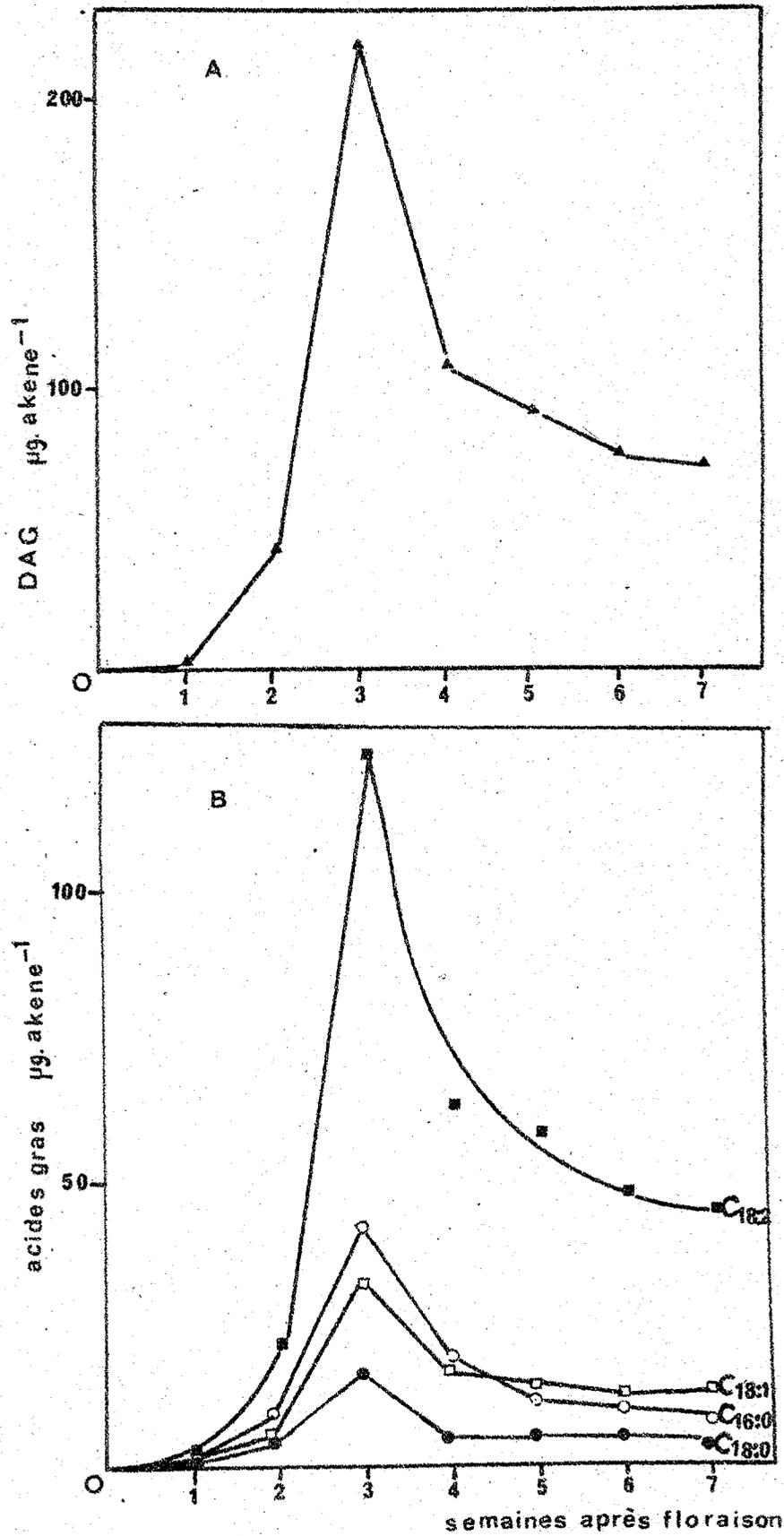


FIGURE 8 - Evolution des diacylglycérols dans l'akène de Carthame en formation
A - Evolution de la masse
B - Evolution des acides gras

2 - Diacylglycérols

Comparée aux triacylglycérols, cette catégorie lipidique est faiblement représentée pendant tout le développement de l'akène.

Les diacylglycérols sont synthétisés surtout pendant les premières semaines après la floraison. Le taux maximal se situe à la troisième semaine où ils représentent 0,220 mg/akène. Cette quantité diminue avec la maturation de la semence (Fig. 8). Les évolutions en masse des différents acides gras sont parallèles : ces masses augmentent toutes au début de la formation de la semence. L'acide linoléique reste l'acide gras majoritaire des DAG. Les acides gras saturés augmentent également ; cependant l'augmentation de l'acide palmitique est plus importante que celle de l'acide stéarique. Après la troisième semaine, tous les acides gras diminuent en masse et les valeurs finales se stabilisent entre la 5ème et 7ème semaine.

L'étude des proportions relatives des acides gras des DAG représentée dans le tableau III montre que les acides stéarique et oléique varient très peu. Le pourcentage de l'acide palmitique diminue alors que celui de l'acide linoléique augmente au fur et à mesure de la maturation. On note la présence de l'acide linoléique dans les DAG pendant tous les stades de développement alors que dans les TAG il n'est plus détecté à partir de la 4ème semaine (tableau II).

TABLEAU III - Evolution de la composition (en %) des acides gras des DAG au cours de la maturation.

semaines après la floraison	Composition en % des acides des DAG				
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	23	3,4	11	56	5,3
2	19	7	14	57	2,7
3	19	7	15	57	1,1
4	17	4,2	15	60	0,7
5	12	5,2	16	64	1
6	13	5,2	16	63	0,8
7	11	3,9	18	62	0,4

Bien que les diacylglycérols soient faiblement représentés dans l'akène, ils jouent un rôle important dans la lipogenèse. La diminution de leur masse à la troisième semaine coïncide avec la synthèse des triacylglycérols. Ces résultats suggèrent donc que les DAG participent à la formation des TAG.

3 - Les lipides polaires

Le tableau IV montre les pourcentages des différents constituants des lipides polaires.

TABLEAU IV - Pourcentages des différentes classes de lipides polaires au cours de la maturation

semaines après floraison	PI	PC	PG	PE	PA	MGDG	DGDG
1	6	46	15	11	6	5	5
2	8	30	13	11	11	15	14
3	16	22	12	14	11	13	12
4	10	19	10	18	15	13	12
5	13	21	11	15	15	11	11
6	12	25	6	13	11	12	12
7	12	34	5	18	11	9	8

Au cours de la formation de la graine, les phospholipides sont majoritaires. Ils représentent 70 à 85% des lipides polaires totaux. Les galactolipides sont faiblement représentés.

Parmi les phospholipides, la PC est la catégorie la plus importante et présente des variations importantes. De 46% au début de la formation, le taux baisse à 19% à la quatrième semaine puis s'élève à 34% dans la graine semence mûre. Le taux du PG diminue au cours de la maturation de la semence. Dans l'akène néoformé il est de 15%, puis ce taux baisse et n'est que de 5% dans la graine mûre.

La PE augmente jusqu'à la quatrième semaine (18%) puis diminue entre la quatrième et sixième semaine et atteint la valeur de 18% à la septième semaine.

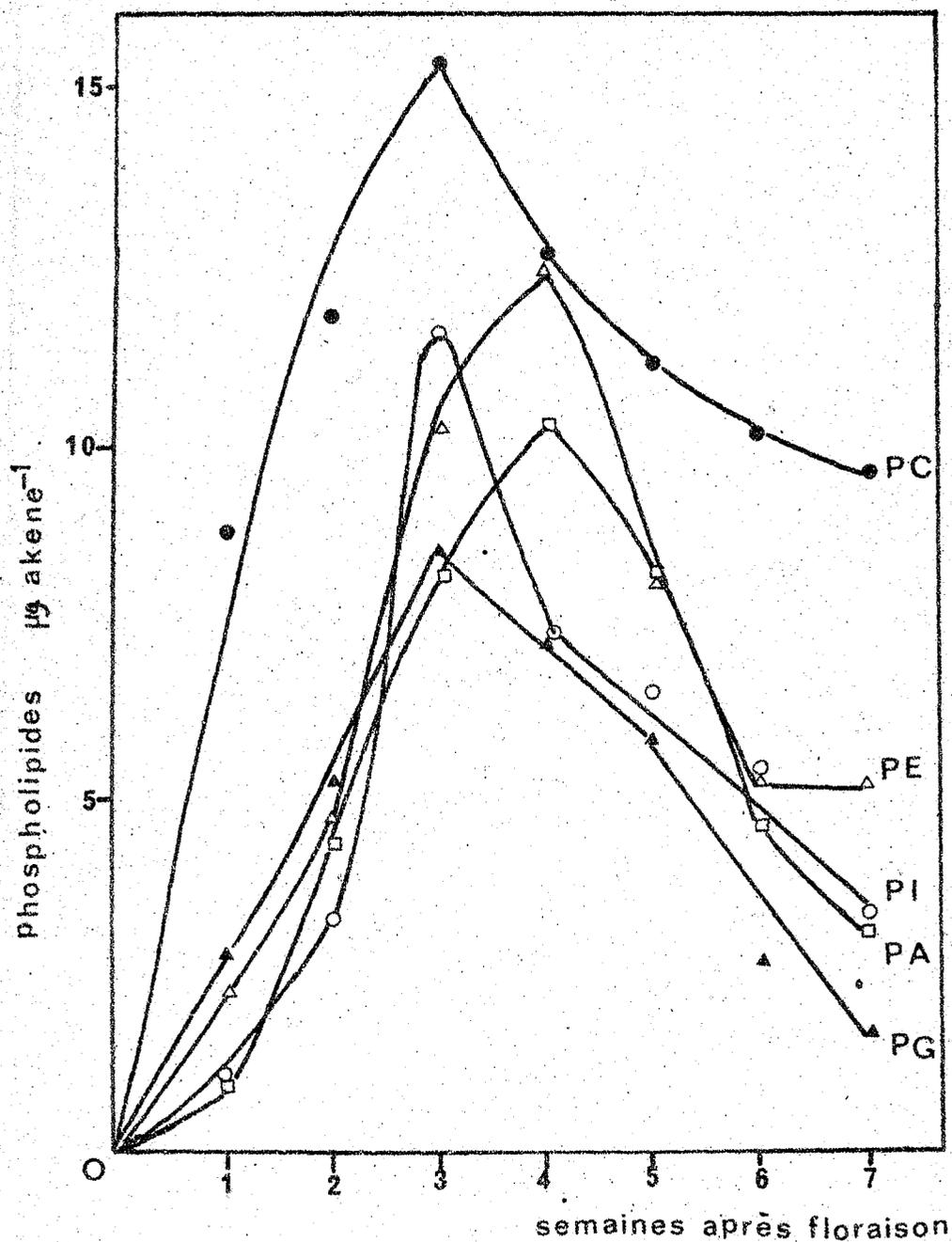


FIGURE 9 - Evolution de la masse des phospholipides dans l'akène de Carthame en formation

En ce qui concerne les galactolipides, les taux de MGDG et DGDG sont à peu près identiques. Au cours des quatre premières semaines, le taux du MGDG est un peu plus élevé que celui du DGDG. La présence constante de ces lipides caractéristiques des plastes confirme l'existence de ces organites tout au long du développement de l'akène.

a - Les phospholipides

- La phosphatidylcholine est le phospholipide majeur dans la semence en formation. Le taux de ce lipide augmente régulièrement jusqu'à la troisième semaine puis accuse une baisse avec la maturation de la graine (Fig. 9). Les pourcentages des acides gras composant la PC est représenté sur le tableau V.

TABLEAU V - Evolution de la composition (en %) en acides gras de PC au cours de la maturation

semaines après floraison	Composition en % des acides gras de PC					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	20	6	6	17	43	6
2	24	3	4	14	46	9
3	23	5	6	18	45	3
4	6	-	8	14	68	-
5	4	-	8	20	68	-
6	4	-	11	24	59	-
7	4	-	12	16	66	-

On note deux stades totalement différents dans la composition en acides gras de la PC. Pendant les trois premières semaines, on remarque que les acides gras saturés (C_{16:0} et C_{18:0}) représentent 30% de la masse totale, puis ces acides gras diminuent brusquement et passent à la valeur de 6%. L'acide linoléique reste majoritaire pendant tout le développement de la semence. L'acide linoléique n'est que faiblement représenté dans la PC de la graine néoformée puis n'est plus détecté lors des dernières semaines.

- La phosphatidyléthanolamine est synthétisée jusqu'à la quatrième semaine. A partir de ce stade le taux diminue brusquement puis se stabilise entre la 6ème et 7ème semaine.

La composition en acides gras est également différente dans la semence néoformée et dans l'akène mûr (tableau VI).

TABLEAU VI - Evolution de la composition (en %) en acides gras de PE au cours de la maturation de l'akène.

semaines après floraison	Composition en % des acides gras de PE					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	19	5	20	25	27	2
2	22	2	24	21	24	4
3	25	-	22	20	25	5
4	25	-	13	18	42	-
5	15	-	15	18	50	-
6	15	-	16	18	49	-
7	13	-	16	18	50	-

Dans la semence néoformée les acides palmitique et stéarique sont prépondérants et présentent 30% de la masse des acides gras. Passée la troisième semaine, la semence s'enrichit considérablement en acide linoléique.

- L'acide phosphatidique

L'évolution du PA est à peu près identique à celle de la PE. Son taux augmente jusqu'à la quatrième semaine, puis décroît et devient faible dans la semence mûre (3 µg/organe). La composition en acides gras est caractérisée par un taux élevé en C_{16:0} (35%) à la troisième semaine après la floraison, puis cette proportion diminue rapidement (7% dans l'akène mûr). Au fur et à mesure de la maturation de la semence, le PA s'enrichit en acide oléique et linoléique (tableau VII).

TABLEAU VII - Evolution de la composition (en %) en acides gras de PA au cours de la maturation de l'akène

semaines après floraison	Composition en % d'acides gras de PA					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	30	4	6	16	30	7
2	29	-	9	17	30	5
3	35	-	9	14	34	2
4	8	-	6	17	64	-
5	6	-	9	27	56	-
6	8	-	19	29	42	-
7	7	-	23	26	43	-

Les teneurs en PG et en PI évoluent parallèlement. Ces teneurs croissent jusqu'à la troisième semaine après la floraison puis décroissent brusquement. Cependant dans l'akène mûr la teneur en PI (3,4 µg/akène) est double de celle en PG (1,6 µg) (fig. 9). Comme pour les autres phospholipides, les premiers stades sont caractérisés par une richesse de C_{16:0}. Aux stades de maturation, ce taux diminue alors que s'accroît celui des acides oléique et linoléique (tableaux VIII et IX).

TABLEAU VIII - Evolution de la composition (en %) en acides gras de PG au cours de la maturation de l'akène

semaines après floraison	Composition en % des acides gras de PG					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	24	6	13	19	33	4
2	23	4	14	17	32	8
3	21	4	8	28	31	7
4	15	2	11	18	50	-
5	8	-	29	32	30	-
6	8	-	29	32	30	-
7	8	-	29	32	30	-

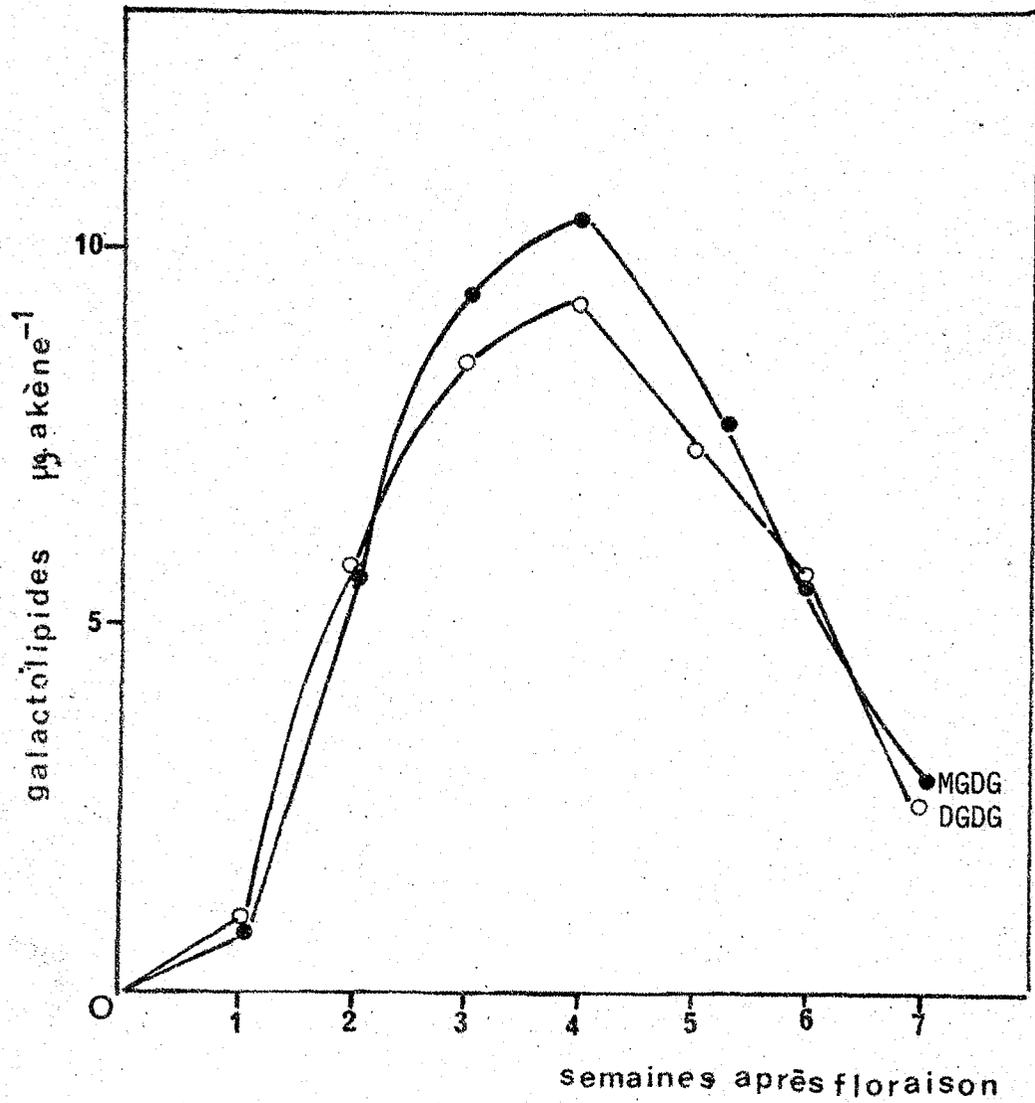


FIGURE 10 - Evolution de la masse des galactolipides dans l'akène de Carthame en formation.

Le pourcentage en acides gras de PG est stable à partir de la cinquième semaine. On note un taux identique en acides stéarique, oléique et linoléique. L'acide linoléique n'est plus détecté à partir de la troisième semaine.

TABLEAU IX - Evolution de la composition (en %) en acides gras de PI au cours de la maturation de l'akène

semaines après floraison	Composition en % d'acides gras de PI					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	22	6	13	16	36	3
2	20	4	12	26	32	2
3	22	4	15	23	32	3
4	18	-	18	23	40	-
5	8	-	23	26	42	-
6	11	-	22	22	43	-
7	8	-	23	25	42	-

Contrairement à la PE, le pourcentage en acide linoléique du PI dans la semence mûre est plus élevé que celui des acides stéarique et oléique. L'acide linoléique se trouve à l'état de trace au cours des premières semaines de développement.

b - Les galactolipides

Dans l'akène en formation, les galactolipides se trouvent en très faible proportion. Les teneurs en MGDG augmentent pendant les quatre premières semaines puis diminuent progressivement. La teneur en MGDG est légèrement plus élevée que celle en DGDG (fig. 10).

Le tableau X nous donne la composition en acides gras de MGDG et DGDG. Durant les premières semaines, le MGDG est légèrement plus riche en C_{16:0} (28%) que le DGDG (22%). L'acide linoléique est également plus élevé que dans ce galactolipide.

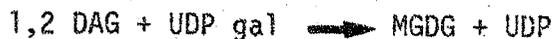
Dans les tissus séminaux, les galactolipides sont synthétisés dans les plastes non différenciés. En général, dans les tissus non photosynthétiques, la teneur de DGDG est plus élevée que celui de MGDG (DOUCE et JOYARD, 1980). Nos résultats montrent que la teneur de MGDG est plus élevée que celle du DGDG dans les akènes de Carthame. Des résultats identiques se retrouvent dans les graines de Tournesol (TRIKI, 1981).

Les différences relevées au niveau des acides gras des deux galactolipides laissent présager que l'origine métabolique du DGDG est différente de celle du MGDG.

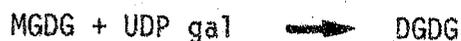
TABLEAU X - Evolution des compositions en acides gras des galactolipides au cours de la maturation des akènes

	% de la masse des AGT									
	MGDG					DGDG				
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	21	21	14	21	10	17	16	19	31	11
2	26	11	16	30	14	15	17	22	31	10
3	28	8	17	23	15	22	15	18	22	10
4	7	15	22	46	8	5	16	28	44	4
5	11	18	25	48	-	8	21	25	35	8
6	9	18	28	48	-	4	22	30	42	-
7	5	20	29	44	-	5	22	25	48	-

Il est admis que la synthèse du MGDG se fait par galactosylation du 1-2 diacylglycérol (MAZLIAK *et al.*, 1982)



La synthèse de DGDG n'est pas tout à fait élucidée. Le DGDG se ferait par galactosylation de MGDG,



ou par transgalactosylation de 2 molécules de MGDG



Il est probable que les deux mécanismes ont lieu dans les cotylédons des akènes en début de formation.

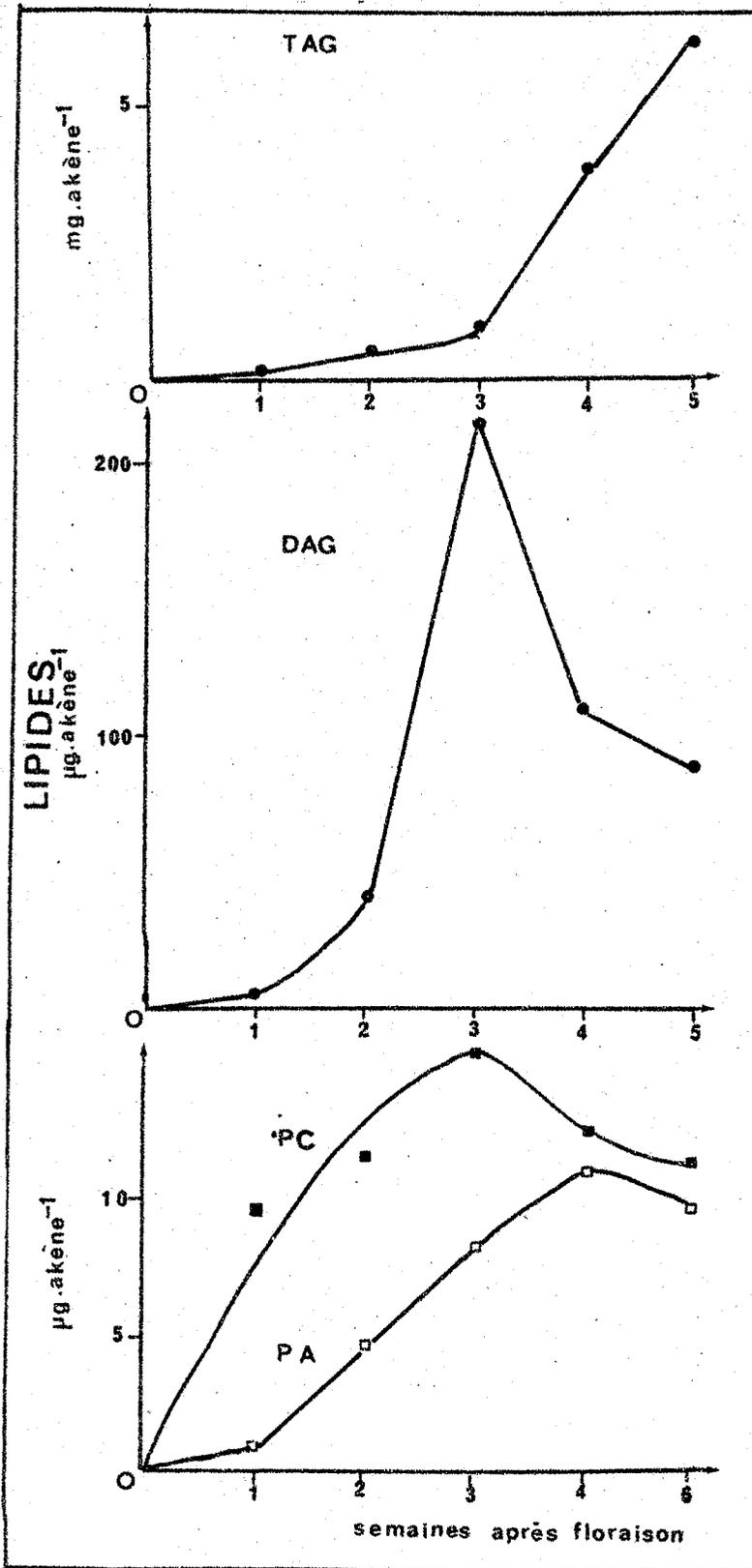


FIGURE 11 - Evolution comparée des masses des diverses catégories lipidiques au cours de la formation des akènes de Carthame

- Conclusion

Les akènes de Carthame sont très riches en TAG. La synthèse de cette catégorie de lipides débute à partir de la troisième semaine après la floraison et se poursuit pendant toute la durée de la maturation de la semence. La formation des TAG coïncide avec la diminution des taux de DAG et de phospholipides (Fig. 11). Ces catégories lipidiques ont une composition en acides gras caractéristiques. Les TAG, DAG et PC sont riches en acides gras polyinsaturés et plus particulièrement en acide linoléique : 75% pour les TAG, 62% pour DAG et 66% pour le PC.

Dans la semence néoformée on assiste principalement à la synthèse des phospholipides. A tous les stades du développement, la PC est le plus important des phospholipides bien que sa teneur diminue à partir de la troisième semaine après la floraison.

L'acide phosphatidique et la PE continuent à s'accumuler jusqu'à la quatrième semaine, puis leurs taux diminuent rapidement.

Le PG et les galactolipides sont caractéristiques des feuilles et entrent dans la constitution des membranes des chloroplastes ; ces lipides sont synthétisés dans les cotylédons en formation. Leur taux relativement faible diminue au cours de la formation de l'akène.

Les phospholipides synthétisés en début de la formation de l'akène jouent deux rôles principaux :

1. Ils entrent dans la constitution des membranes biologiques et principalement dans la formation des "oléosomes" où se déroulera la synthèse des TAG (GURR, 1980).
2. Ils participent à la synthèse des TAG (ROUGHAN et SLACK, 1982).

Le mécanisme de synthèse des TAG est actuellement activement étudié et le Carthame s'est révélé de ce point de vue un matériel biologique intéressant.

D'après nos résultats, il semble que pendant les premières semaines les acides gras saturés soient synthétisés de façon majoritaire. Passée la troisième semaine, interviennent les désaturases avec une augmentation marquée du taux d'acide linoléique.

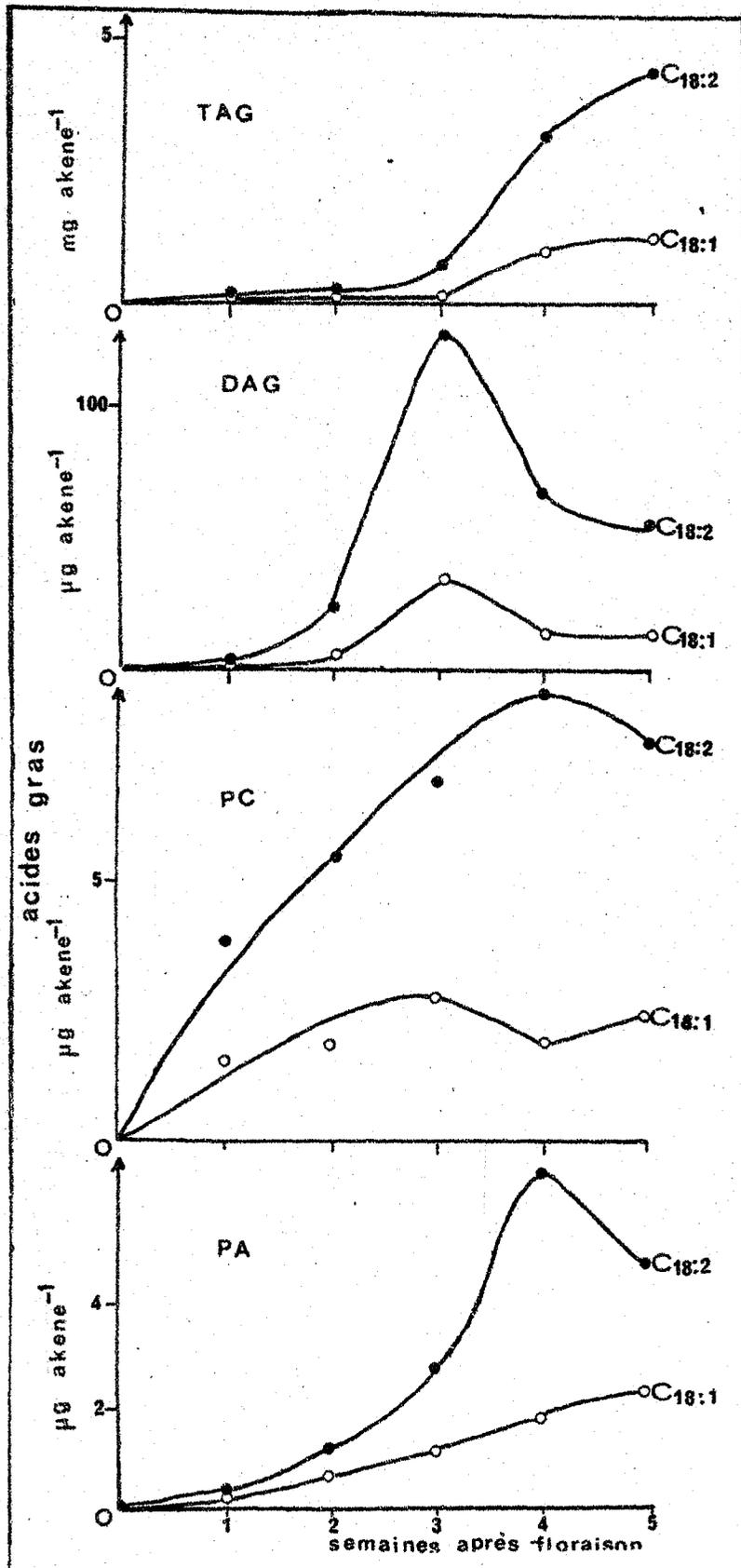
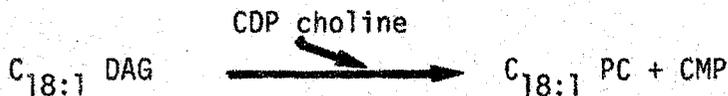


FIGURE 12 - Evolution comparée de la masse des acides oléique et linoléique dans les catégories lipidiques au cours de la formation des akènes de Carthame

L'étude comparée des acides gras des différentes catégories lipidiques montre que les TAG, DAG et PC ont le plus fort pourcentage en acide linoléique alors que le PA est plus riche en acides gras saturés durant tout le développement de l'akène ($C_{16:0}$ en début de formation et $C_{18:0}$ dans l'akène mûr) (tableau VII).

Dans l'akène de Carthame, trois semaines après la floraison, la masse des chaînes oléoyl dans PC diminue alors que celle des chaînes linoléoyl augmente dans ce même phospholipide, ce qui suggère une désaturation de l'oléate au sein de la molécule de PC (Fig. 12). Il est actuellement bien établi que la désaturation de l'acide oléique en acide linoléique a lieu dans le PC des microsomes (STYMNE et APPELQVIST, 1978 ; SLACK *et al.*, 1979 ; BROWSE et SLACK, 1981).

L'étude comparée de l'évolution de la masse des acides oléique et linoléique dans la PC et les DAG montre une évolution très semblable pour l'acide oléique dans les deux catégories, ce qui suggère que la réaction suivante puisse avoir lieu :



L'enzyme intervenant dans cette réaction serait le cytidine 5'diphosphate : diacylglycérol choline phosphotransférase (SLACK *et al.*, 1985).

En revanche, on constate que les évolutions de la $C_{18:2}$ -PC et des $C_{18:2}$ -DAG sont dissemblables : la $C_{18:2}$ -PC s'accumule tout au long de la maturation de l'akène tandis qu'à partir de la 3ème semaine, les $C_{18:2}$ DAG diminuent en masse, sans doute parce qu'ils sont convertis en $C_{18:2}$ TAG. On a pu également montrer que l'oléate (STOBART et STYMNE, 1985) ou le stéarate (STYMNE *et al.*, 1983) acylés au PA peuvent être transférés à la PC par l'intermédiaire des DAG. Nos résultats montrent que la masse du stéaryl-PA reste à peu près stationnaire à partir de la 2ème semaine après la floraison tandis que celle de l'oléoyl PA augmente avec la maturation de l'akène.

Nous pouvons regrouper toutes ces évolutions pondérales pour construire la voie de biosynthèse des TAG dans l'akène de Carthame. Cette biosynthèse se ferait probablement de la manière suivante :

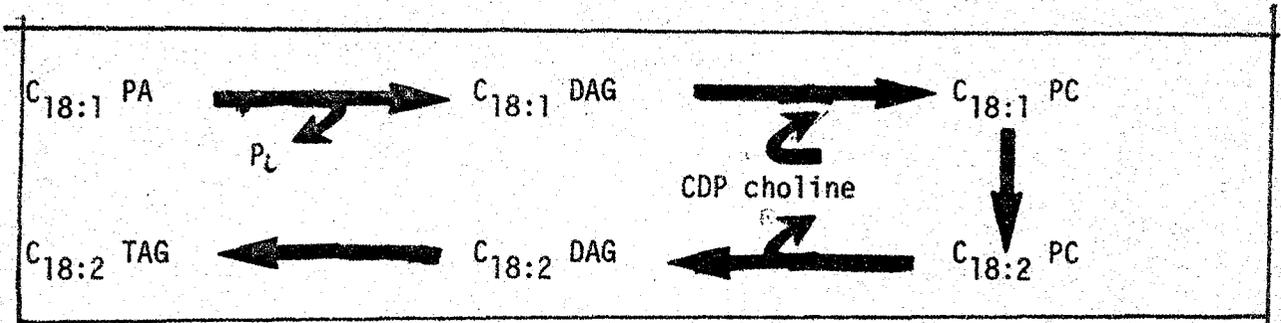


Schéma VI - Voie de biosynthèse proposée pour la formation des TAG dans l'akène de Carthame

Ajoutons que STYMNE et STOBART (1984^b-1985) ont pu montrer avec des microsomes de Lin et Tournesol qu'il se produisait *in vitro* des échanges entre les divers acyl-CoA et la PC sous l'action de l'enzyme lysophosphatidyl-choline-acyl transférase. Ces échanges supplémentaires compliquent encore plus la voie de biosynthèse de l'acide phosphatidique aux triacylglycérols.

CHAPITRE III

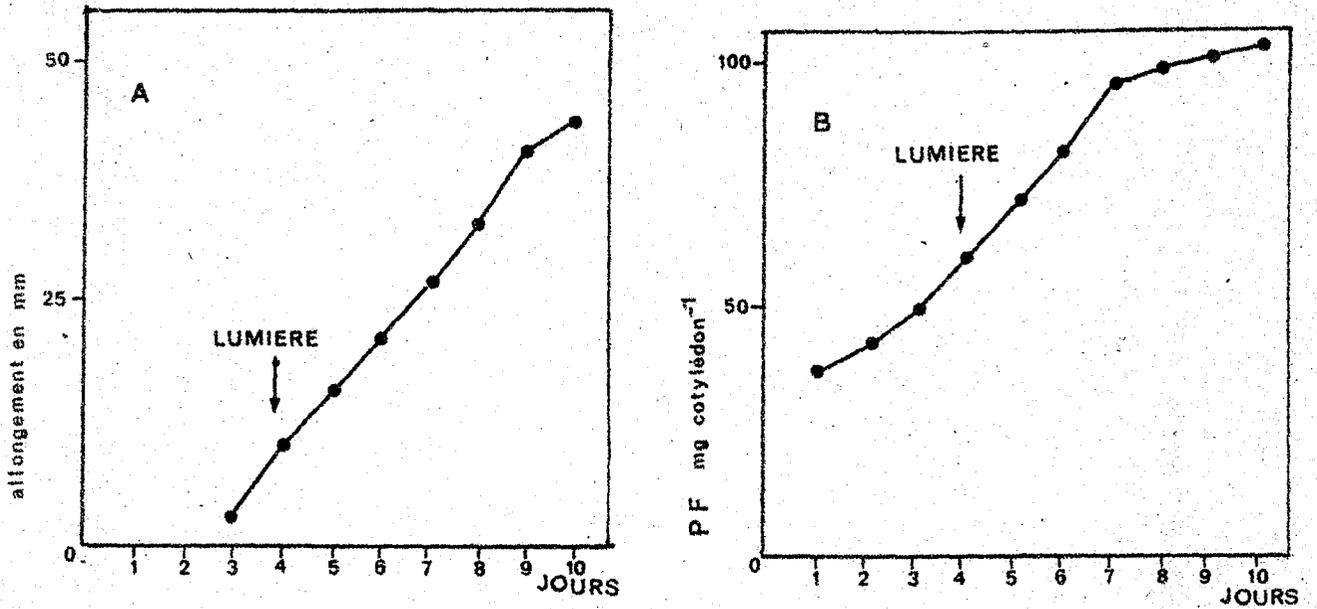


FIGURE 13 - Croissance des plantules de Carthame

A - Allongement de l'hypocotyle

B - Evolution de la masse de la matière fraîche des cotylédons.

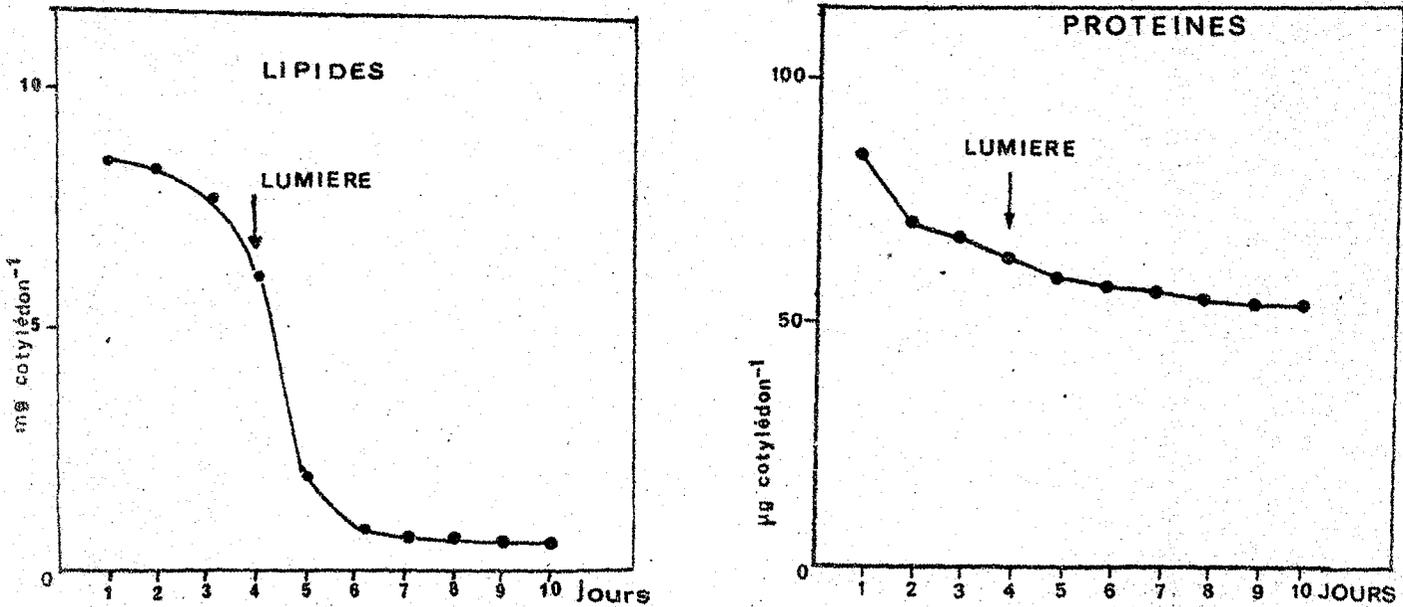


FIGURE 14 - Evolution des protéines et des lipides totaux dans les cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

ETUDE DE LA GERMINATION DES AKENES DE CARTHAME

A - CROISSANCE DES PLANTULES

72 heures après l'imbibition, les cotylédons sont portés par l'hypocotyle hors de la vermiculite. La croissance de l'hypocotyle se poursuit les jours suivants (figure 13 A) tandis que les cotylédons perdent les téguments qui les enveloppaient et verdissent à la lumière.

Leur poids augmente rapidement (figure 13 B) et ils se transforment en feuilles cotylédonnaires. Leur croissance se ralentit au septième jour après l'imbibition. Lors de nos essais les plantules ne recevaient pas de liquide nutritif. La croissance se faisait entièrement aux dépens des réserves contenues dans les akènes.

B - EVOLUTION DES RESERVES PROTEIQUES DANS LES COTYLEDONS

Les réserves protéiques des cotylédons diminuent au cours de la croissance de la plantule. La dégradation est rapide pendant les premiers jours de la croissance puis se ralentit après l'exposition des plantules à la lumière (Fig. 14 A).

C - EVOLUTION DES RESERVES LIPIDIQUES DES COTYLEDONS

L'évolution de la masse des acides gras totaux n'est pas comparable à celle des protéines. Aux premiers jours de la croissance, la dégradation n'est pas importante. Elle augmente considérablement après le quatrième jour, lors du passage à la lumière (Fig. 14 B). Les acides gras principaux dans l'akène de Carthame sont l'acide palmitique ($C_{16:0}$), l'acide stéarique ($C_{18:0}$), l'acide oléique ($C_{18:1}$), l'acide linoléique ($C_{18:2}$) et l'acide linoléique $C_{18:3}$. On ne note pas la présence de l'acide hexadécatriénoïque ($C_{16:3}$).

L'évolution de la masse des différents acides gras est représentée sur la figure 15. Lors du passage à la lumière, la masse de l'acide gras majeur (l'acide linoléique) diminue considérablement. Les masses d'acide oléique et stéarique diminuent également, mais beaucoup plus faiblement. En revanche la teneur en acide linoléique augmente avec l'exposition des plantules à la lumière.

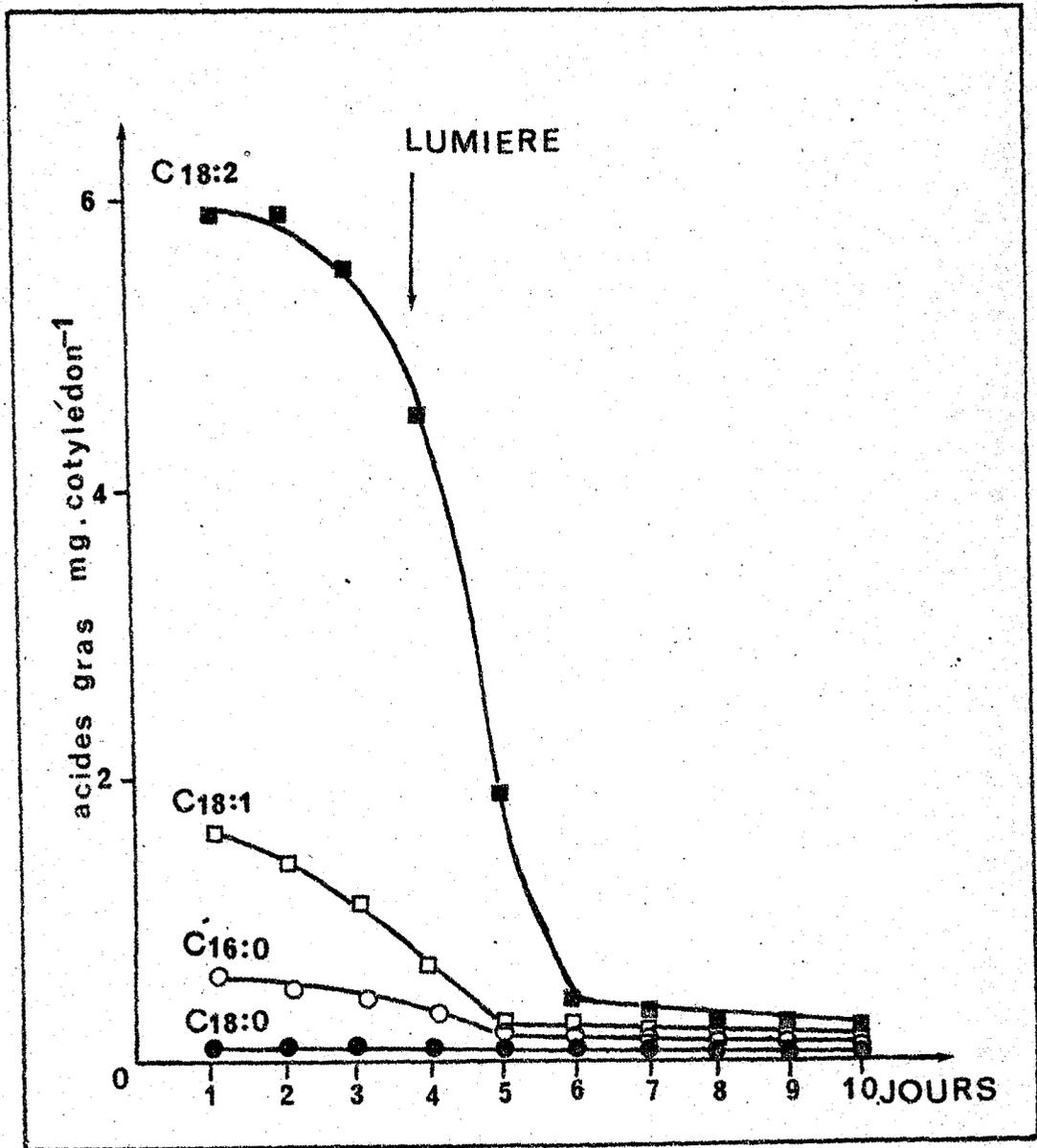


FIGURE 15 - Evolution de la masse des différents acides gras des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

Les variations des proportions relatives représentées sur le tableau XI soulignent la disparition préférentielle de l'acide linoléique lors de l'utilisation des réserves lipidiques. Ce fait est assez rare. La germination des autres graines oléagineuses étudiées jusqu'à présent ne s'accompagne pas de la disparition préférentielle d'un acide gras particulier (MAZLIAK, 1968).

On note une augmentation du pourcentage de la masse de l'acide linoléique. La biosynthèse de cet acide gras est activée par la lumière (TREMOLIERES et LEPAGE, 1971). Cette augmentation est liée probablement à la photosynthèse et plus particulièrement à la formation du chloroplaste. Cet acide gras semble provenir de la désaturation de l'acide linoléique. A la suite de l'exposition à la lumière, on assiste au passage des cotylédons servant d'organes de réserves, riches en acide linoléique, à la formation de feuilles cotylédonnaires, organes photosynthétiques riches en acide linoléique.

TABLEAU XI - Composition des acides gras totaux des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

Jours après imbibition	Pour cent de la masse des acides gras totaux				
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	7,4	1,9	19,8	70,4	0,04
2	7,3	2,3	18	72	0,1
3	7,1	2,4	17	72,4	0,7
4	7,6	2,4	13,8	73,9	2
Lumière 5	8,0	2,6	10,9	67,8	10,2
6	8,2	2,5	7,9	57,4	23,7
7	7,1	2,7	7,2	57	25,4
8	7,4	1,9	5,7	45	29,5
9	8,7	1,9	3,3	33,9	47,9
10	11,3	2,3	4,2	37,2	44,2

Conclusion

Au cours de la germination, la dégradation des réserves lipidiques est plus importante que celle des réserves protéiques. De plus, la lumière n'a pas le même effet sur l'hydrolyse des deux types de réserves contenues dans

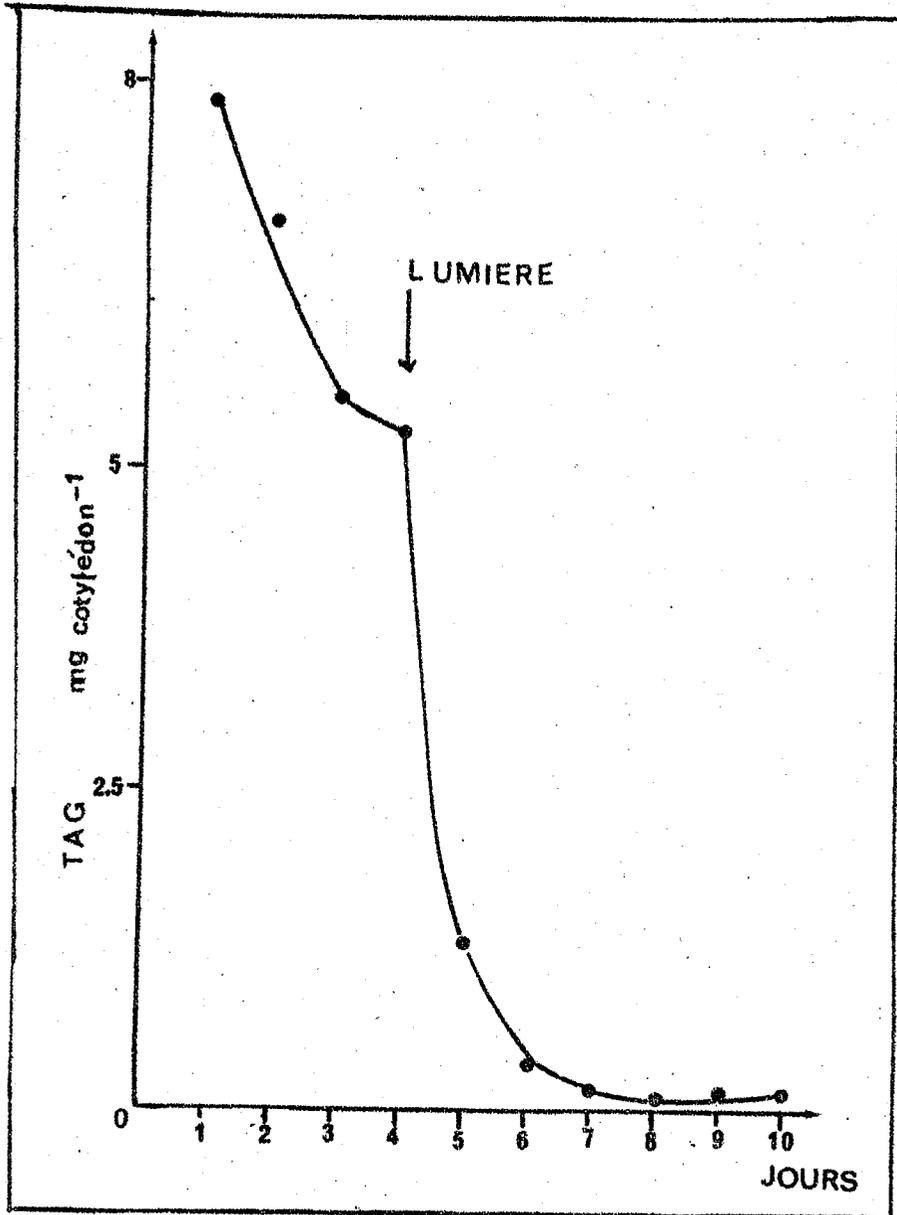


FIGURE 16 - Evolution des triacylglycérois des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

les cotylédons. Elle accélère la dégradation des lipides et freine celle des protéines. On observe une dégradation préférentielle de l'acide linoléique dans les cotylédons lors de la croissance des plantules.

D - EVOLUTION DES CATEGORIES LIPIDIQUES

1 - Triacylglycérols

Les réserves des semences de Carthame contiennent principalement des triacylglycérols. Ces réserves sont rapidement hydrolysées au cours de la germination.

Cette hydrolyse débute avec l'imbibition des akènes et est accentuée par l'exposition des plantules à la lumière (Fig. 16). En effet pendant les quatre jours à l'obscurité, les réserves lipidiques passent de 7,9 mg/akène à 5,3 mg alors qu'après 24 heures d'exposition lumineuse ce taux baisse rapidement à 1,3 mg. Le taux continue à diminuer et se stabilise autour de 30 µg/akène. Dans les feuilles formées, apparues au 12ème jour après imbibition, les triacylglycérols ont une teneur de 20 µg/g de PF.

L'analyse de la composition en % des acides gras montre une prédominance de l'acide linoléique. Cette valeur, relativement stable au début de la germination, tend à diminuer avec la croissance de la plantule. L'acide linoléique absent dans les cotylédons en formation commence à apparaître au 4ème jour et augmente dans les cotylédons éclairés. Cependant ce pourcentage diminue dans les derniers stades de la germination (tableau XII). Les acides gras saturés sont présents en très faibles proportions.

Les pourcentages pondéraux des acides gras contenus dans les feuilles cotylédonnaires et dans les feuilles formées sont totalement différents. Dans les cotylédons en croissance l'acide linoléique est majoritaire alors que dans les feuilles les pourcentages des acides stéarique, oléique et linoléique sont à peu près identiques.

Dans les deux cas les triacylglycérols renferment peu d'acide linoléique.

Cette différence résulterait du fait que les TAG des feuilles ne proviennent pas des réserves contenues dans les cotylédons, mais sont resynthétisés par la feuille. Cette synthèse emprunterait la voie acide phosphatidique → DAG → TAG (ICHIHARA et NODA, 1981).

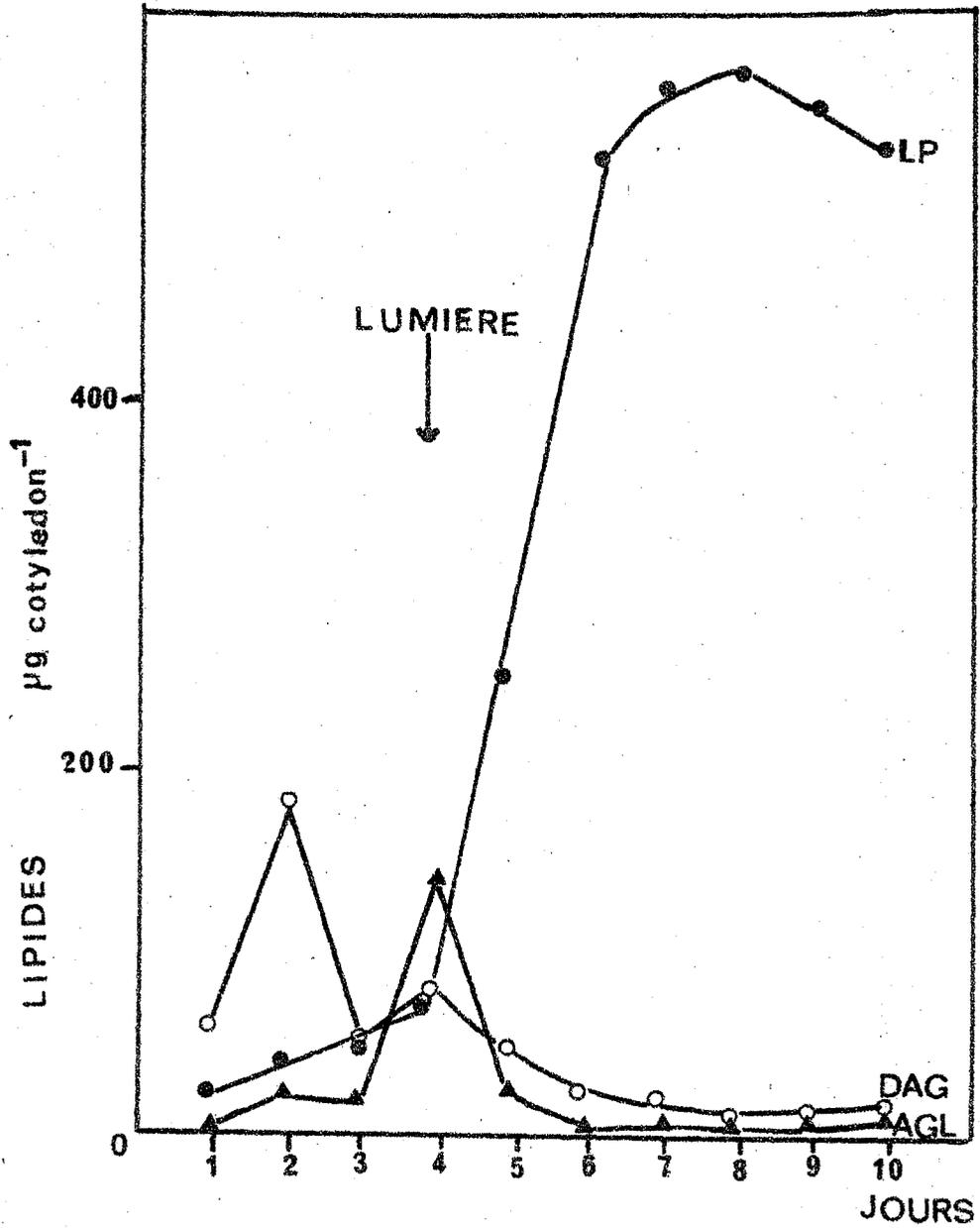


FIGURE 17 - Evolution des catégories lipidiques des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

TABLEAU XII - Evolution de la composition en acides gras des TAG dans les cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

Jours après imbibition	Pour cent de la masse des acides gras des TAG						
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
1	8,1	---	1,9	20	69	---	
2	7,8	---	2,4	17,9	71	---	
3	7	---	2,9	17	72	---	
4	4,5	---	2,8	15	75	1	
lumière	5	4,8	0,5	3,3	14	74	2,3
6	6,4	0,5	3,2	12	73	3,7	
7	5,1	---	3,3	20	69	3,7	
8	5,3	---	6,2	15	67	6,2	
9	6,5	---	8,7	12	64	7,1	
10	4,6	0,9	6,8	15	66	5,8	
feuilles	14,9	1,4	26,8	23	26	6,9	

2 - Diacylglycérols

La teneur en diacylglycérols est relativement basse dans l'akène imbibé. Elle augmente rapidement après 24 heures de germination. Cette augmentation provient de l'hydrolyse des triacylglycérols et serait le résultat d'une activité lipasique très importante au moment de la germination. Très vite, le taux des DAG diminue et les cotylédons s'enrichissent en acides gras libres (Fig. 17). Pendant les premiers jours de la germination on assiste graduellement au passage TAG → DAG → acides gras libres.

Le taux faible des DAG dans les cotylédons s'explique par le fait que cette catégorie lipidique est rapidement métabolisée. Elle sert d'intermédiaire entre les TAG qui s'hydrolysent et les lipides polaires qui se constituent.

L'analyse de la composition en acides gras des DAG montre un fort pourcentage d'acide linoléique (60%) en début de germination. Ce pourcentage diminue rapidement au cours de la croissance des cotylédons (20% après 10 jours de germination (tableau XIII).

Le pourcentage de l'acide linoléique varie beaucoup: s'il se trouve à l'état de traces en début de germination, ce taux s'élève brusquement après 24 heures d'exposition à la lumière puis diminue rapidement.

Le passage à la lumière modifie le pourcentage des acides gras saturés qui deviennent prépondérants dans les cotylédons verts. Dans les feuilles formées on note également un pourcentage important des acides gras saturés (60%).

TABLEAU XIII - Evolution de la composition des acides gras des DAG dans les cotylédons de Carthame en germination

DAG		Pour cent de la masse des acides gras totaux des					
		C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
lumière	jours après imbibition						
	1	16,5	4,4	8	12,5	57	----
	2	12,8	1,5	4	16,4	63	0,2
	3	10	0,9	3,5	15,9	65	3,5
	4	6	0,8	4,5	15,9	68	3,8
	5	12	1,4	9	17	54	4,8
	6	20	3,1	15	7	40	13
	7	16	1,9	16	13	45	6
	8	14	---	32	17	30	5
	9	13	---	35	15	29	6
	10	12	---	36	17	20	3
	feuilles	21	---	38	4,4	24	11

3 - Lipides polaires

Les lipides polaires sont présents en très faibles quantités en début de germination à l'obscurité où ils représentent 0,2% de la masse lipidique.

Dès que les plantules sont exposées à la lumière ce pourcentage augmente rapidement : il passe de 0,9% à 13% après 24 heures. Ce taux continue à croître rapidement avec la croissance des cotylédons. Après le 10^e jour de germination les lipides polaires représentent 84% des lipides totaux (tableau XIV).

La masse des lipides polaires atteint un maximum au 8^e jour puis diminue légèrement (Fig. 17). La diminution des phospholipides dans les cotylédons en germination a été également observée par ICHIHARA et NODA dans les cotylédons de Carthame (1981).

La diminution des lipides neutres et l'augmentation des lipides polaires est un des caractères marquants de la transformation physiologique des cotylédons ; d'organes de réserves, ils se transforment en organes assimilateurs.

TABLEAU XIV - Evolution des différentes catégories de lipides dans les cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

Jours après imbibition	Pour cent du poids total de lipides			
	TG	DAG	AGL	LP
1	98	0,7	0,2	0,2
2	96	2,6	0,4	0,6
3	97	0,9	0,4	0,7
4	94	1,5	2	0,9
lumière				
5	80	3,3	1,9	13
6	28	4,9	1,5	64
7	12	5	2	79
8	12	3,5	2	80
9	6,8	2,5	5,4	84
10	8	5	1,6	84

L'analyse des différents lipides polaires montre des variations importantes au cours de la germination. Pendant les premiers jours les phospholipides sont prépondérants et représentent à peu près 80% des lipides polaires totaux.

Après passage à la lumière, ce sont les galactolipides qui sont synthétisés en abondance et leur pourcentage devient plus important que celui des phospholipides. Au 8^e jour, ils représentent 58% de lipides polaires (tableau XV). Le pourcentage de MGDG est toujours plus important que celui de DGDG. Après éclaircissement, nous notons une forte augmentation de MGDG alors que le % de DGDG diminue. Ce n'est que 48 heures après que ce % augmente et

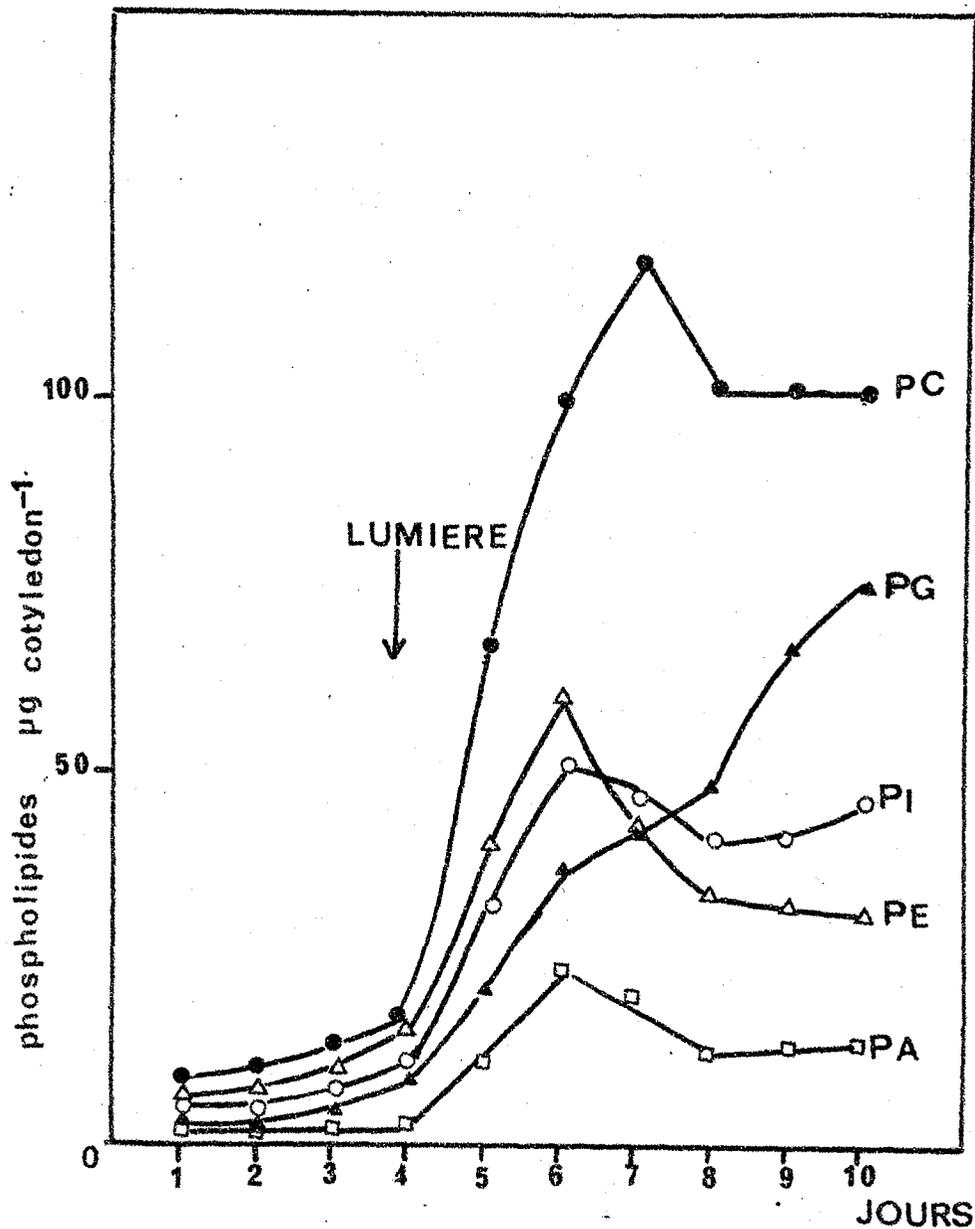


FIGURE 18 - Evolution des phospholipides des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

rattrape presque celui de MGDG (22% pour DGDG, 25 pour MGDG). En ce qui concerne les phospholipides, le pourcentage de PC est toujours majoritaire et varie très peu. Les changements notables touchent la PE qui baisse fortement les PA et PI qui diminuent faiblement. Ce n'est qu'après le 8^e jour que le % de PG s'accroît : il passe de 7% à 14%.

TABLEAU XV - Evolution des différents types de lipides polaires dans les cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

		Pour cent du poids des lipides polaires								
jours après		PI	PC	PG	PE	PA	PLT	DGDG	MGDG	GL
imbibition										
Lumière	1	18	25	7	20	9	80	8	10	19
	2	13	22	12	21	8	77	10	12	21
	3	15	25	10	23	7	79	10	11	20
	4	13	22	11	19	5	72	12	14	27
	5	8	26	8	16	4	63	9	26	36
	6	10	18	6	11	4	51	22	25	48
	7	8	20	7	7	3	48	23	28	51
	8	7	18	7	5	2	41	26	32	58
	9	7	18	11	5	2	46	25	28	53
	10	8	20	14	5	2	51	23	24	48

GL : galactolipides totaux

PLT : phospholipides totaux

a - Phospholipides

Les phospholipides évoluent différemment au cours de la germination.

La PC est le phospholipide prédominant dans les cotylédons. Alors qu'elle est faiblement représentée pendant les quatre premiers jours, l'exposition à la lumière augmente fortement sa teneur. En 24 heures le taux passe de 14 µg/cotylédon à 66 µg/cotylédon. Ce taux continue à augmenter jusqu'au 7^{ème} jour puis décroît et se stabilise entre les 8^{ème} et 10^{ème} jours (Fig. 18).

L'étude des pourcentages des acides gras de la PC montre que l'acide linoléique est abondant tout au long de la germination. Après passage des plantules à la lumière, la PC s'enrichit en acide linoléique aux dépens des acides oléique et linoléique (tableau XVI).

TABLEAU XVI - Evolution de la composition en acides gras de la phosphatidylcholine des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

jours après imbibition	Pour cent du poids des acides gras de PC					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	9,9	3	9	30	45	0,65
2	13	2	23	25	33	1
3	11	0,3	17	28	35	5
4	15	1	12	9	49	11
lumière						
5	10	0,9	8	9	50	19
6	9	1	8	48	23	
7	16	1	7	8	50	15
8	16	1	4	7	51	17
9	20	2	5	6	42	23
10	15	0,8	4	12	45	21

Le PG est faiblement synthétisé au début de la croissance des cotylédons. Son taux continue à s'accroître progressivement. Après dix jours d'éclairement le PG est le phospholipide le plus important après la PC.

La composition en acide gras est caractérisée par une prépondérance de l'acide palmitique (C_{16:0}) et la présence de l'acide Δ_3 -trans-héxadécénoïque (C_{16:1}). L'acide oléique (18:1) très important les premiers jours diminue au profit de l'acide linoléique et de l'acide linoléique (tableau XVII).

L'évolution de PI, PE et PA est identique. Les teneurs augmentent jusqu'au 6^e jour de croissance, diminuent entre le 6^e et 8^e jours puis se stabilisent, alors que les valeurs de PI et PE sont avoisinantes, et celle du PA est beaucoup plus faible.

La composition en acides gras de ces phospholipides montre une prédominance de l'acide palmitique pour le PI et le PA, l'acide linoléique pour la PE. Dans ces phospholipides l'acide linoléique est faiblement représenté et ne dépasse pas 10% (tableaux XVIII, XIX, XX).

TABLEAU XVII - Evolution de la composition en acides gras du phosphatidylglycérol des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

jours après imbibition	Pour cent du poids des acides gras de PG					
	C _{16:0}	C _{16:1} -trans	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	14	6	22	43	10	2
2	33	12	14	25	12	2
3	31	13	15	23	13	5
4	29	13	20	27	10	--
5	30	3	16	15	23	11
6	30	3	13	17	25	11
7	33	5	10	16	24	11
8	29	3	10	16	28	11
9	31	8	8	15	21	15
10	29	9	8	15	22	15

TABLEAU XVIII - Evolution de la composition en acides gras du phosphatidylinositol des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

jours après imbibition	Pour cent du poids des acides gras de PI					
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
1	27	-	14	20	37	-
2	20	-	15	23	37	4
3	28	2	14	12	39	2
4	27	2	16	13	34	5
5	26	1	16	10	43	2
6	19	4	14	23	34	4
7	23	4	23	23	22	2
8	25	3	12	13	40	5
9	25	4	12	18	37	4
10	26	4	14	19	33	3

TABLEAU XIX - Evolution de la composition en acides gras de la phosphatidyl-éthanolamine des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

jours après imbibition	Pour cent du poids des acides gras de PE						
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
1	16	2	9	19	48	2	
2	20	5	9	20	43	3	
3	20	2	8	13	50	5	
4	20	1	10	12	52	4	
lumière	5	15	1	12	9	55	6
6	12	1	10	15	52	7	
7	19	3	7	12	49	6	
8	20	3	8	11	50	7	
9	21	3	8	13	46	9	
10	20	4	9	12	47	7	

TABLEAU XX - Evolution de la composition en acides gras de l'acide phosphatidique des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

jours après imbibition	Pour cent du poids des acides gras de PA						
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
1	19	4	23	33	18	2	
2	19	3	20	35	20	2	
3	23	4	21	28	20	3	
4	19	4	25	27	19	4	
lumière	5	20	5	25	33	15	-
6	21	7	20	28	18	3	
7	24	6	24	27	11	8	
8	23	4	22	27	16	7	
9	25	6	20	22	20	5	
10	24	6	20	25	21	3	

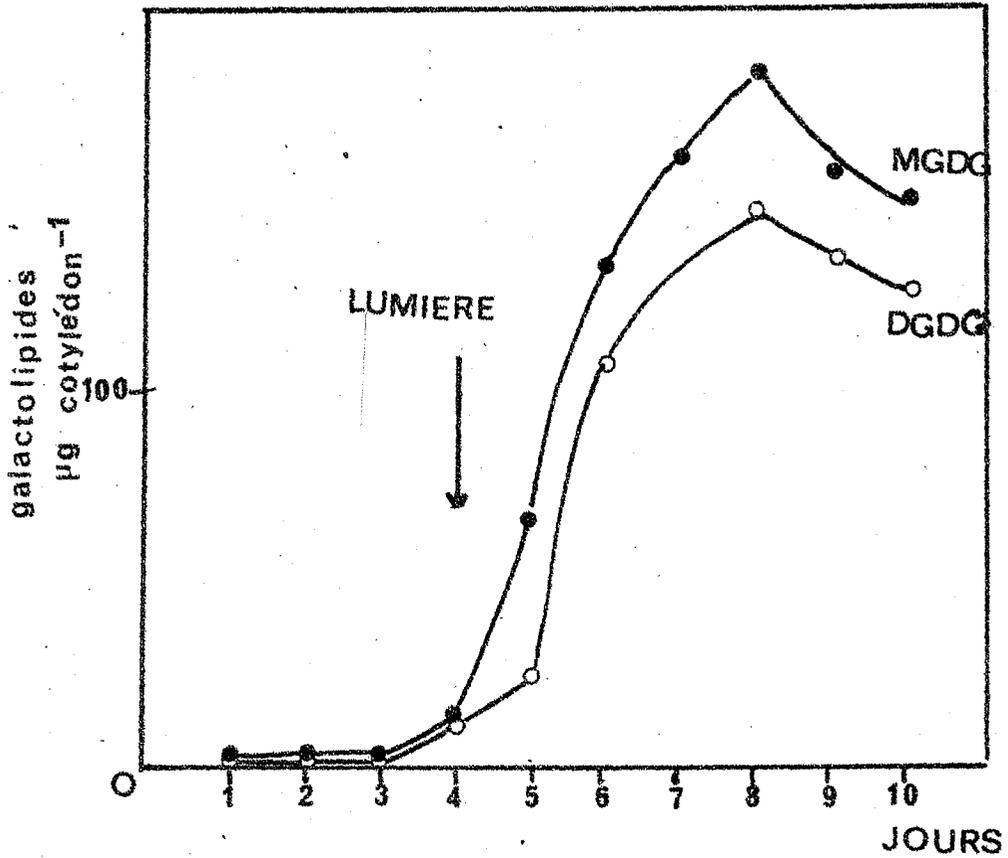


FIGURE 19 - Evolution des galactolipides dans les cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

b - Galactolipides

Les galactolipides, constituants des membranes chloroplastiques, sont très activement synthétisés lors du verdissement des cotylédons. La synthèse du MGDG est constamment plus importante que celle de DGDG. Après 24 heures d'exposition à la lumière le taux de MGDG augmente de 6 fois alors que celui de DGDG n'augmente que de 2 fois. Nous notons la situation inverse après 48 heures : la teneur de DGDG a augmenté de 5 fois et celle de MGDG de deux fois (fig. 19). Le rapport du taux MGDG/DGDG dans les cotylédons non éclairés est de 1,1. Après 24 heures de lumière il s'élève à 2,8 puis se stabilise à 1,1 jusqu'au 10^e jour de croissance.

La composition en acides gras de MGDG est différente de celle de DGDG (tableaux XXI, XXII). Le DGDG est plus riche en C_{16:0} alors que le % de l'acide linoléique est plus important dans le MGDG.

La composition en acides gras des deux galactolipides accuse des modifications importantes au cours de la germination. Dans ces deux catégories lipidiques l'acide oléique diminue avec l'apparition de l'acide linoléique.

Notons que l'acide linoléique devient prédominant au 4^e jour dans les cotylédons non éclairés : il représente 40% dans le MGDG et 35% dans le DGDG. L'éclairement stimule considérablement la synthèse de cet acide : il forme en fin de développement 80% dans le MGDG et 70% dans le DGDG.

TABLEAU XXI - Evolution de la composition en acides gras du MGDG dans les cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

		Pour cent du poids des acides gras du MGDG					
jours après imbibition		C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:2}
lumière	1	15	1	18	30	27	6
	2	15	1,5	15	24	40	4
	3	14	1,5	18	20	31	14
	4	7	1,4	12	10	27	40
	5	3	0,6	4	4	8	80
	6	2,5	0,5	2	4	8	81
	7	7	2,3	2	5	7	76
	8	4	2	2	4	8	78
	9	4	1	2	4	8	80
	10	3	1	4	3	7	81

TABLEAU XXII - Evolution de la composition en acides gras de DGDG des cotylédons de Carthame au cours de la croissance des plantules

jours après imbibition	Pour cent du poids des acides gras du DGDG						
	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
1	14	2	29	30	20	4	
2	14	2	19	30	28	7	
3	15	3	17	19	11	16	
4	12	3	13	19	23	30	
lumière	5	8	0,8	12	5	10	61
6	10	2	13	9	8	56	
7	11	1	11	9	11	53	
8	18	2	5	9	10	56	
9	10	1	5	6	11	66	
10	10	0,9	5	5	11	66	

Conclusion

Lors de la germination, la principale source de carbone et d'énergie dans les cotylédons est formée par les triacylglycérols riches en acide linoléique. Cette catégorie lipidique est rapidement dégradée avec apparition des diacylglycérols et acides gras libres. Cette activité catabolique paraît être stimulée par la lumière.

Une grande partie des acides gras est transformée par l'intermédiaire du cycle glyoxylique et du cycle de Krebs en glucose nécessaire à la croissance de la plantule. Une autre partie des acides gras est sans doute directement réutilisée et sert à la synthèse des lipides polaires. En effet, à ce stade dans les cotylédons, la synthèse des lipides polaires n'est pas "une synthèse *de novo*" (ICHIHARA et NODA, 1981). L'acide gras prédominant en début de germination C_{18:2} diminue rapidement alors que le taux de l'acide linoléique (C_{18:3}) augmente. Ce phénomène est accentué par la lumière. Des résultats comparables ont été trouvés lors du verdissement du Pois (TREMOLIERES et LEPAGE, 1971), des feuilles d'Avoine (OHNISHI et YAMADA, 1983), des feuilles de Maïs (HAWKE *et al.*, 1974), ou de feuilles de Concombre (MURPHY et STUMPF, 1979a). L'hydrolyse des lipides neutres s'accompagne d'une synthèse active des lipides polaires constituants des membranes cellulaires.

En début de germination, la teneur des phospholipides est plus importante avec PC comme catégorie prédominante alors que celle des galactolipides est très faible. Avec l'éclairement des plantules les galactolipides et le PG deviennent prépondérants. Ces transformations des catégories lipidiques sont en rapport avec la transformation des étiooplastes en chloroplastes.

La synthèse des phospholipides a fait l'objet de plusieurs travaux. Elle se fait selon le schéma rappelé par MAZLIAK *et al.* (1982). Le site principal de biosynthèse est le réticulum endoplasmique. Les phospholipides sont ensuite transférés dans les mitochondries, glyoxysomes, plastes ou les membranes cytoplasmiques.

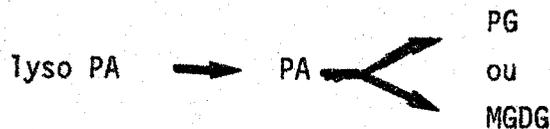
Les galactolipides sont synthétisés dans l'enveloppe du plaste à partir des DAG et de l'UDP-galactose (DOUCE et JOYARD, 1980). L'origine des DAG est controversée. Ces molécules peuvent provenir soit du réticulum endoplasmique et dériver de la PC, soit du plaste et dériver du PA (ROUGHAN et SLACK, 1982). Les galactolipides renferment un pourcentage très élevé d'acide linoléique (80% pour le MGDG). La biosynthèse de cet acide gras tri insaturé n'est encore pas bien comprise.

La synthèse de "novo" des acides gras saturés et mono-insaturés a lieu dans les plastes (STUMPF, 1980). L'acide oléique synthétisé dans le chloroplaste est en grande partie exporté dans le cytoplasme puis désaturé en acide linoléique et linoléique. Trois voies de désaturation ont été proposées dans la littérature:

1 - l'acide oléique, exporté du chloroplaste est incorporé en position 2 de la PC du réticulum endoplasmique puis désaturé en acides linoléique et linoléique. C'est la voie "eucaryote" qui prédomine largement dans les plantes en C_{18:3} (ROUGHAN, 1970 ; SLACK et ROUGHAN, 1975 ; WILLIAMS *et al.*, 1976 ; GARDINER *et al.*, 1982 ; HEINZ et ROUGHAN, 1983).

2 - Une variante de la "voie eucaryote" propose que l'acide linoléique de la PC pourrait être transporté par des protéines de transfert des phospholipides vers le chloroplaste pour être désaturé en acide linoléique après formation de DAG galactosylés en MGDG (TREMOLIERES *et al.*, 1979 ; DRAPIER *et al.*, 1982 ; OHNISHI et YAMADA, 1982).

3 - La fraction de l'acide oléique qui n'est pas exportée dans le cytoplasme serait estérifiée au glycérophosphate en position 1 à l'intérieur du chloroplaste pour donner successivement:



et l'on pourrait envisager des désaturations internes au chloroplaste

PG-C_{18:1} \longrightarrow PG-C_{18:2} \longrightarrow PG-C_{18:3}
par exemple. C'est la "voie procaryote" bien représentée dans les plantes en C_{16:3} (ROUGHAN *et al.*, 1979).

On a proposé que les trioses phosphate synthétisés dans le chloroplaste soient transformés en acétate dans les mitochondries. Cet acétate serait transporté en retour vers le chloroplaste et servirait de substrat pour la biosynthèse des acides gras saturés et mono-insaturés (ROUGHAN et SLACK, 1977 ; MURPHY et STUMPF, 1981). En fait ces transferts de carbone existent peut être dans les cellules foliaires d'Epinard, mais on ne les trouve sans doute pas dans de nombreuses espèces.

Notre étude de la transformation des lipides au cours de la germination nous a permis de suivre la biosynthèse de l'acide linoléique, acide gras concentré dans les galactolipides. Cette synthèse a lieu principalement le 5^e jour après la germination dans les cotylédons éclairés depuis 24 heures. C'est pour cette raison que toutes les études métaboliques ultérieures ont été réalisées à ce stade de développement des plantules.

CHAPITRE IV

ETUDE DU METABOLISME LIPIDIQUE DANS LES PLANTULES EN CROISSANCE

Cette étude comprend en grande partie des expériences réalisées *in vivo*, à l'aide de précurseurs radioactifs $[1-^{14}C]$ -acétate, $[1-^{14}C]$ -oléate et $[1-^{14}C]$ -linoléate déposés sur les cotylédons. Le fractionnement cellulaire après marquage avec le $[1-^{14}C]$ -linoléate nous permettra d'identifier les organites cellulaires impliqués dans la désaturation de linoléate ou linoléate. Enfin, les expériences "*in vitro*" nous permettront de vérifier les résultats obtenus avec l'étude "*in vivo*".

A - ETUDE *IN VIVO* DES VOIES METABOLIQUES

1 - Incorporation de $[1-^{14}C]$ -acétate

Le précurseur déposé en microgouttes sur les cotylédons pénètre difficilement dans les tissus ; 12% seulement sont incorporés dans la fraction lipidique. L'incorporation dans les lipides totaux ne se produit que pendant 3 heures. Des temps plus longs (24 h) ne l'augmentent pas.

2 - Incorporation dans les acides gras totaux

Le tableau XXIII représente le pourcentage d'incorporation de $[1-^{14}C]$ -acétate dans les acides gras totaux.

TABLEAU XXIII - Cinétique d'incorporation du $[1-^{14}C]$ -acétate dans les acides gras totaux de cotylédons de Carthame. 20 nmoles de $[1-^{14}C]$ -acétate ont été déposées sur des plantules de 5 jours.

Temps	Incorporation totale (nmoles)	Incorporation dans les acides gras totaux	Incorporation (%) dans les acides gras					
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
30 mn	3,65	2,2	70	--	--	23	5	--
1 h	8,70	4,6	61	--	--	27	8	--
1 h 30	10,41	4,8	59	--	--	23	13	--
2 h	14,3	7,1	58	--	--	23	18	--
3 h	16,8	8,0	54	14	2	15	10	--
24 h	15,2	9,1	45	26	1	3	13	9,5

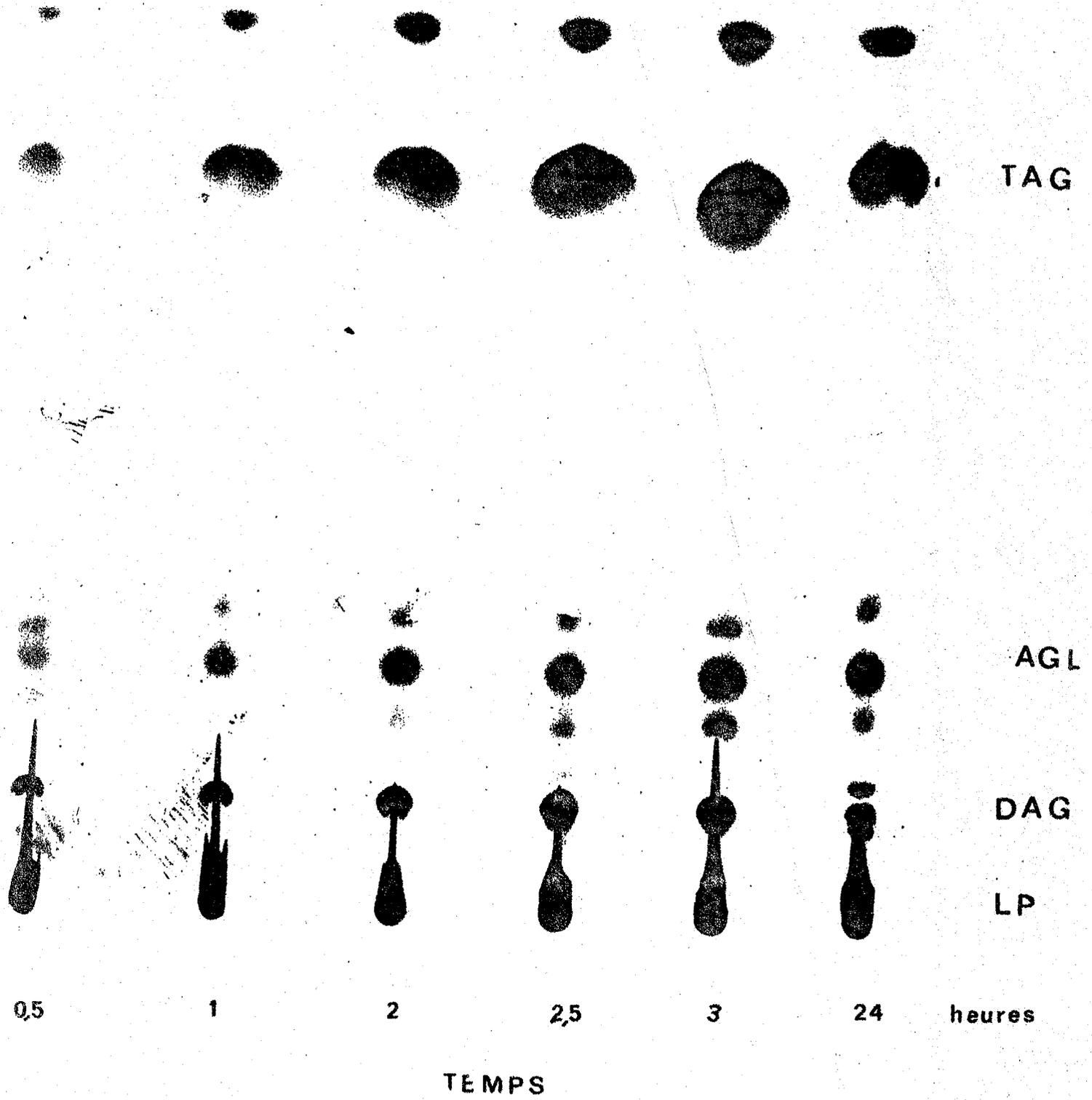


FIGURE 20 A - Autoradiographies de l'incorporation *in vivo* de $[1-^{14}C]$ -acétate dans les catégories lipidiques de cotylédons de Carthame

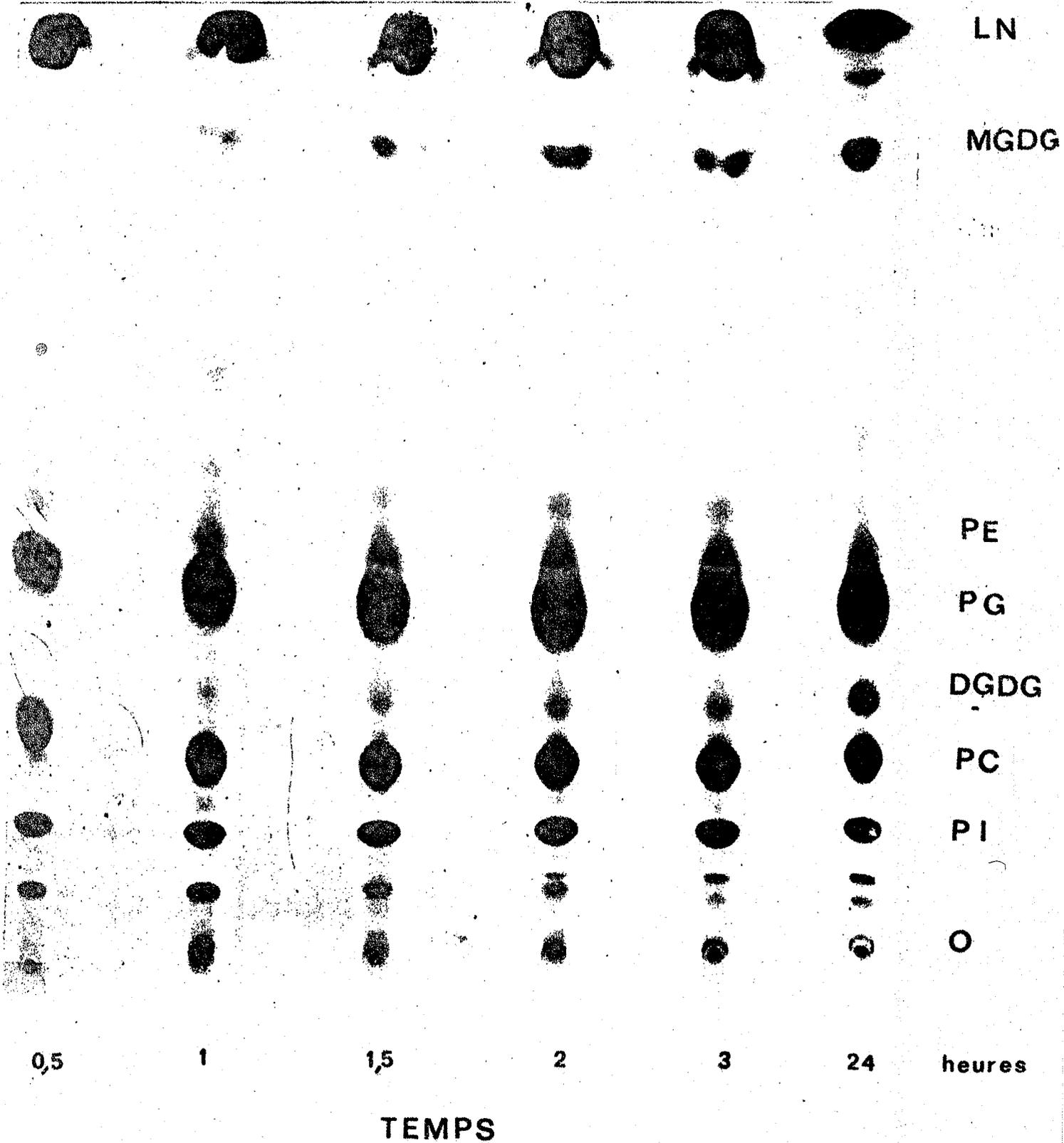


FIGURE 20 B - Autoradiographies de l'incorporation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate dans les phospholipides de cotylédons de Carthame

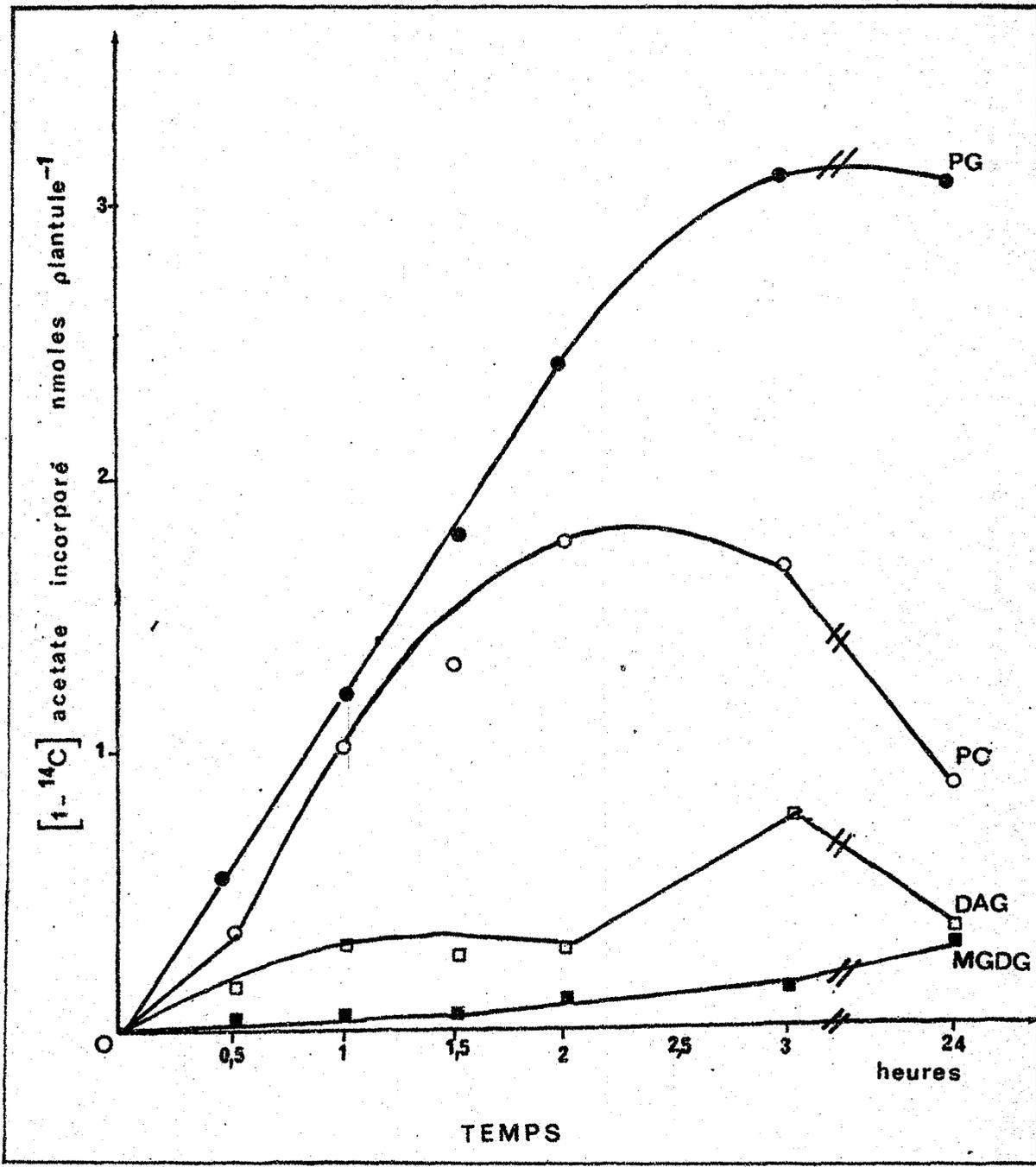


FIGURE 21 - Cinétique d'incorporation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate dans les catégories lipidiques de cotylédons de Carthame

Les acides gras saturés et surtout l'acide palmitique ($C_{16:0}$) sont fortement marqués après 30 mn de dépôt du précurseur. Ils restent majoritairement marqués pendant toute la durée de l'expérience.

Au-delà d'une heure de marquage, le pourcentage de l'acide oléique diminue alors que celui de l'acide linoléique augmente.

L'acide linoléique reste faiblement marqué (9%) après 24 heures.

3 - Incorporation dans les catégories lipidiques

Le $[1-^{14}C]$ -acétate est principalement incorporé dans les phospholipides : 80% de la radioactivité se retrouve dans cette catégorie lipidique. Le pourcentage de radioactivité dans les DAG (10% après 30 mn) diminue au cours des heures suivantes (tableau XXIV). L'augmentation du pourcentage dans les TAG après 24 heures montre qu'il y a une synthèse légère de ces lipides neutres dans les cotylédons.

Les catégories de phospholipides les plus marquées sont le PG et la PC. Le PI incorpore 14% de radioactivité, alors que le PE et PA sont faiblement marqués. La radioactivité détectée dans les galactolipides reste faible. Cependant le pourcentage de radioactivité du MGDG est plus important que celui retrouvé dans le DGDG.

La cinétique de l'incorporation du $[1-^{14}C]$ -acétate montre que l'incorporation n'est pas la même pour toutes les catégories lipidiques (Fig. 20 A, B et 21).

TABLEAU XXIV - Cinétique de l'incorporation de $[1-^{14}C]$ -acétate dans les catégories lipidiques des cotylédons de Carthame. 20 nmoles de $[1-^{14}C]$ -acétate ont été déposées sur les plantules.

Temps	Incorporation (en %)										
	TAG	DAG	PL totaux	Lyso PC	PI	PC	PG	PE	PA	MGDG	DGDG
30 mn	10	10	69	4	14	31	40	3	2	1	0,1
1 h	9	8	78	3	11	34	40	4	2	1	0,1
1 h 30	9	5,8	79	1	12	37	40	3	1	1	1
2 h	10	4	80	1	12	32	45	3	0,9	2	2
3 h	11	9	73	1	11	27	51	3	0,5	2	2
24 h	13	4	72	1	5	17	60	2	0,1	6	4

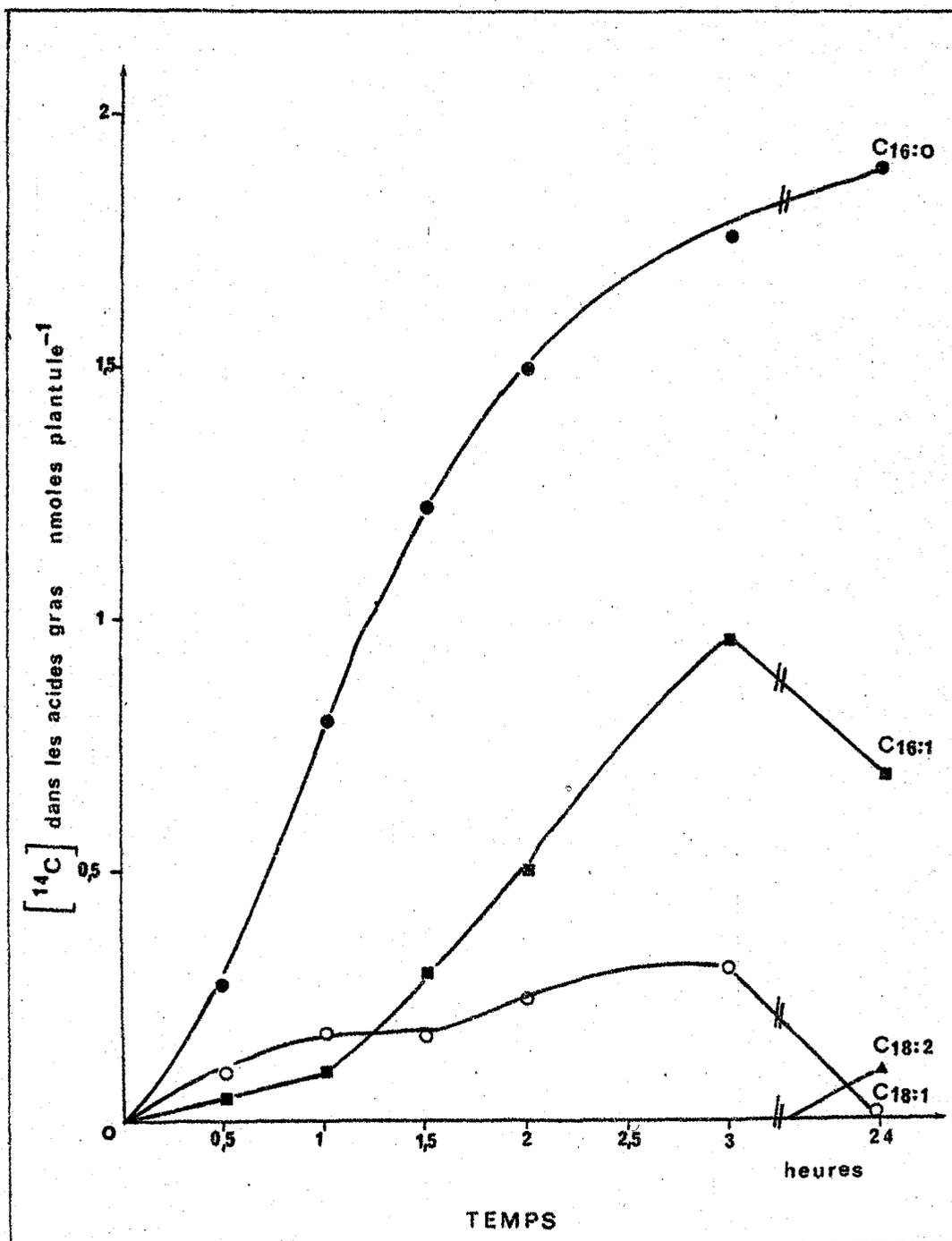


FIGURE 22 - Répartition de la radioactivité incorporée dans les acides gras du phosphatidylglycérol de cotylédons de Carthame marqués à $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate

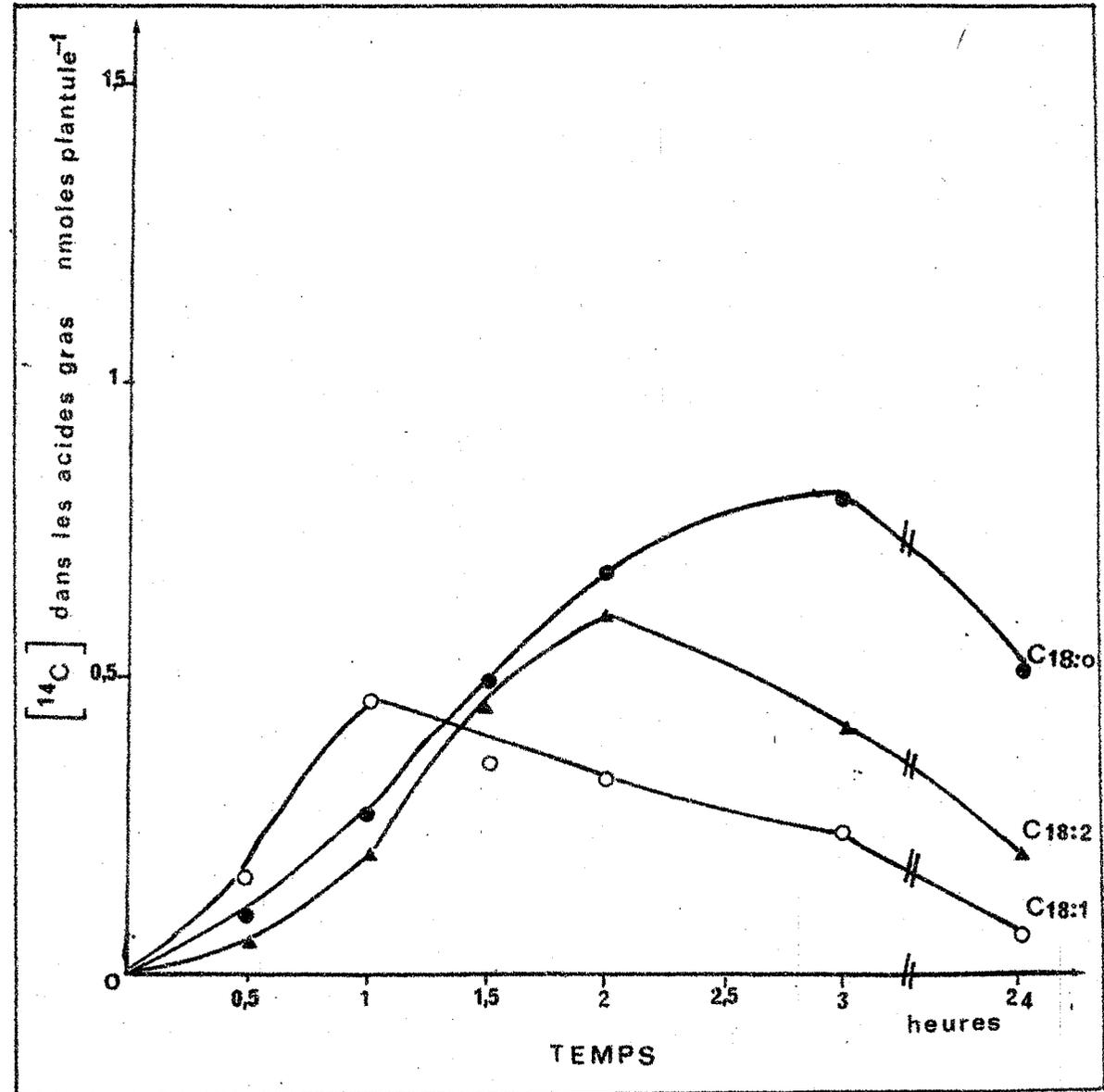


FIGURE 23 - Répartition de la radioactivité incorporée dans les acides gras de la phosphatidylcholine de cotylédons de Carthame marqués à [1- ^{14}C]-acétate

L'incorporation du $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate dans le PG augmente rapidement jusqu'à 3 heures de marquage. Des temps plus longs n'augmentent plus cette incorporation.

Dans la PC, la radioactivité augmente pendant les deux premières heures puis ensuite la radioactivité diminue. Après 24 heures, la radioactivité dans la PC est environ le 1/4 de celle détectée à 2 heures.

Le MGDG se marque très lentement. Ce n'est qu'après 24 heures qu'on note une radioactivité significative.

Par contre la radioactivité dans les DAG est assez importante après 3 heures de marquage. Elle diminue cependant après des temps plus longs.

La cinétique d'incorporation de l'acétate radioactif suggère un transfert de la radioactivité entre les catégories suivantes : $\text{PC} \rightarrow \text{DAG} \rightarrow \text{MGDG}$. En effet quand la radioactivité de PC diminue, celle des DAG augmente ; quand la radioactivité de ces molécules diminue, celle du MGDG augmente.

4 - Incorporation dans les acides gras des catégories lipidiques

Dans le PG, l'acide palmitique ($\text{C}_{16:0}$) est l'acide gras le plus marqué (Fig. 22). A partir d'une heure d'incorporation la radioactivité dans l'acide cis-hexadécénoïque ($\text{C}_{16:1}$) commence à apparaître et augmente jusqu'à 3 heures. La radioactivité dans l'acide oléique ne représente que 10% de la radioactivité du PG et à 24 heures, cet acide n'est plus marqué. L'acide linoléique est très faiblement marqué.

La cinétique d'incorporation de l'acétate dans le PG s'accorde avec l'hypothèse selon laquelle l'acide palmitique serait désaturé en acide cis-hexadécénoïque. On note, une faible radioactivité de l'acide trans 3-hexadécénoïque dans le PG. Cet acide gras est synthétisé dans les lamelles du chloroplaste et impliqué dans la structure oligomérique du complexe chlorophylle-protéines de l'appareil photosynthétique (GUILLOT SALOMON *et al.*, 1980 ; DUBACQ et TREMOLIERES, 1983).

Dans la PC, l'acide gras le plus marqué après des temps très courts (1/2 h et 1 h) est l'acide oléique. A partir de 1 h 1/2 de marquage la radioactivité de l'acide oléique décroît alors que celle de l'acide linoléique augmente. Cette cinétique de marquage montre bien que dans cette catégorie lipidique a lieu la désaturation du $\text{C}_{18:1} \rightarrow \text{C}_{18:2}$. La radioactivité dans l'acide linoléique décroît avec le temps (entre 2 h et 3 h de marquage). L'acide linoléique n'est pas du tout marqué même pour des temps très longs (24 h) (Fig. 23).

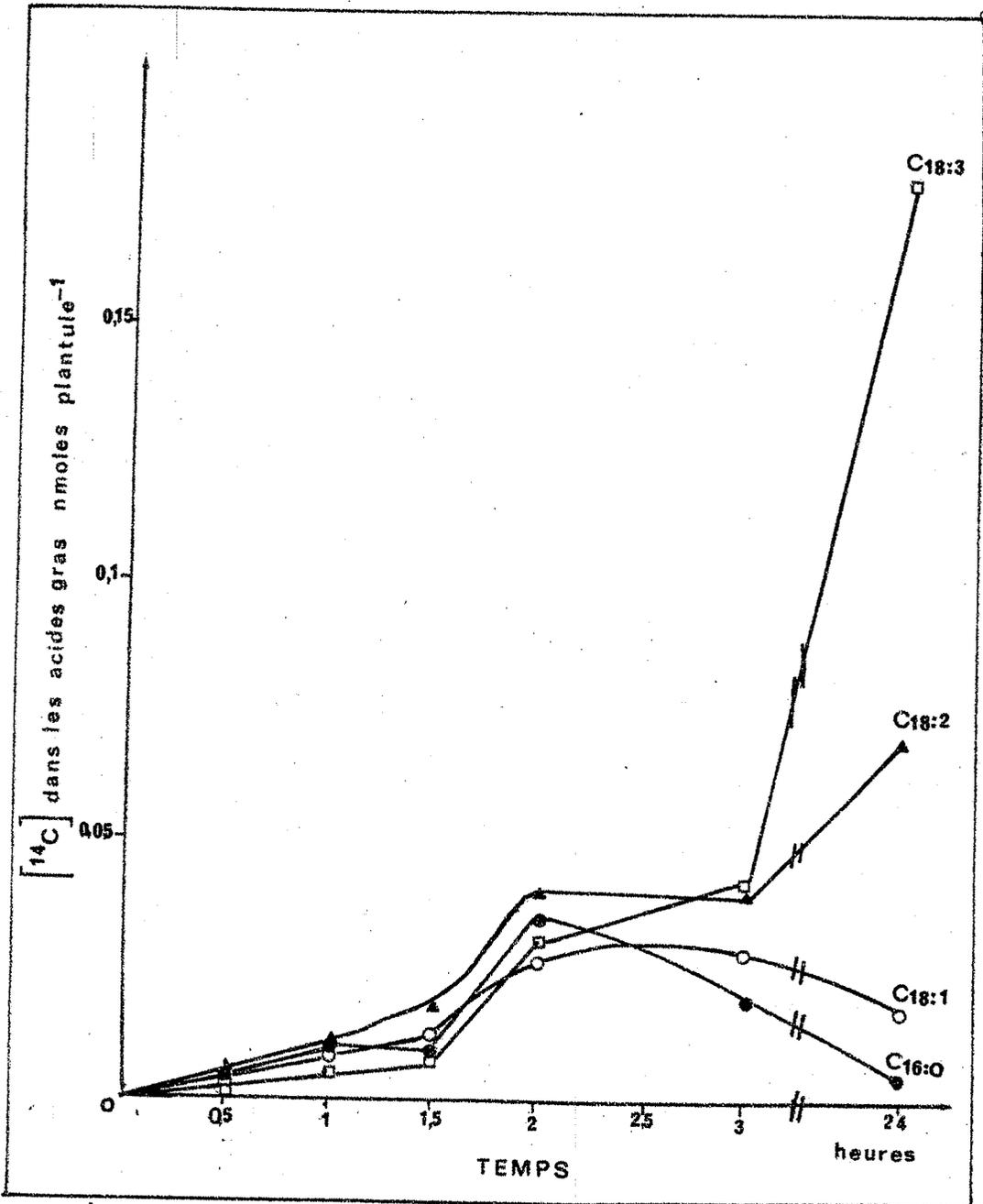


FIGURE 24 - Répartition de la radioactivité incorporée dans les acides gras du monogalactosyldiacylglycérol de cotylédons de Carthame marqués à $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate

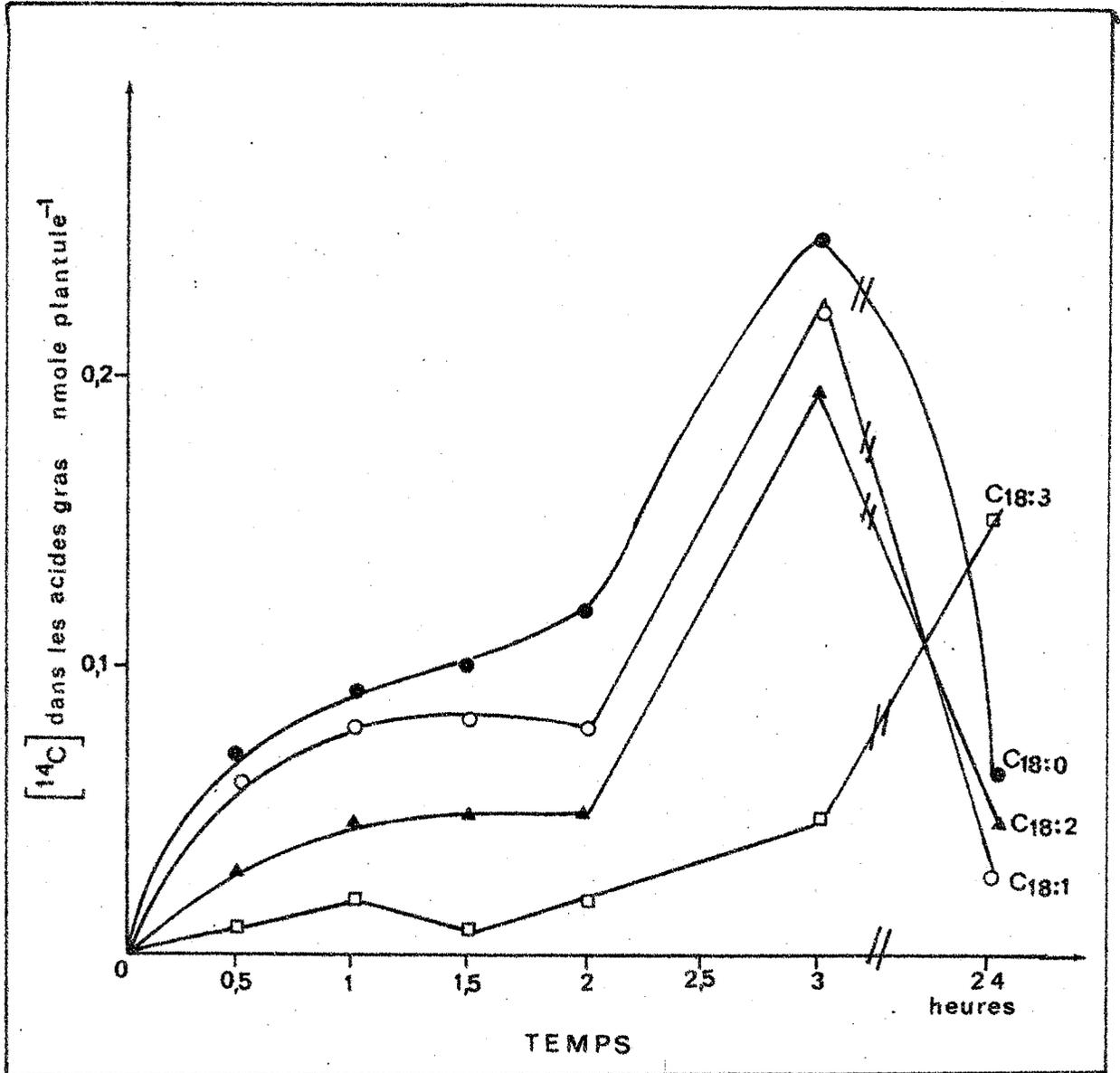


FIGURE 25 - Répartition de la radioactivité incorporée dans les acides gras des diacylglycérols de cotylédons de Carthame marqués à $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate

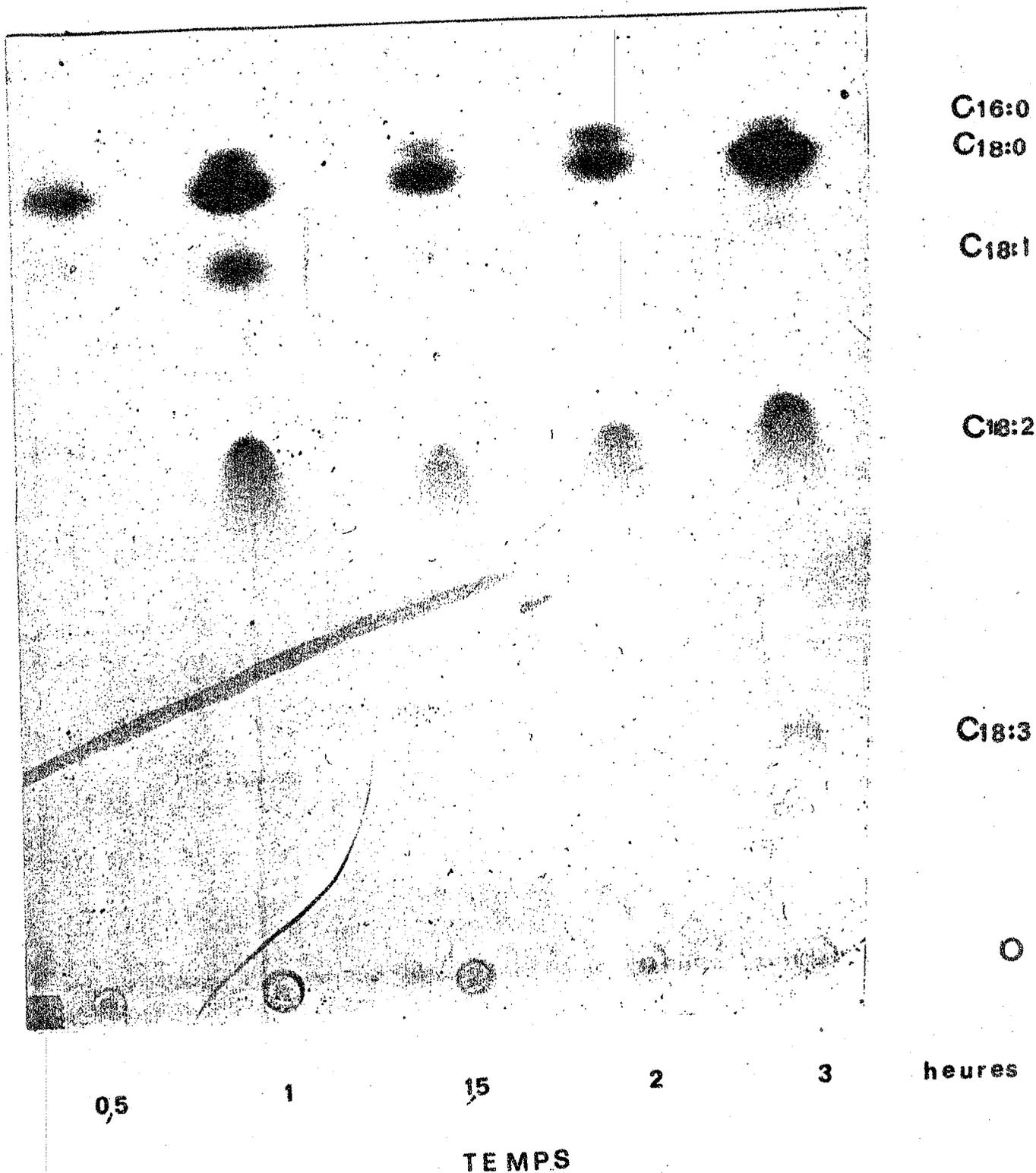


FIGURE 26 - Autoradiographie de l'incorporation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ acétate dans les diacylglycérols de cotylédons de Carthame

L'acétate est beaucoup moins fortement incorporé dans les galactolipides que dans les phospholipides. Dans le MGDG les acides gras saturés sont peu marqués. La radioactivité de l'acide oléique diminue alors que celles des acides linoléique et linoléinique augmentent avec le temps. Cependant la faible diminution de la radioactivité de l'acide oléique ne coïncide pas avec l'augmentation importante de celle de l'acide linoléinique (63% après 24 h d'incorporation). Ceci indique sans doute que la formation des acides linoléique et linoléinique a lieu dans une autre catégorie lipidique que le MGDG (Fig. 24).

Dans les lipides neutres, les TAG renferment un pourcentage assez important d'acides saturés et mono-insaturés marqués (tableau XXV). La radioactivité de l'acide linoléique augmente légèrement après 2 heures d'incorporation et celle de l'acide linoléinique diminue.

TABLEAU XXV - Cinétique d'incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate dans les acides gras des TAG. 20 nmoles de $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate ont été déposées sur les plantules de 5 jours.

Temps	% de la radioactivité totale des acides gras des TAG			
	$\text{C}_{16:0} + \text{C}_{18:0}$	$\text{C}_{18:1}$	$\text{C}_{18:2}$	$\text{C}_{18:3}$
30 mn	56	21	10	12
1 h	66	17	10	6
1 h 30	66	18	10	5
2 h	59	21	15	3
3 h	51	22	20	5
24 h	44	13	31	11

Comme dans la PC, l'acide gras le plus marqué des DAG est l'acide oléique pour les temps d'incorporation courts. Lors des temps de marquage plus longs (à partir de 2 heures) la radioactivité de l'acide linoléique augmente. C'est dans cette catégorie lipidique qu'apparaît l'acide linoléinique marqué (fig. 25). En effet, à partir de 2 heures d'incorporation, la radioactivité de l'acide linoléinique augmente. Jusqu'à 24 heures, le marquage de l'acide oléique diminue alors que celui de l'acide linoléinique augmente (Fig. 26). Cette cinétique d'incorporation suggère que la désaturation de l'acide linoléique en acide linoléinique a lieu dans les DAG.

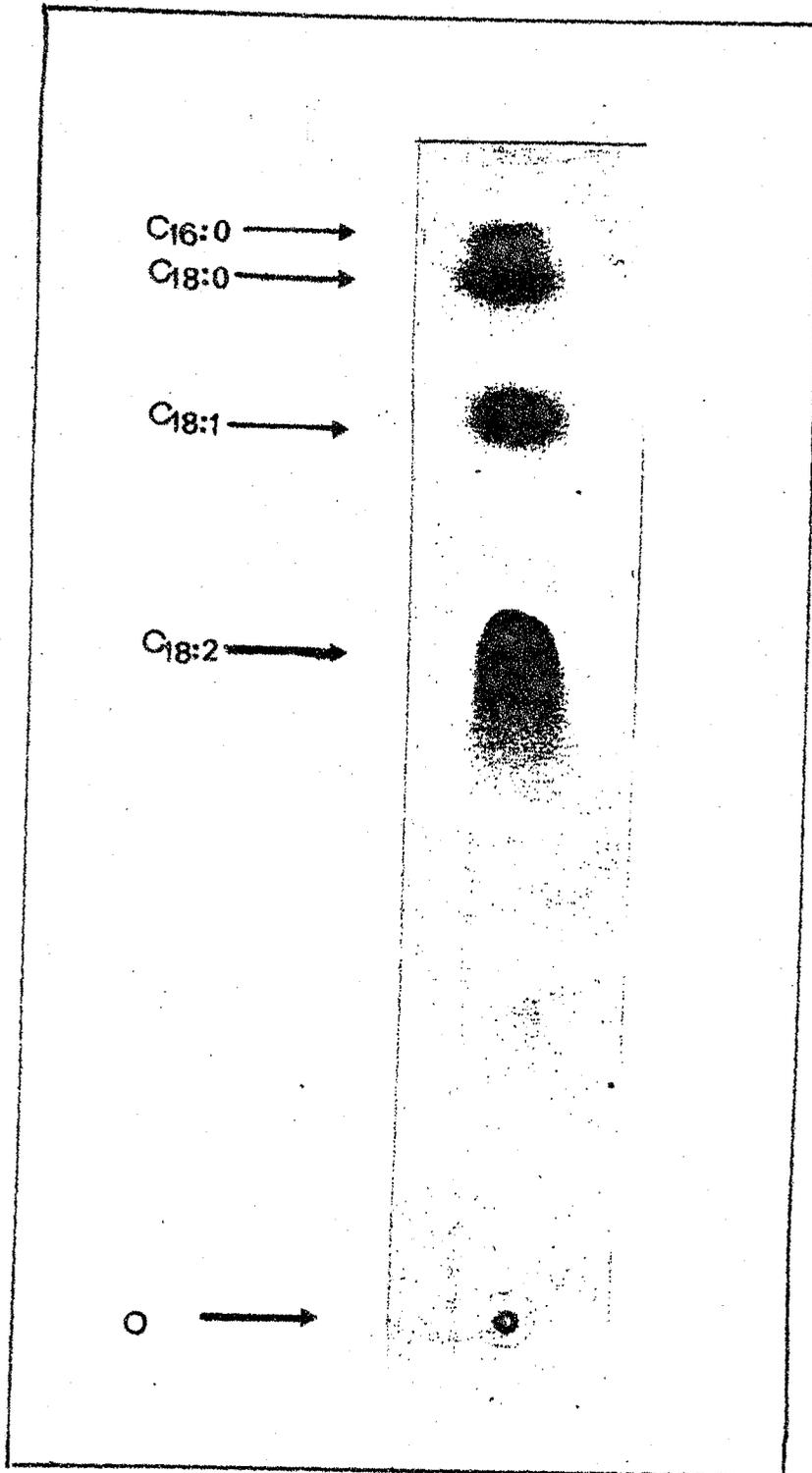


FIGURE 27 - Répartition de la radioactivité incorporée dans les acides gras de la phosphatidylcholine 1 heure après marquage à [1-¹⁴C]-acétate

Conclusion

Nos résultats montrent que l'acétate radioactif est rapidement incorporé dans les phospholipides des cotylédons (principalement dans le PG et la PC). Dans la littérature, la plupart des travaux effectués *in vivo* sur les feuilles de Courge (ROUGHAN, 1970), de Fève (WILLIAMS *et al.*, 1976), de Carthame (ICHIHARA et NODA, 1981), indiquent une incorporation plus importante dans la PC que dans le PG.

La cinétique d'incorporation de l'acétate dans ces deux phospholipides montre que dans le Carthame, la PC est fortement marquée lors des temps courts de marquage (jusqu'à 2 heures), mais le PG est déjà majoritairement radioactif et l'écart de marquage avec la PC s'accroît après 24 heures.

La diminution de la radioactivité dans la PC coïncide avec l'augmentation du marquage dans les DAG et le MGDG. Les DAG paraissent être impliqués dans la synthèse des galactolipides. Dans la cellule, les DAG pourraient se former à partir du PC (par action réverse de la CDP-choline transférase) ; ils seraient ensuite galactosylés pour donner le MGDG (SLACK et ROUGHAN, 1975 ; SLACK *et al.*, 1977 ; ROUGHAN et SLACK, 1982). Le faible marquage du DGDG pourrait indiquer que ce composé est synthétisé à partir du MGDG. La synthèse des galactolipides se ferait donc de la façon suivante :



L'étude de la radioactivité des acides gras montre que l'oléate est rapidement désaturé en linoléate dans la PC. Nous n'avons pas détecté de linoléate radioactif dans la PC, même pour des temps de marquage très longs (fig. 27). Nos résultats indiquent que pour des temps de marquage courts (3 h), le pourcentage de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate marqué le plus élevé se trouve dans les diacylglycérols. Puis la radioactivité du linoléate diminue dans cette catégorie alors qu'elle augmente dans le MGDG. La désaturation $\text{C}_{18:2} \rightarrow \text{C}_{18:3}$ semble donc se faire à l'intérieur de la catégorie des DAG.

Nos résultats sont en accord avec ceux de SLACK *et al.* (1977), WILLIAMS (1980), LEM et WILLIAMS (1983). ces derniers auteurs proposent deux molécules supports des désaturations pour expliquer la synthèse de l'acide linoléique.

- Une première molécule serait le MGDG.
- Une deuxième molécule serait représentée par les diacylglycérols.

La cinétique d'incorporation de l'acétate montre que le PG pourrait également être impliqué dans la synthèse des galactolipides. La formation de l'acide cis-hexadécénoïque est réalisée à partir de l'acide palmitique. La baisse de la radioactivité de l'acide oléique après 24 heures de marquage indique que cet acide gras est transféré dans une autre catégorie lipidique peut être le MGDG. Les travaux de WILLIAMS *et al.* (1976), WILLIAMS (1980) suggèrent que les acides gras saturés du MGDG proviennent de PG.

En conclusion, à la suite des résultats obtenus avec l'acétate radioactif, la voie de synthèse des galactolipides peut être schématisée de la façon suivante :

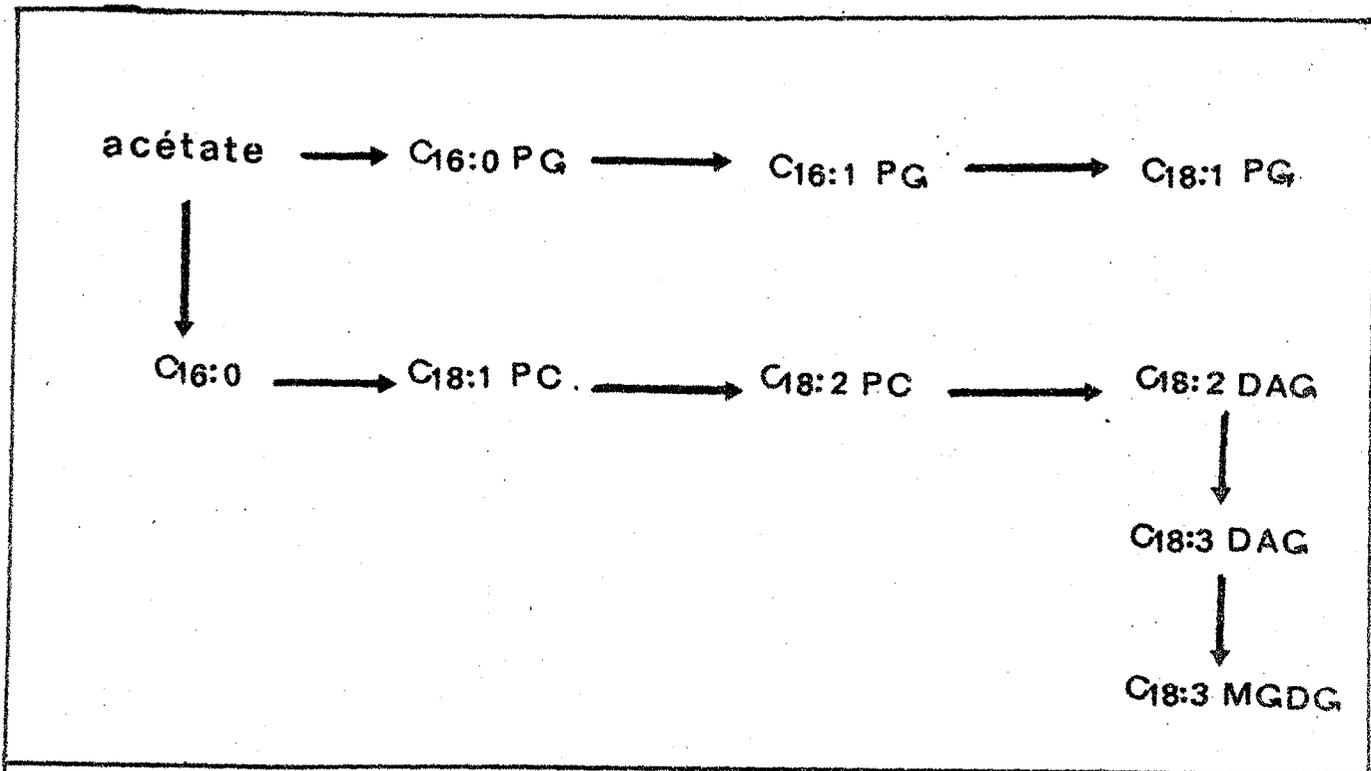


Schéma VII - Voie de synthèse de galactolipides à partir de 1-¹⁴C -acétate

B - ETUDE DES MECANISMES DE DESATURATION IN VIVO

Les résultats obtenus avec l'acétate montrent que la désaturation de l'acide linoléique en acide linoléique pourrait avoir lieu dans les DAG. Il nous a paru intéressant de confirmer cette proposition originale en utilisant des précurseurs directs de l'acide linoléique à savoir le $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate et le $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate. Les deux précurseurs utilisés sont fournis aux cotylédons de 5 jours sous forme de gouttelettes de solutions de sels d'ammonium.

1 - Etude du marquage des lipides à partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate

a - Incorporation dans la fraction lipidique

L'oléate marqué est très bien incorporé dans les cellules. L'incorporation dans la fraction lipidique est de 50% de la radioactivité fournie après 3 heures de marquage. A 24 heures, toute la radioactivité déposée sur les cotylédons se retrouve dans les lipides (tableau XXVI).

TABLEAU XXVI - Incorporation et désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate- NH_4 par des cotylédons de Carthame

Temps	Incorporation dans la frac- tion lipidique nmoles/plantule	Incorporation dans les acides gras totaux nmoles/plantule	Pourcentage de désaturation dans les acides gras totaux		
			$\text{C}_{18:1}$	$\text{C}_{18:2}$	$\text{C}_{18:3}$
30 mn	11,8	11,5	97	2,7	-
1 h	14,2	14	94	5,7	-
1 h 30	36,7	31	93	6,7	-
2 h	42,6	38	92,8	7,2	-
3 h	46	41	87	12	-
24 h	95,7*	77,6	78	20	2

* 100 nmoles d' $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate NH_4 ont été déposés sur les plantules de 5 jours

b - Incorporation dans les acides gras totaux

L'incorporation de l'oléate dans les acides gras totaux suit celle de la fraction lipidique. On note cependant que l'on retrouve toujours un peu moins de radioactivité dans les acides gras totaux que dans les lipides extraits des cotylédons surtout pour les longs temps d'incorporation. On peut imaginer qu'une certaine β -oxydation du précurseur peut se produire dans les cotylédons et que l'acétate radioactif qui en résulte a servi à la synthèse

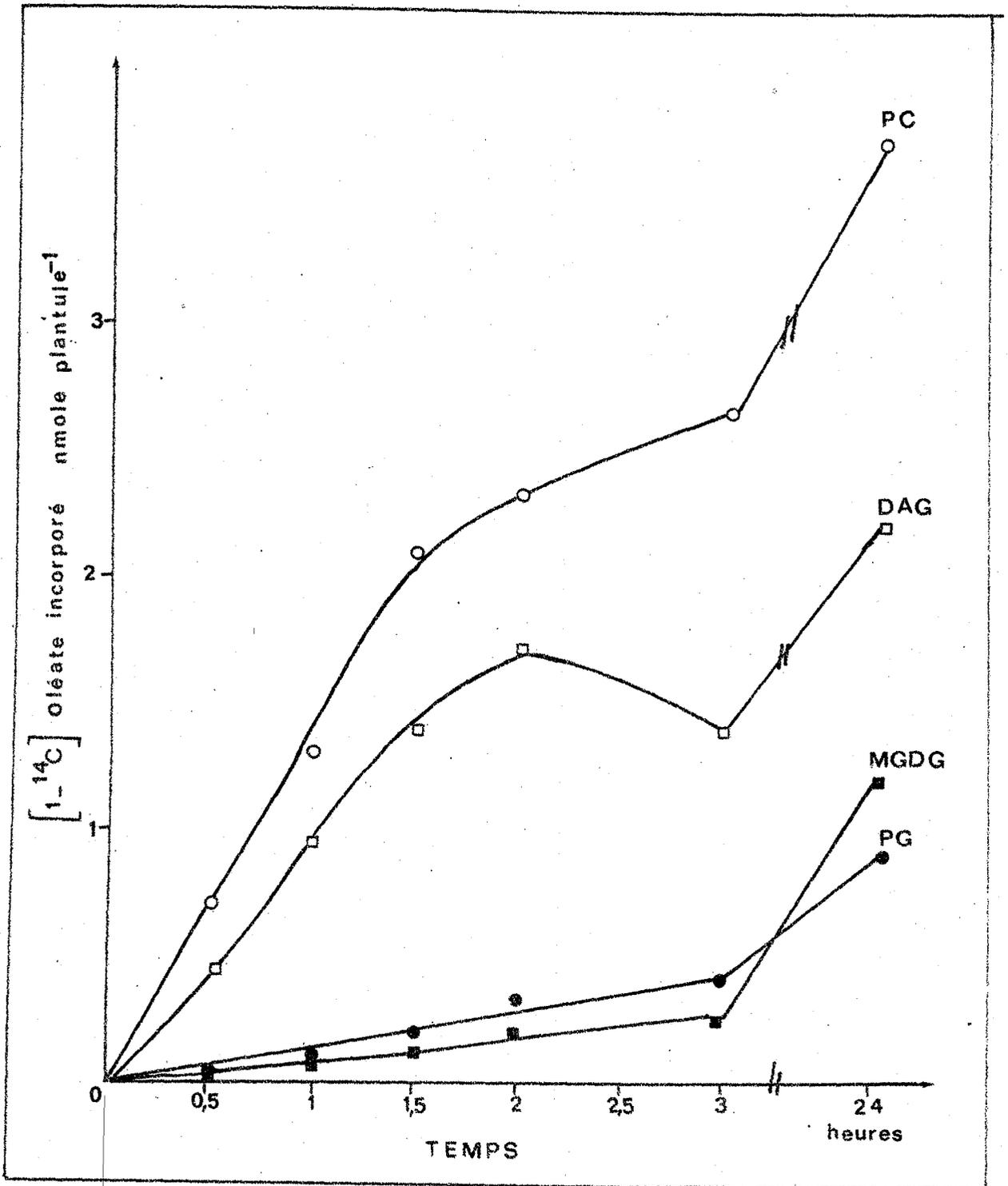


FIGURE 28 - Cinétique d'incorporation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate dans les catégories lipidiques de cotylédons de Carthame

des parties polaires (glycérol, choline, éthanolamine, etc...) des lipides. La radioactivité dans les acides gras augmente avec le temps de marquage. Si on exprime la désaturation du précurseur en pourcentage de la radioactivité totale des acides gras retrouvés dans les acides linoléique et linoléique, la désaturation est très lente. Après 3 heures de marquage on retrouve 12% de radioactivité dans l'acide linoléique. Ce n'est qu'après 24 heures qu'on détecte l'acide linoléique radioactif et en très faible pourcentage (2%).

c - Incorporation dans les catégories lipidiques

La plus grande partie de la radioactivité fournie se trouve sous forme d'acides gras libres. A peu près 80% du précurseur n'est pas métabolisé. Parmi les catégories lipidiques, les phospholipides et les DAG sont les plus marqués (tableau XXVII). La cinétique d'incorporation montre une augmentation de la radioactivité dans les phospholipides avec le temps et une diminution de celle des DAG. Après 24 h d'incorporation, on remarque une incorporation de la radioactivité dans les TAG.

TABLEAU XXVII - Cinétique d'incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate NH_4 dans les catégories lipidiques (nmole/plantule) de cotylédons de Carthame

Temps	AGL	DAG	TAG	LP	PI	PC	PG	PE	PA	MGDG	DGDG
30 mn	9,6	0,7	0,2	0,8	0,05	0,5	0,02	0,03	0,01	0,08	0,02
1 h	11	0,9	0,2	1,7	0,06	1,3	0,1	0,04	0,03	0,12	0,03
1 h 30	26	1,4	0,5	2,7	0,10	2,1	0,2	0,03	0,05	0,13	0,03
2 h	32	1,7	0,6	3,2	0,13	2,3	0,35	0,03	0,08	0,2	0,1
3 h	35	1,4	0,7	3,9	0,17	2,5	0,4	0,03	0,2	0,25	0,15
24 h	51	2,2	4,4	19,2	0,4	3,7	0,9	0,1	0,5	1,2	0,5

100 nmoles de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate d' NH_4 ont été déposées sur les plantules de 5 jours

LP = Lipides polaires

Parmi les phospholipides, la PC est la plus marquée ; très rapidement le $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate est incorporé. Contrairement au marquage avec l'acétate, le PG est très peu marqué (fig. 28).

L'incorporation dans les galactolipides se fait très lentement. Ce n'est qu'après 24 heures de marquage que la radioactivité dans le MGDG atteint des valeurs significatives.

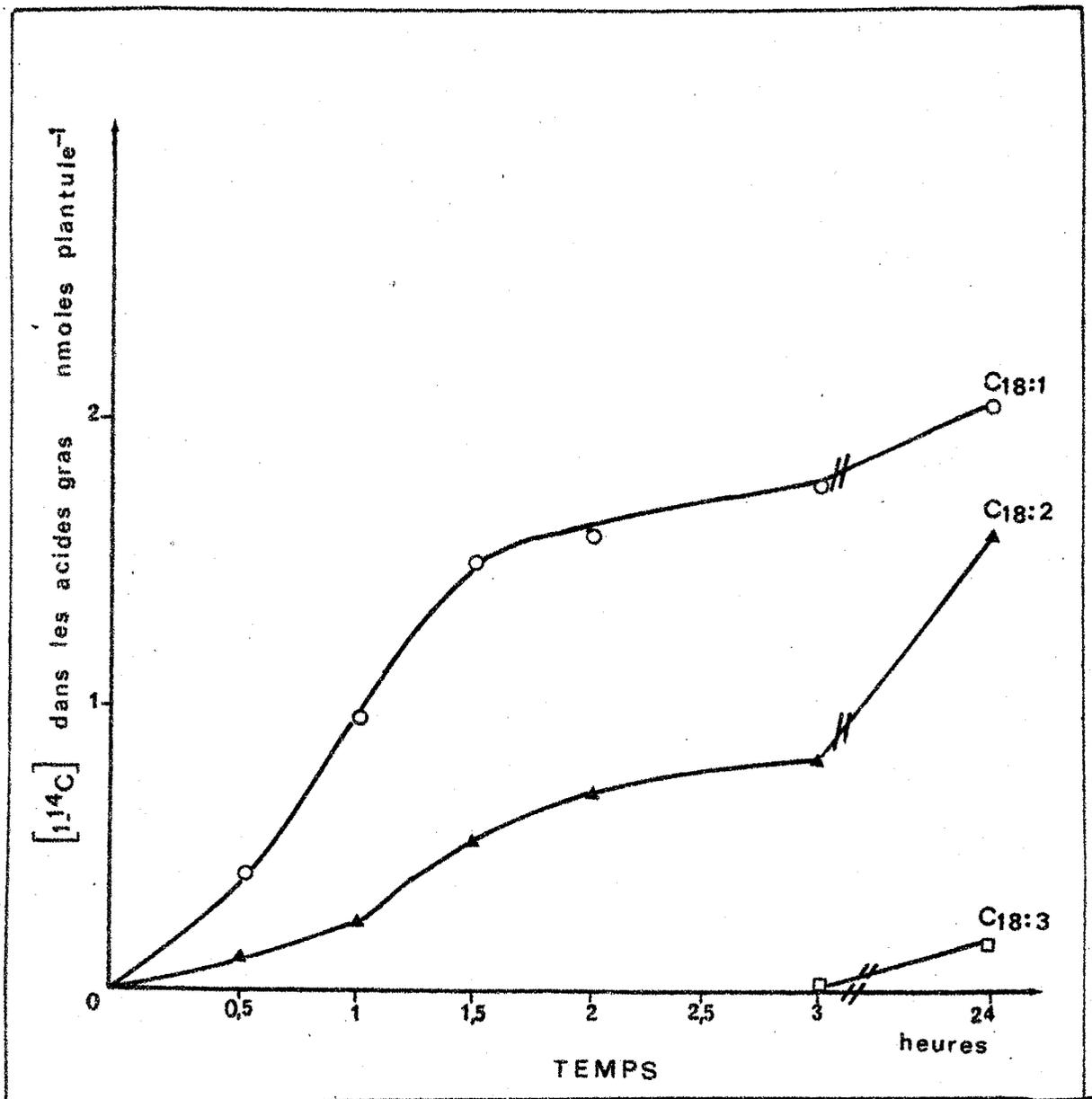


FIGURE 29 - Cinétique de désaturation *in vivo* de [1-¹⁴C]-oléate acylé dans la phosphatidylcholine de cotylédons de Carthame

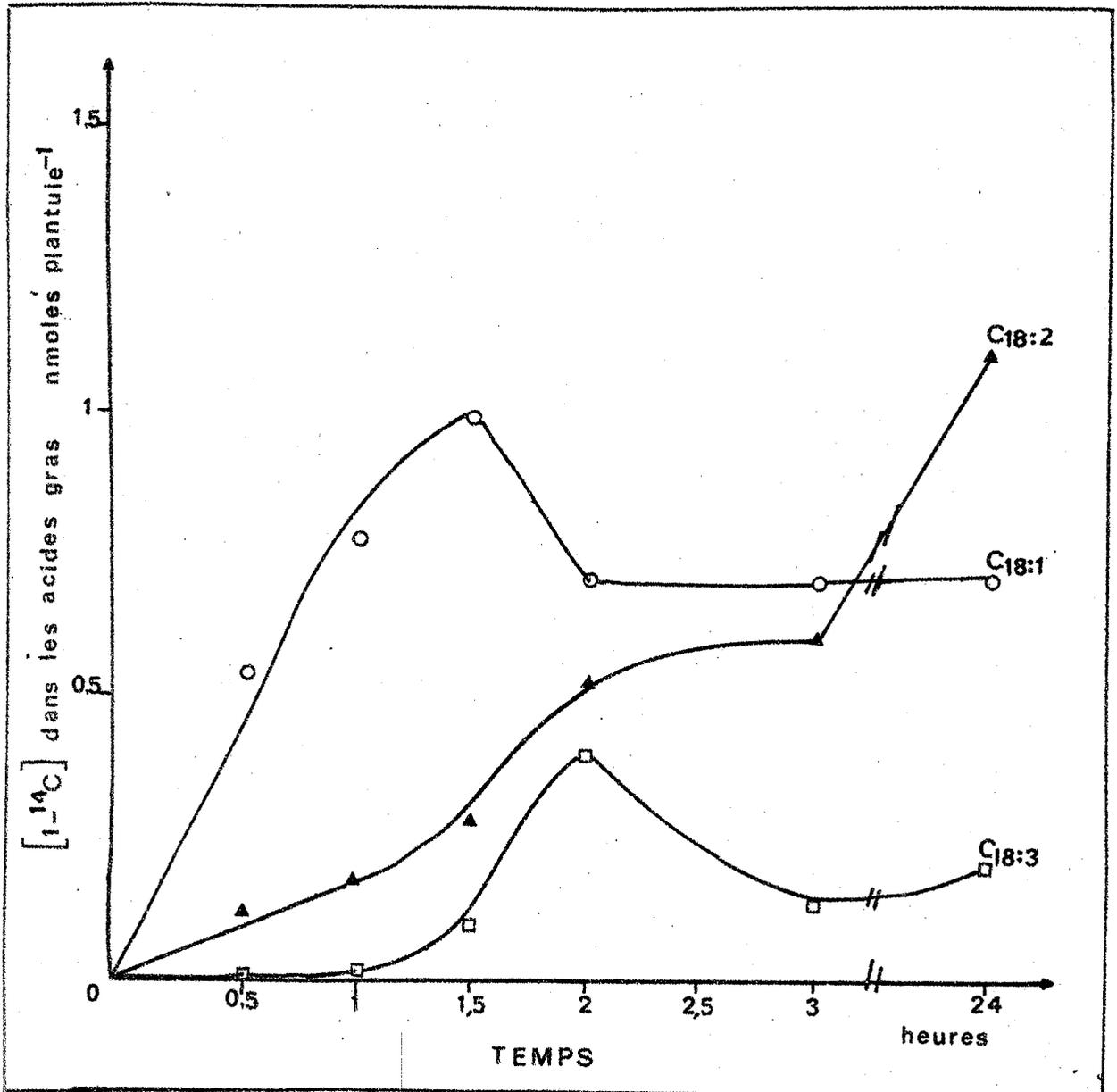


FIGURE 30 - Cinétique de désaturation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate acylé dans les diacylglycérols de cotylédons de Carthame

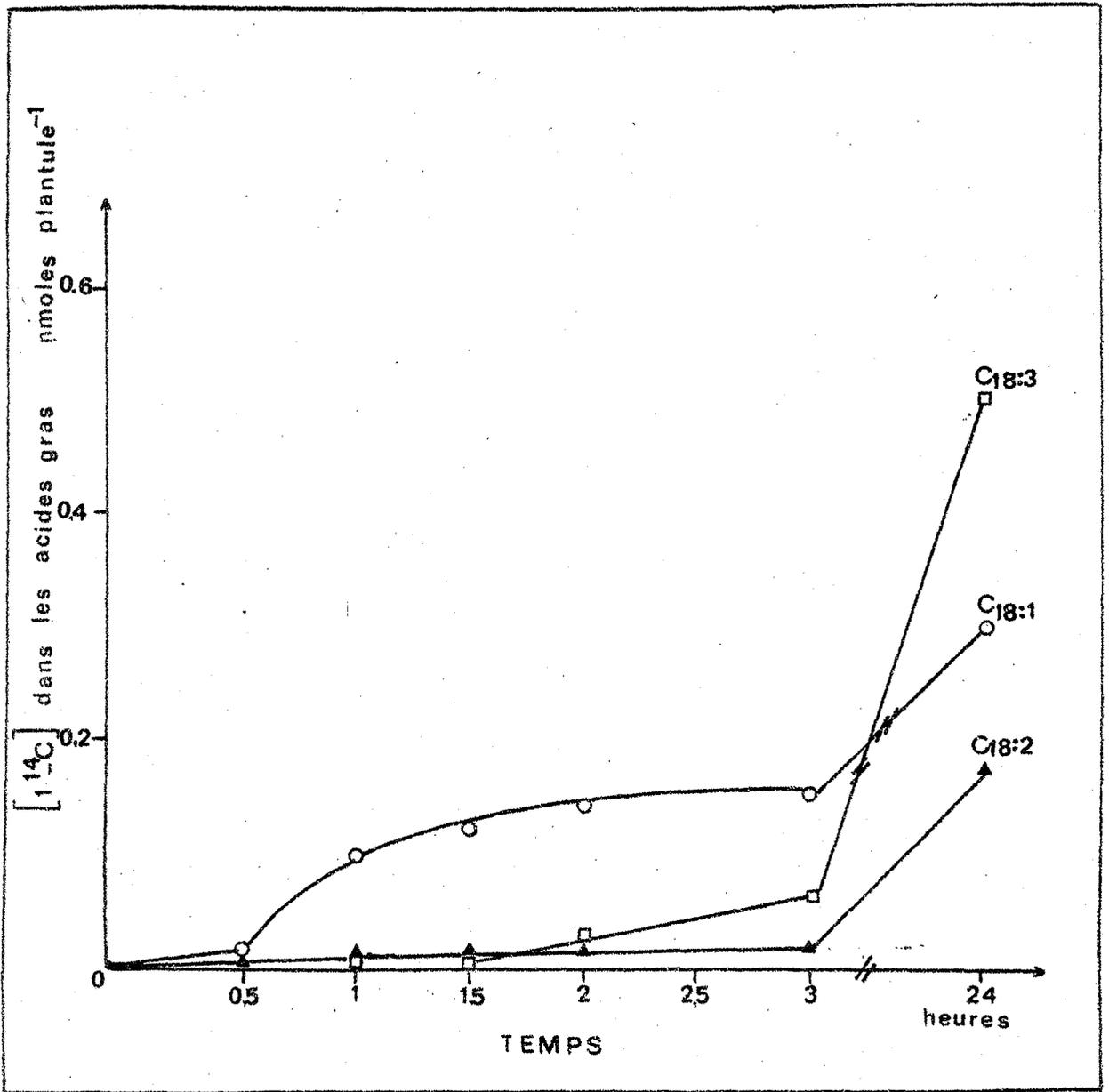


FIGURE 31 - Cinétique de désaturation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate acylé dans le monogalactosyldiacylglycérol de cotylédons de Carthame

Les cinétiques d'incorporation représentées sur la figure 28 montrent que pour des temps de marquage courts la radioactivité augmente très rapidement dans la PC. Cependant, après 1 h 30 d'incubation, l'incorporation se ralentit beaucoup et tend à plafonner dans la PC. Les DAG sont la catégorie la plus marquée après PC pour des temps longs. Le précurseur est incorporé très rapidement dans ces lipides neutres (aussi rapidement que dans la PC). Cependant, 2 heures après le dépôt, la radioactivité des DAG diminue. Cette étude du marquage des lipides à partir du $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate suggère que PC et DAG sont impliqués dans la synthèse des autres catégories lipidiques comme les galactolipides et les TAG. En effet, quand la radioactivité de PC ou des DAG plafonne ou diminue, celle des galactolipides et des TAG commence à augmenter.

d - Désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate

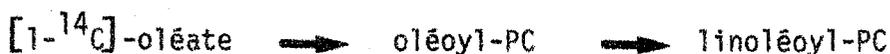
Le $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate acylé dans PC est désaturé. La désaturation est faible dans la première heure de marquage (fig. 29). La radioactivité dans le $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléyl augmente lentement. Après 3 heures à compter du dépôt du précurseur on retrouve 30% de radioactivité totale du PC dans le $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléyl-PC. On note un pourcentage élevé de désaturation après 24 heures de marquage (47%).

La désaturation du $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléyl-PC en $[1-^{14}\text{C}]$ -linolénoyl-PC n'est détecté qu'après 3 heures de marquage et le pourcentage de désaturation est très faible (2,5% à 24 heures).

Dans les DAG, la radioactivité présente est due essentiellement à $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate. Après 1 h 30 de marquage la radioactivité d'oléate diminue alors que celle de linoléate et linolénoate augmente (Fig. 30). La désaturation du reste linoléoyl en reste linolénoyl est maximum après 2 heures. La radioactivité du reste linolénoyl diminue par la suite au cours du temps.

Dans les galactolipides, la radioactivité du reste linolénoyl augmente dans le MGDG ; 2 heures après le dépôt du précurseur, le $\text{C}_{18:3}$ radioactif commence à s'accumuler (Fig. 31). Cette augmentation coïncide avec la diminution de linolénoyl des DAG.

Les résultats de marquage obtenus à partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate confirment ceux obtenus à partir du $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate. Ces résultats suggèrent un transfert d'acides gras radioactifs de PC vers les DAG puis vers le MGDG. L'oléate est rapidement acylé dans la PC puis désaturé :



La désaturation du linoléoyl PC en linolenoyl PC est très faible et se fait très lentement. Notre étude montre que la désaturation de C_{18:2} en C_{18:3} a lieu d'abord dans les DAG ce qui est un résultat très nouveau. Le reste linoléoyl serait ensuite transféré dans le MGDG (sans doute en même temps que se produit la galactosylation de la molécule support de DAG). Les résultats exprimés en pourcentage de la radioactivité retrouvée dans les acides oléique, linoléique et linolénique acylés des PC, DAG et MGDG montrent que la désaturation débute très rapidement dans PC. Mais très vite le pourcentage des acides gras polyinsaturés augmente dans le DAG (2 heures après le dépôt du précurseur, on retrouve 31% dans PC, 57% dans DAG et 28% dans MGDG, alors que le pourcentage de ces acides gras diminue dans le DAG, il augmente dans le MGDG (tableau XXVIII).

TABLEAU XXVIII - Pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans les acides gras de la PC, des DAG et MGDG de Carthame.

Acides gras	Pourcentages de la radioactivité totale retrouvée dans les acides gras					
	30 mn	1 h	1 h 30	2 h	3 h	24 h
PC						
C _{18:1}	81	76	73	68	66	50
C _{18:2}	18	23	26	31	34	45
C _{18:3}	--	--	--	26	31	35,4
					1,4	2,5
						47
DAG						
C _{18:1}	83	80	70	41	49	52
C _{18:2}	16	17	19	31	39	36
C _{18:3}	--	--	10	29	57	50
				26	12	10
						46
MGDG						
C _{18:1}	97	93	93	71	63	31
C _{18:2}	2,6	6,8	2,8	10	10	20
C _{18:3}	--	--	3	6	28	37
				18	27	49
						69

100 nmoles de [1-¹⁴C]-oléate de NH₄ ont été déposées sur les plantules de 5 jours

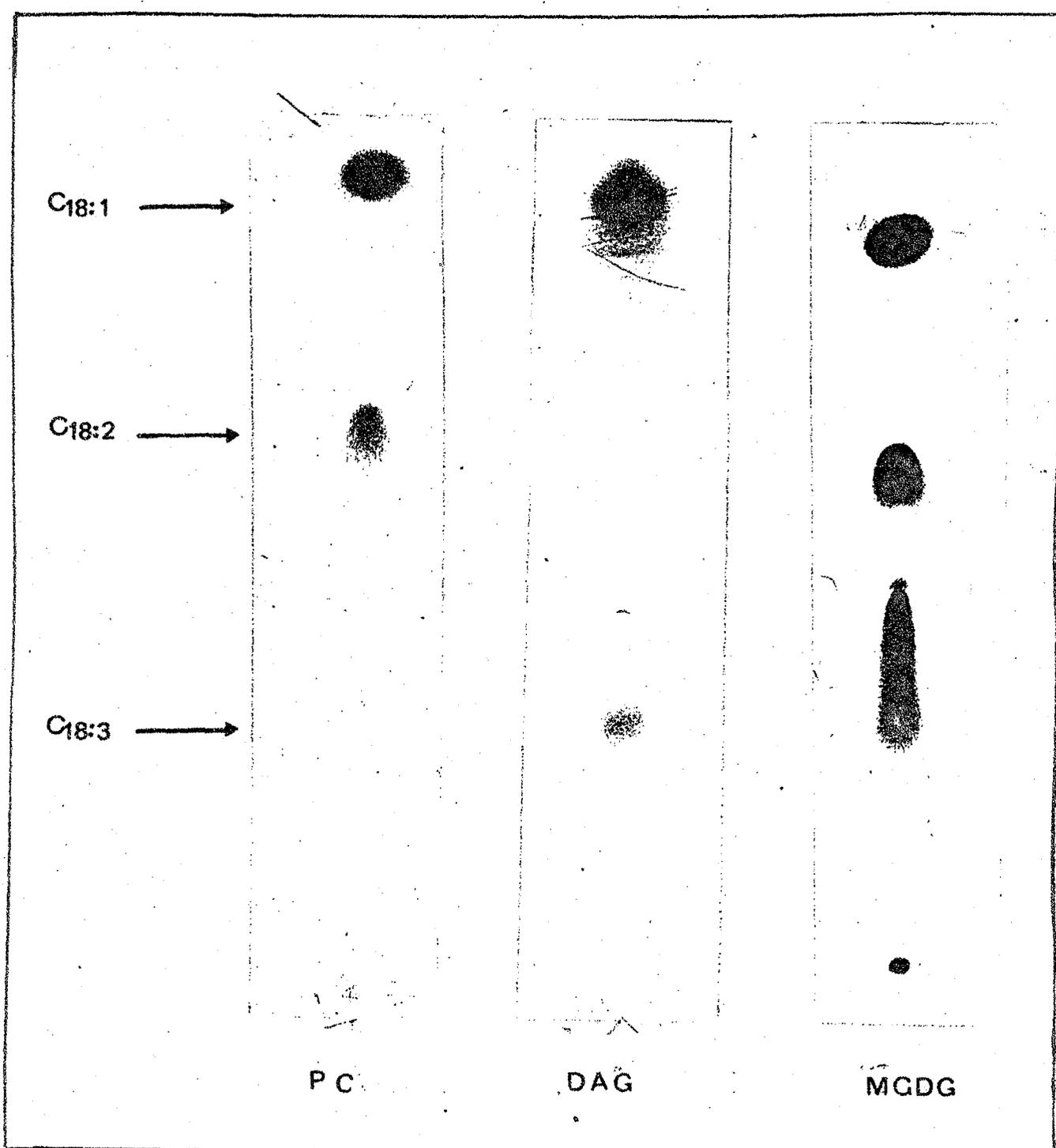


FIGURE 32 - Autoradiographies montrant la désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate acylé dans la phosphatidylcholine et les diacylglycérols après 2 heures de marquage et dans le MGDG après 24 heures

En conclusion les résultats de marquage à partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate, exprimés soit en nmoles d'acides gras marqués au cours du temps, soit en pourcentage de la radioactivité totale incorporée au cours du temps, montrent que la désaturation du $\text{C}_{18:1}$ en $\text{C}_{18:2}$ a lieu très vite dans la PC et que la désaturation du $\text{C}_{18:2}$ en $\text{C}_{18:3}$ se fait dans les DAG. Les DAG contenant les acides gras tri insaturés sont galactosylés pour donner le MGDG (fig. 32).

2 - Etude du marquage des lipides à partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate

a - Incorporation dans la fraction lipidique

Le $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate d'ammonium est bien moins incorporé dans les tissus cotylédonnaires que l'acétate ou l'oléate. Seulement 60% de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate déposé sont retrouvés dans la fraction lipidique (tableau XXIX).

TABLEAU XXIX - Incorporation et désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans les acides gras totaux des cotylédons de Carthame

Temps	Incorporation dans la fraction lipidique nmoles/plantule	Incorporation dans les acides gras totaux nmoles/plantule	% de la radioactivité	
			18:2	18:3
1 h	6,3	4,4	100	---
1 h 30	16,5	13	100	---
2 h	30	18	100	---
3 h	32	22	100	---
5 h	33	25	96	3,2
24 h	30	21	93	7
48 h	26*	15	90	10

* 50 nmoles de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate d'ammonium ont été déposés sur les cotylédons de plantules de 5 jours.

b - Incorporation dans les acides gras totaux

La cinétique d'incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans les acides gras totaux montre une augmentation de marquage jusqu'à 5 heures. Puis il apparaît une diminution progressive de la radioactivité. Ceci suggère que pour des temps longs (24 h - 48 h) le précurseur se dégrade par β -oxydation ou par autooxydation (tableau XXIX).

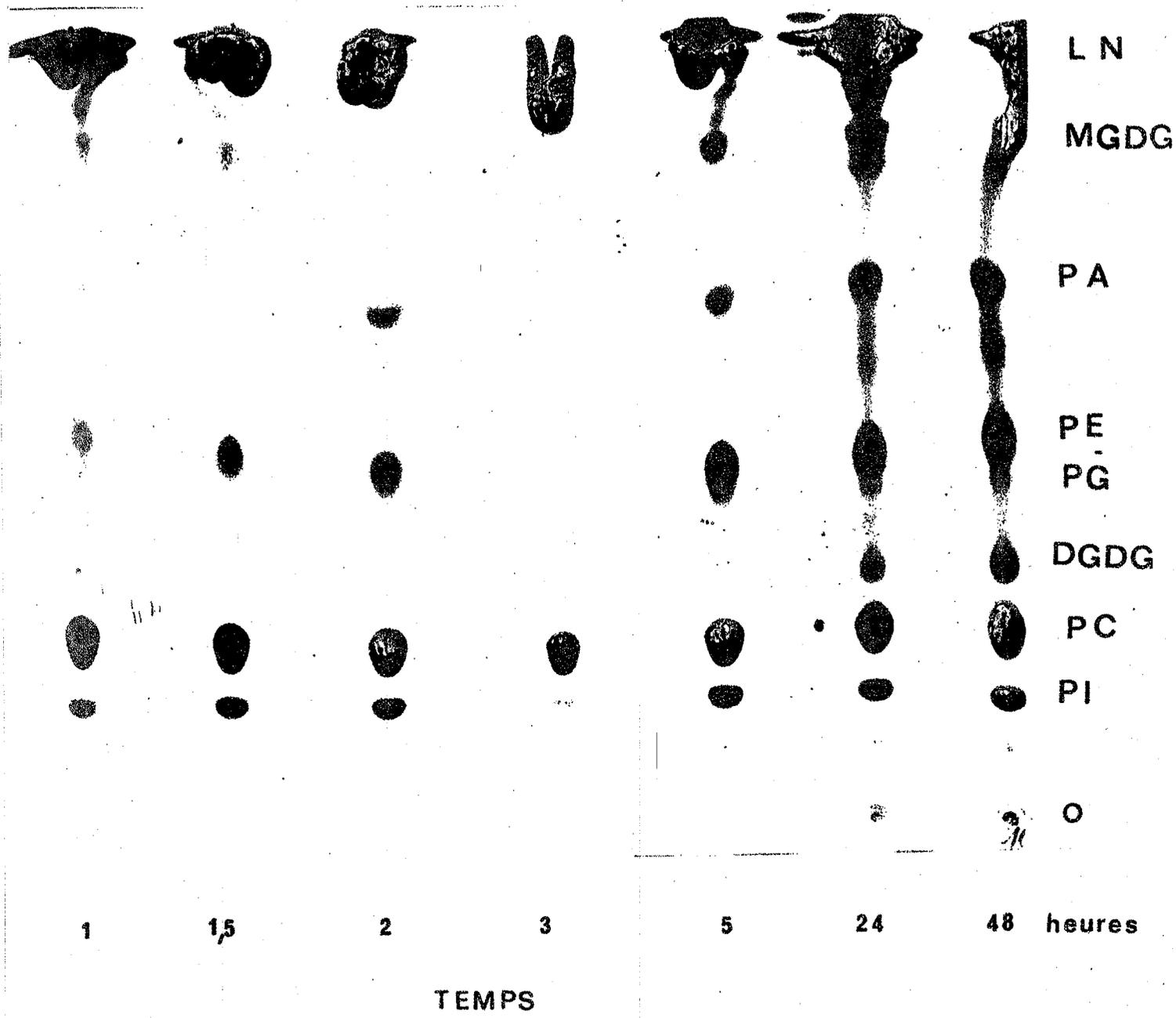


FIGURE 33 - Autoradiographie de l'incorporation *in vivo* de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans les phospholipides de cotylédons de Carthame

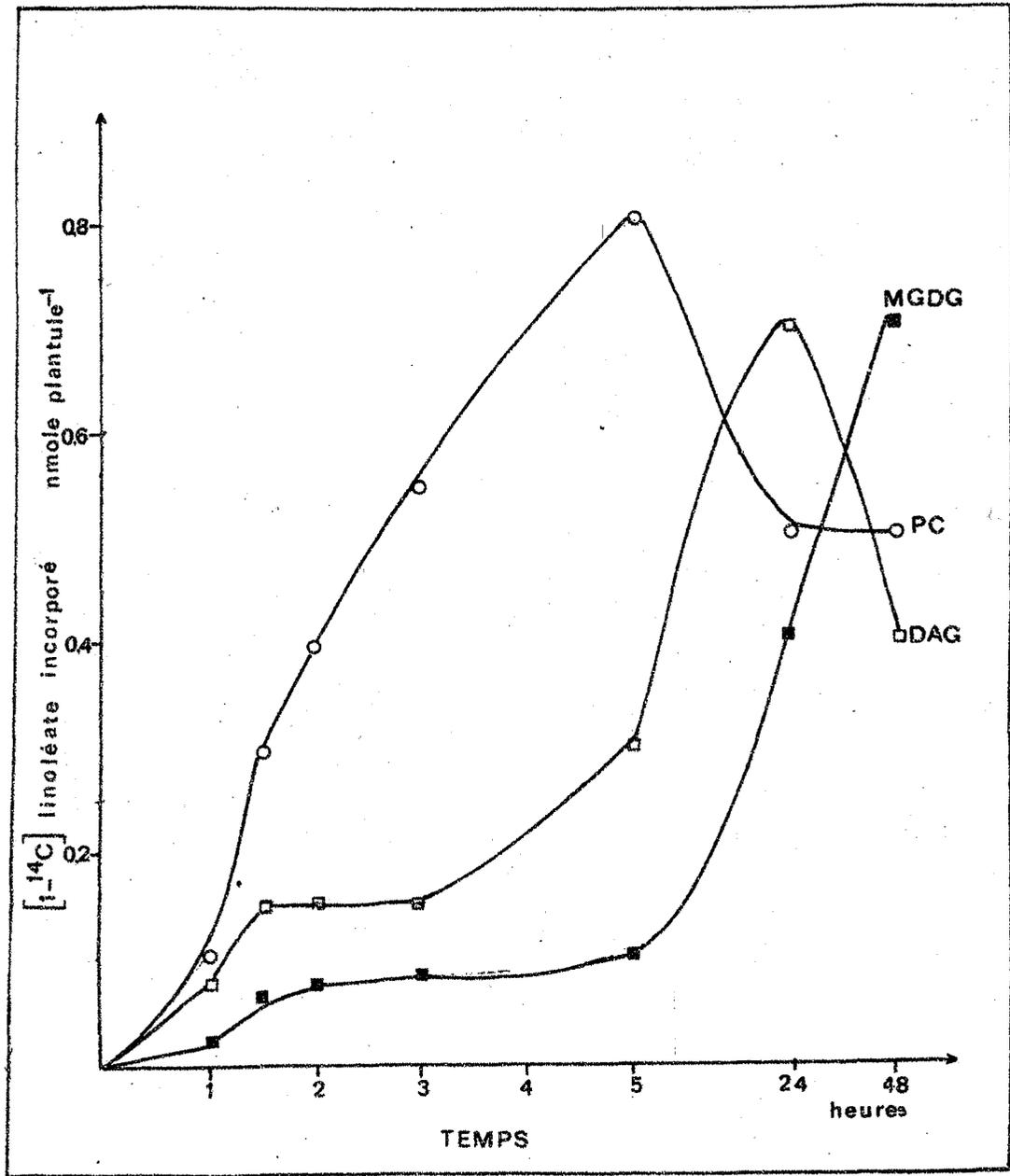


FIGURE 34 - Cinétique d'incorporation *in vivo* de [$1-^{14}\text{C}$]-linoléate dans les catégories lipidiques de cotylédons de Carthame

Pendant les trois premières heures suivant le dépôt du précurseur, la désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate en $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate est très faible. On ne retrouve que 10% de la radioactivité incorporée dans le linoléate formé après 48 heures.

c - Incorporation dans les catégories lipidiques

La cinétique d'incorporation montre que 83 à 90% de la radioactivité du précurseur se retrouve dans les acides gras libres. Une faible partie (10% à 17%) se trouve acylée au niveau des catégories lipidiques. Les catégories les plus marquées sont la PC, la PE, le PI pour les temps courts et le MGDG pour les temps plus longs (fig. 33).

Les lipides neutres DAG et TAG incorporent également le $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate. L'incorporation dans les DAG est la plus importante lors des temps de marquage courts (tableau XXX).

TABLEAU XXX - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans les catégories lipidiques de cotylédons de Carthame. 50 nmoles de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate de NH_4 ont été déposés sur les cotylédons de plantules de 5 jours.

Temps	Incorporation (nmoles/plantule)									
	DAG	TAG	LP	PI	PC	PG	PE	PA	MGDG	DGDG
1	0,2	0,06	0,2	0,02	0,1	0,01	0,03	0,01	0,02	0,004
1 h 30	0,2	0,07	0,5	0,05	0,3	0,01	0,06	0,02	0,07	0,008
2 h	0,17	0,1	0,68	0,06	0,4	0,01	0,08	0,02	0,08	0,01
3 h	0,2	0,1	0,9	0,07	0,6	0,02	0,1	0,04	0,08	0,01
5 h	0,3	0,4	1,3	0,1	0,8	0,06	0,1	0,06	0,1	0,02
24 h	0,7	0,2	1,8	0,09	0,5	0,07	0,2	0,1	0,5	0,09
48 h	0,4	0,4	2,1	0,1	0,5	0,07	0,2	0,1	0,7	0,1

La cinétique d'acylation du $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate dans le PC montre que la radioactivité augmente régulièrement jusqu'à 5 heures après le dépôt. Ensuite il apparaît une diminution jusqu'à 24 heures.

Comme pour l' $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate, la diminution de la radioactivité du PC coïncide avec l'augmentation dans les DAG. Ensuite la diminution de la radioactivité des DAG correspond à l'augmentation de celle du MGDG, à 48

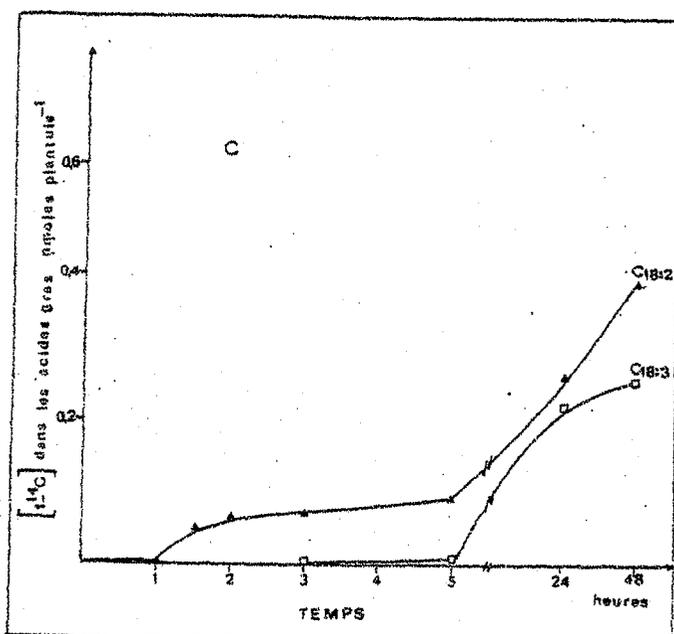
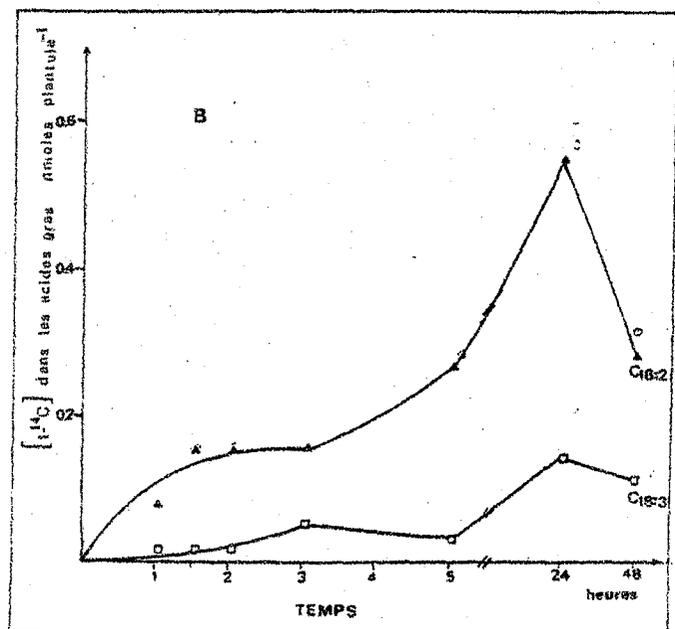
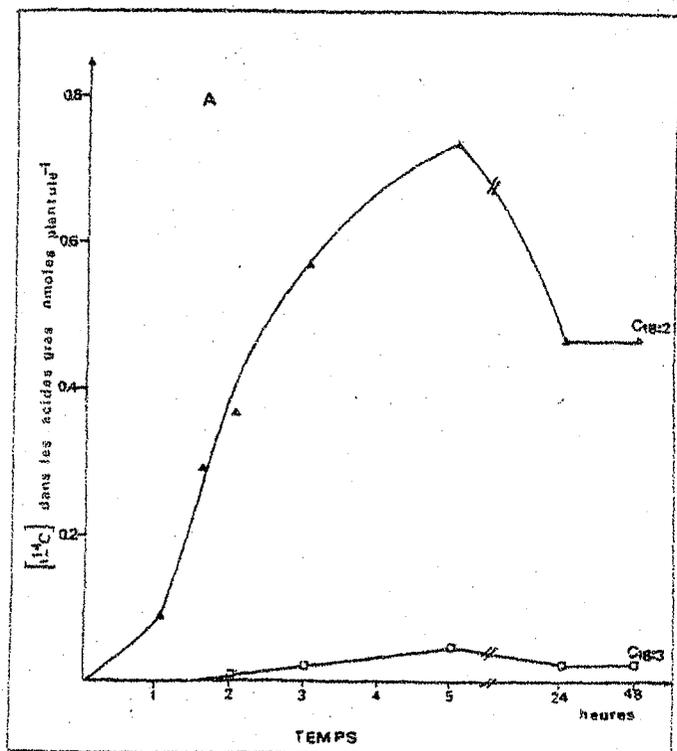


FIGURE 35 - Cinétique de désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate acylé dans la phosphatidylcholine (A), les diacylglycérols (B) et le monogalactosylglycérol (C) de cotylédons de Carthame

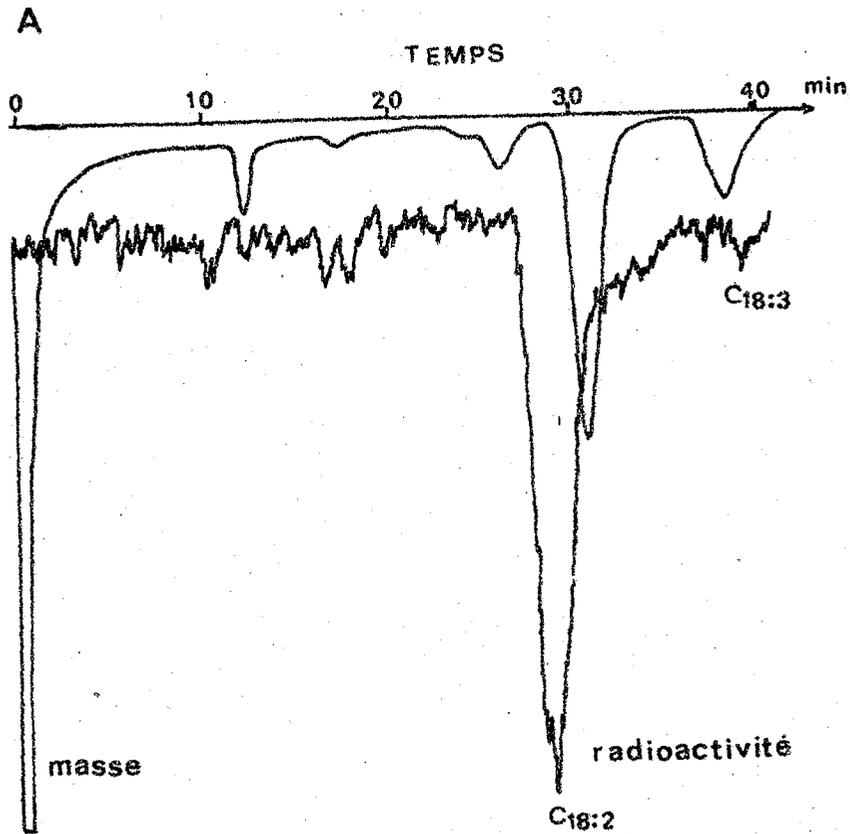
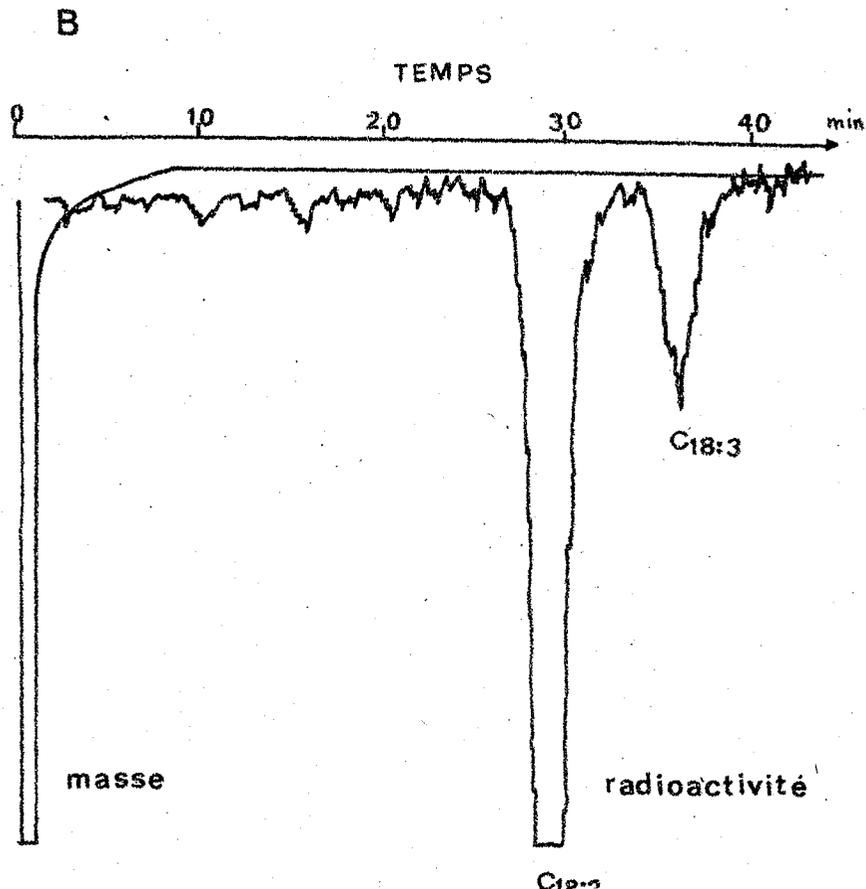


FIGURE 36 - Radiochromatogrammes des esters méthyliques de la phosphatidylcholine (A) et des diacylglycérols (B) de cotylédons de Carthame après 3 heures de marquage au $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate



heures. La synthèse des galactolipides se fait très lentement. La radioactivité à partir de linoléate apparaît beaucoup plus tardivement que lors du marquage à l'oléate (Fig. 34).

d - Désaturation de [1-¹⁴C]-linoléate

La cinétique de désaturation de [1-¹⁴C]-linoléate dans la PC, les DAG et le MGDG est représentée sur la fig. 35 (A,B,C). Elle montre que la désaturation de [1-¹⁴C]-linoléate se fait très peu dans la PC (7%) alors que dans les DAG après 3h de marquage, elle représente 25% de la radioactivité. La radioactivité du linoléate diminue ensuite dans les DAG jusqu'à la 5^e heure. Cette diminution de C_{18:3} correspond à la légère augmentation enregistrée dans le MGDG (tableau XXXI).

TABLEAU XXXI - Pourcentage de la radioactivité totale retrouvée dans les acides gras de la PC, les DAG et le MGDG

Pourcentage de la radioactivité dans les acides gras de							
PC							
Temps	1 h	1 h 30	2 h	3 h	5 h	24 h	48 h
C _{18:2}	100	100	94	96	93	94	94
C _{18:3}	---	---	5	4	7	5	5

DAG							
Temps	1 h	1 h 30	2 h	3 h	5 h	24 h	48 h
C _{18:2}	89	86	86	73	89	79	70
C _{18:3}	10	13	13	26	10	20	29

MGDG							
Temps	1 h	1 h 30	2 h	3 h	5 h	24 h	48 h
C _{18:2}	93	96	95	95	92	53	55
C _{18:3}	3	3	4	4	8	46	44

Les radiochromatogrammes représentés sur la fig. 36 montrent que la désaturation de [1-¹⁴C]-linoléate n'a pas lieu dans la PC mais dans les DAG (5 h après marquage), la radioactivité du MGDG étant très faible à ce moment.

Conclusion

Les résultats de marquage des lipides à partir du $[1-^{14}\text{C}]$ -acétate, $[1-^{14}\text{C}]$ -oléate et $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate montrent que la PC est donneuse des radicaux acyls pour la synthèse de galactolipides et des TAG. Dans les cotylédons en croissance, les TAG présents sont resynthétisés à partir des acides gras. Une synthèse des TAG à partir de l'acétate (ICHIHARA et NODA, 1981), de l'oléate et ou du linoléate (HAWKE et STUMPF, 1980) a été observée dans des jeunes feuilles de Carthame et Maïs.

La cinétique d'incorporation montre qu'avec l'acétate et l'oléate, l'acylation des nouveaux acides formés se fait rapidement dans PC alors que dans le cas du linoléate les temps d'acylation sont plus longs.

Les DAG sont la deuxième catégorie marquée après la PC. La radioactivité des DAG augmente quand celle de PC diminue. Donc quel que soit le précurseur utilisé les DAG se forment à partir de PC. Ils sont par la suite galactosylés pour donner MGDG. Nos résultats montrent clairement que la PC-18:1 est désaturée en PC-18:2, ce qui est en parfait accord avec les résultats de la littérature. En effet, quel que soit le précurseur utilisé $^{14}\text{CO}_2$ (SLACK *et al.*, 1975 ; WILLIAMS *et al.*, 1976), acétate, oléate (STOBART *et al.*, 1980 ; TREMOLIERES et MAZLIAK, 1974), linoléate (MURPHY et STUMPF, 1980 ; HAWKE *et al.*, 1980), la désaturation des restes oléyl en restes linoléoyl a toujours lieu dans la PC.

Nos cinétiques de désaturation montrent par ailleurs que les DAG renferment très rapidement des acides polyinsaturés. La désaturation de $\text{C}_{18:2}$ en $\text{C}_{18:3}$ pourrait, d'après nos courbes de marquage, se faire au niveau de cette catégorie lipidique.

Cependant pour des temps de marquage longs 24 h et 48 heures, la forte synthèse de $\text{C}_{18:3}$ dans MGDG ne correspond pas à une diminution de la quantité de cet acide gras dans les DAG. Il est probable que le renouvellement des DAG soit trop rapide pour être saisi dans nos expériences ; on peut aussi penser à deux molécules supports des désaturations.

Un premier type de molécule-support de la désaturation du $\text{C}_{18:2}$ en $\text{C}_{18:3}$ correspondrait aux DAG et jouerait, en cas de désaturation rapide, avant galactosylation. Une seconde molécule support où la désaturation serait plus lente pourrait être représentée par le MGDG.

Les voies de synthèse de l'acide α linoléique proposées sont donc les suivantes :

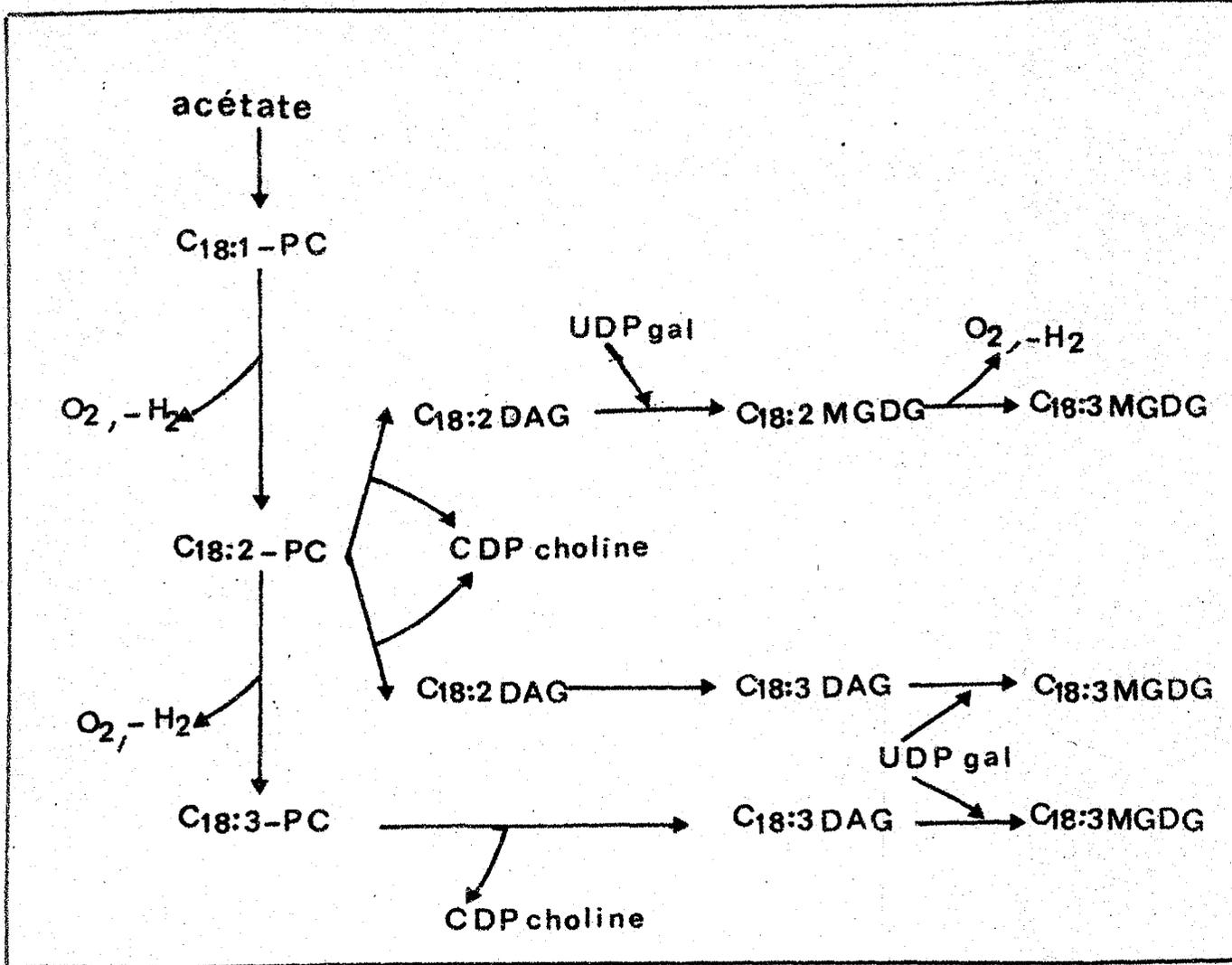


Schéma VIII - Voies de synthèse de l'acide α linoléique

C - SITES CELLULAIRES DES DESATURATIONS IN VIVO

Afin d'élucider les sites possibles de désaturation du linoléate, les plantules entières sont marquées *in vivo*. Les feuilles cotylédonnaires sont broyées et les fractions subcellulaires sont obtenues par centrifugation différentielle.

La plus grande partie des chloroplastes se trouve dans la fraction sédimentant à 3 000 x g. La fraction sédimentant à 100 000 x g comprend le culot de "microsomes". En fait le culot de microsomes rassemble des vésicules dérivant de plusieurs types de membranes : plasmalemme, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, enveloppes de chloroplastes.

1 - Incorporation de [1-¹⁴C]-linoléate dans les différentes fractions cellulaires

Le tableau XXXII représente l'incorporation du [1-¹⁴C]-linoléate (donné sous forme de sel d'ammonium) dans les différentes fractions cellulaires. L'incorporation du précurseur est très importante dans les culots de mitochondries et de microsomes après 3 h de marquage. L'évolution du marquage au cours du temps est très différente pour les deux culots. Alors que la radioactivité diminue dans la fraction microsomale, celle de la fraction mitochondriale demeure stationnaire et celle des chloroplastes augmente. La diminution de la radioactivité de la fraction microsomale coïncide avec l'augmentation enregistrée dans la fraction chloroplastique.

TABLEAU XXXII - Incorporation de [1-¹⁴C]-linoléate dans les différentes fractions cellulaires (10⁻³ nmoles/mg de protéine) de cotylédons de Carthame. 50 nmoles de [1-¹⁴C]-linoléate de NH₄ ont été déposées sur les cotylédons de plantules de 5 j.

Fractions	Temps	Incorporation totale	AG totaux (% de la radioactivité totale)	mg de chlorophylle
5 000 x g	3 h	416	317 (18%)	0,7
	24 h	674	544 (34%)	1,25
20 000 x g	3 h	849	742 (42%)	0,177
	24 h	838	628 (40%)	0,285
100 000 x g	3 h	863	673 (38%)	0,087
	24 h	573	397 (25%)	0,110

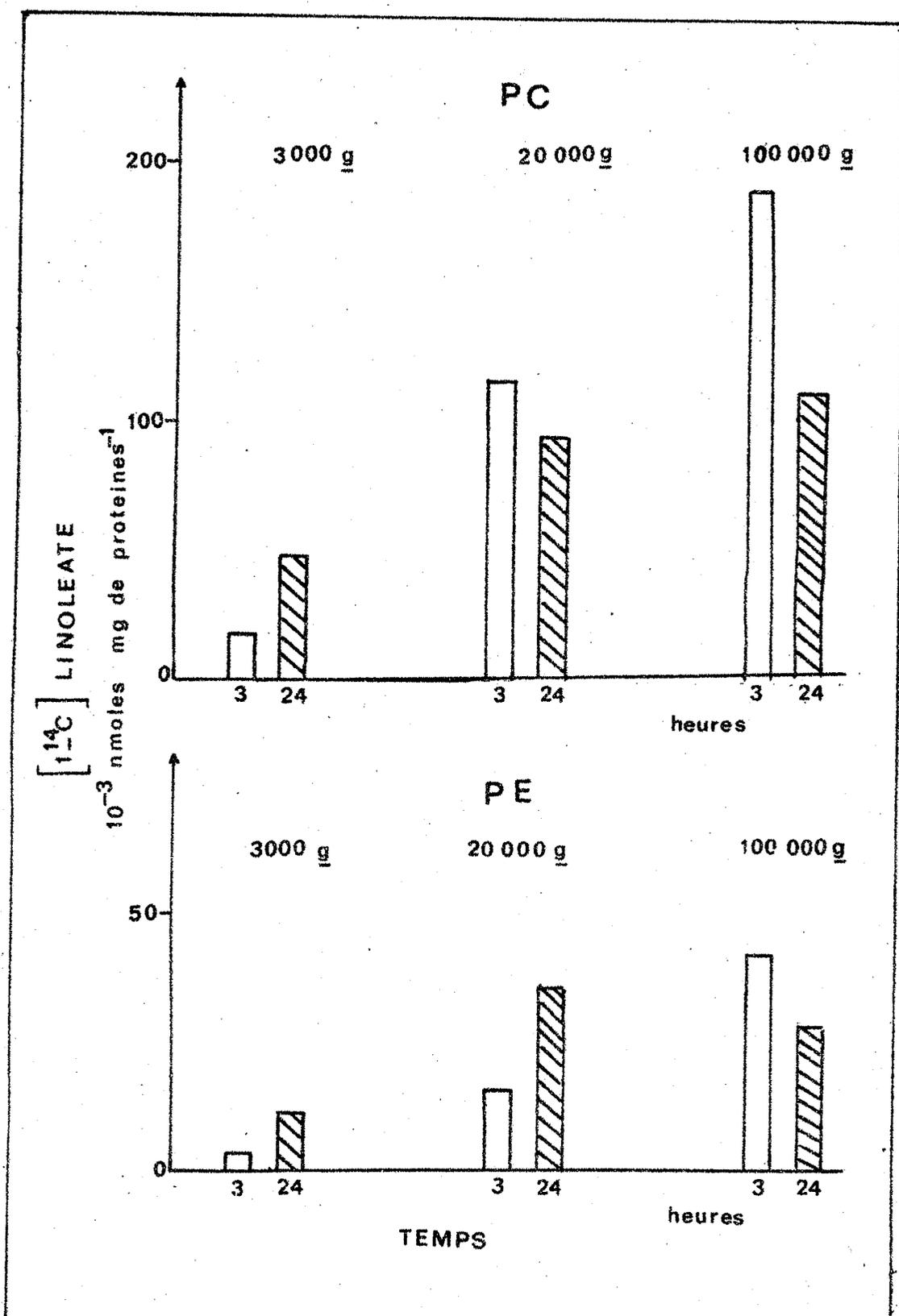


FIGURE 37 - Evolution de la radioactivité incorporée dans la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine des différentes fractions cellulaires obtenues à partir de cotylédons de Carthame marqués au [¹⁴C]-linoléate

Le dosage de la chlorophylle montre que toutes les fractions sont contaminées par les débris de chloroplastes. La quantité de chlorophylle retrouvée dans le culot microsomal représente à peu près 1/10^e de la valeur trouvée dans le culot chloroplastique.

2 - Incorporation de [1-¹⁴C]-linoléate dans les acides gras totaux

L'étude de la radioactivité dans les acides gras totaux montre que la fraction sédimentant à 20 000 x g est plus marquée : environ 40% de la radioactivité totale des acides gras se retrouve dans cette fraction. Cette valeur reste identique 24 heures après le dépôt du précurseur.

Pendant les trois premières heures, la radioactivité s'accumule aussi dans les acides gras de la fraction microsomale. La radioactivité retrouvée dans les acides gras de la fraction microsomale représente 38% de la radioactivité totale des acides gras alors qu'elle ne représente que 18% dans la fraction chloroplastique. Au cours du temps on note un accroissement de la radioactivité dans la fraction chloroplastique et une diminution de la radioactivité dans la fraction microsomale.

Donc lorsque du linoléate est fourni aux cellules, il s'accumule d'abord dans les microsomes, puis l'acide gras radioactif ou son produit de désaturation est transféré dans le chloroplaste pour la synthèse des galactolipides.

3 - Incorporation de [1-¹⁴C]-linoléate dans les catégories lipidiques

La distribution de la radioactivité dans les catégories lipidiques montre que les phospholipides sont les molécules des plus marquées. Pendant les trois premières heures, le précurseur fourni s'accumule surtout dans la phosphatidylcholine de la fraction sédimentant à 20 000 x g et 100 000 x g et à un moindre degré dans la phosphatidyléthanolamine des mêmes fractions (tableau XXXIII). Alors que la radioactivité s'accroît dans la PC de la fraction chloroplastique lorsque les temps de marquage passent de 3 à 24 h, la radioactivité diminue dans la PC de la fraction microsomale (fig. 37).

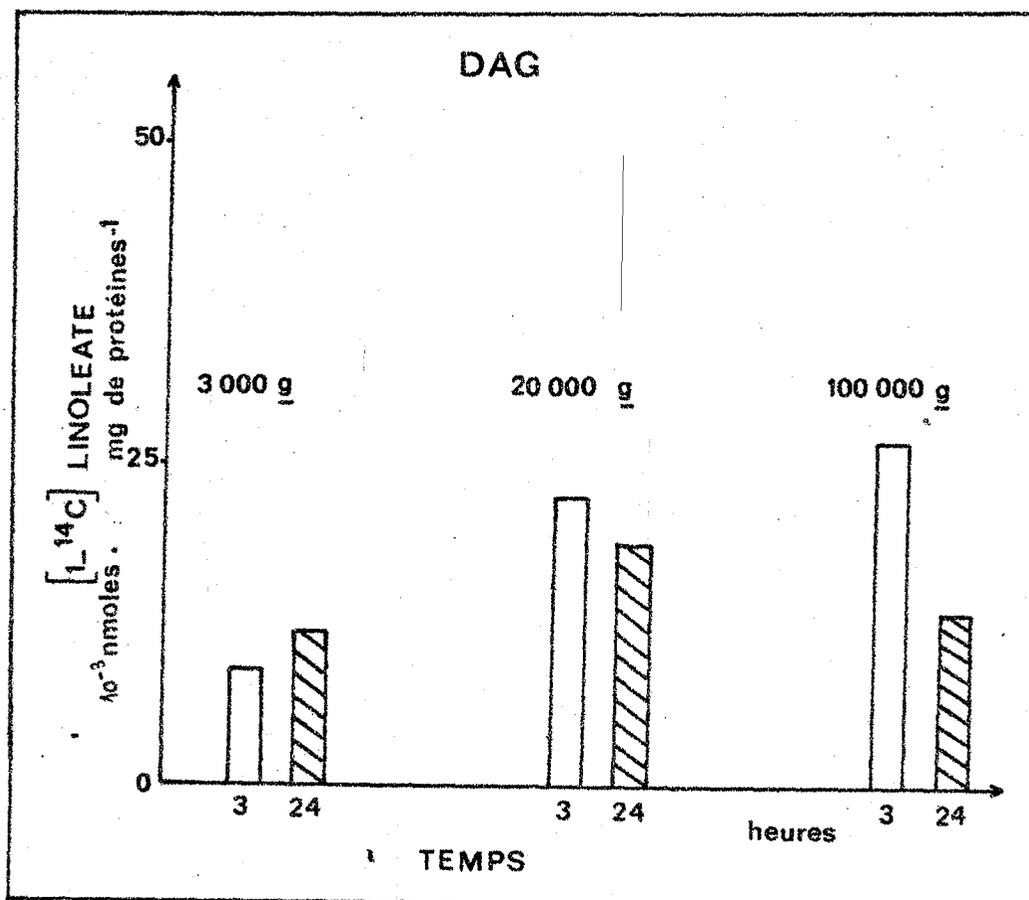


FIGURE 38 - Evolution de la radioactivité incorporée dans les diacylglycérols des différentes fractions cellulaires obtenues à partir de cotylédons de Carthame marqués au [1-¹⁴C]-linoléate

TABLEAU XXXIII - Distribution de la radioactivité incorporée dans les phospholipides des différentes fractions cellulaires de cotylédons de Carthame. 50 nmoles de [^{14}C]-linoléate d' NH_4 ont été déposées sur les cotylédons de plantules de 5 j.

Fractions	Temps	Incorporation 10^{-3} nmole/mg de protéines				
		PI	PC	PG	PE	PA
3 000 x g	3 h	1,5	18,9	1,0	3	0,6
	24 h	7,4	48,2	3,7	11,7	1,1
20 000 x g	3 h	10	113	0,6	15,7	0,3
	24 h	15	97	3,5	35	0,2
100 000 x g	3 h	15	189	---	41,7	9,4
	24 h	14	111	4,0	27,6	10,1

Les lipides neutres sont également fortement marqués. On note une synthèse importante des triacylglycérols dans la fraction sédimentant à 20 000 x g (tableau XXXIV).

TABLEAU XXXIV - Distribution de la radioactivité incorporée dans les lipides neutres^{PCA} différentes fractions cellulaires (10^{-3} nmole/mg de protéines) de cotylédons de Carthame. 50 nmoles de [^{14}C]-linoléate d' NH_4 ont été déposées sur les cotylédons de plantules de 5 jours.

Fractions	Temps	Incorporation 10^{-3} nmole/mg de protéines	
		TAG	DAG
3 000 x g	3 h	6,8	9,0
	24 h	18,5	12,3
20 000 x g	3 h	27	23
	24 h	41	19
100 000 x g	3 h	7,5	27,5
	24 h	6,7	14,8

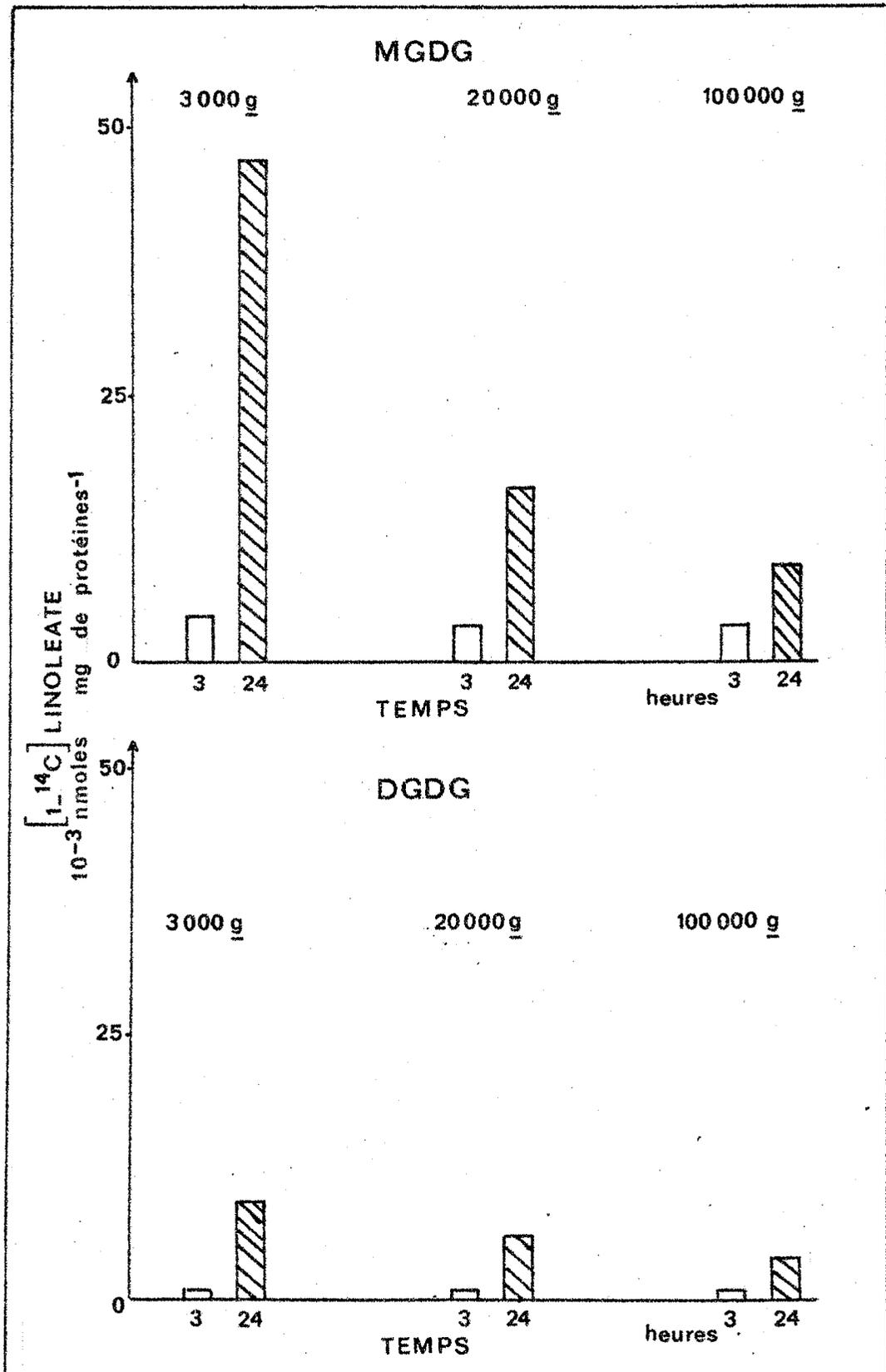


FIGURE 39 - Evolution de la radioactivité incorporée dans les galactolipides des différentes fractions cellulaires obtenues à partir de cotylédons de Carthame marqués au $[1-^{14}C]$ -linoléate

Les diacylglycérols sont également marqués surtout dans la fraction microsomale. On note une diminution de la radioactivité au cours du temps dans la fraction microsomale et une légère augmentation de la radioactivité dans la fraction chloroplastique (fig. 38).

Les galactolipides sont la catégorie la moins marquée dans les temps courts. Cependant, 24 heures après marquage, la masse de MGDG synthétisée est multiplié par le facteur 10 dans la fraction chloroplastique. La synthèse de DGDG est beaucoup moins importante (fig. 39).

Cette étude met donc en évidence la coopération existant entre les différents organites cellulaires pour la synthèse des galactolipides des chloroplastes. Le linoléate radioactif fourni est d'abord incorporé dans la PC des microsomes. Quand la radioactivité de la PC diminue, elle augmente dans les galactolipides des chloroplastes.

4 - Désaturation de [1-¹⁴C]-linoléate dans les différentes fractions

Les pourcentages de radioactivité trouvés dans l'acide linoléique des catégories lipidiques les plus marquées dans les différentes fractions cellulaires sont indiqués dans le tableau XXXV.

TABLEAU XXXV - Distribution de la radioactivité dans les acides gras des catégories lipidiques des différentes fractions cellulaires, après fourniture de [^{14}C]-linoléate d' NH_4 *in vivo*

Fractions		% de la radioactivité		
		PC	DAG	MGDG
3 heures				
3 000 x g	C _{18:2}	95	85	70
	C _{18:3}	4,5	14	29
20 000 x g	C _{18:2}	100	90	70
	C _{18:3}	-	9	28
100 000 x g	C _{18:2}	100	86	70
	C _{18:3}	-	14	28
24 heures				
3 000 x g	C _{18:2}	94	72	22
	C _{18:3}	5,8	28	77
20 000 x g	C _{18:2}	93	83	39
	C _{18:3}	3,7	16	60
100 000 x g	C _{18:2}	97	83	39
	C _{18:3}	3	16	60

La désaturation (exprimée en pourcentage) est très faible dans la PC des différentes fractions cellulaires. Ce pourcentage de désaturation après 3 heures de marquage ne dépasse jamais 5%. Le pourcentage n'est pas plus élevé après 24 heures.

Les DAG contiennent un pourcentage élevé (14%) d'acides gras triinsaturés radioactifs. Après 3 heures, les pourcentages sont identiques dans les fractions chloroplastique et microsomale. Avec le temps, ce pourcentage double dans la fraction chloroplastique.

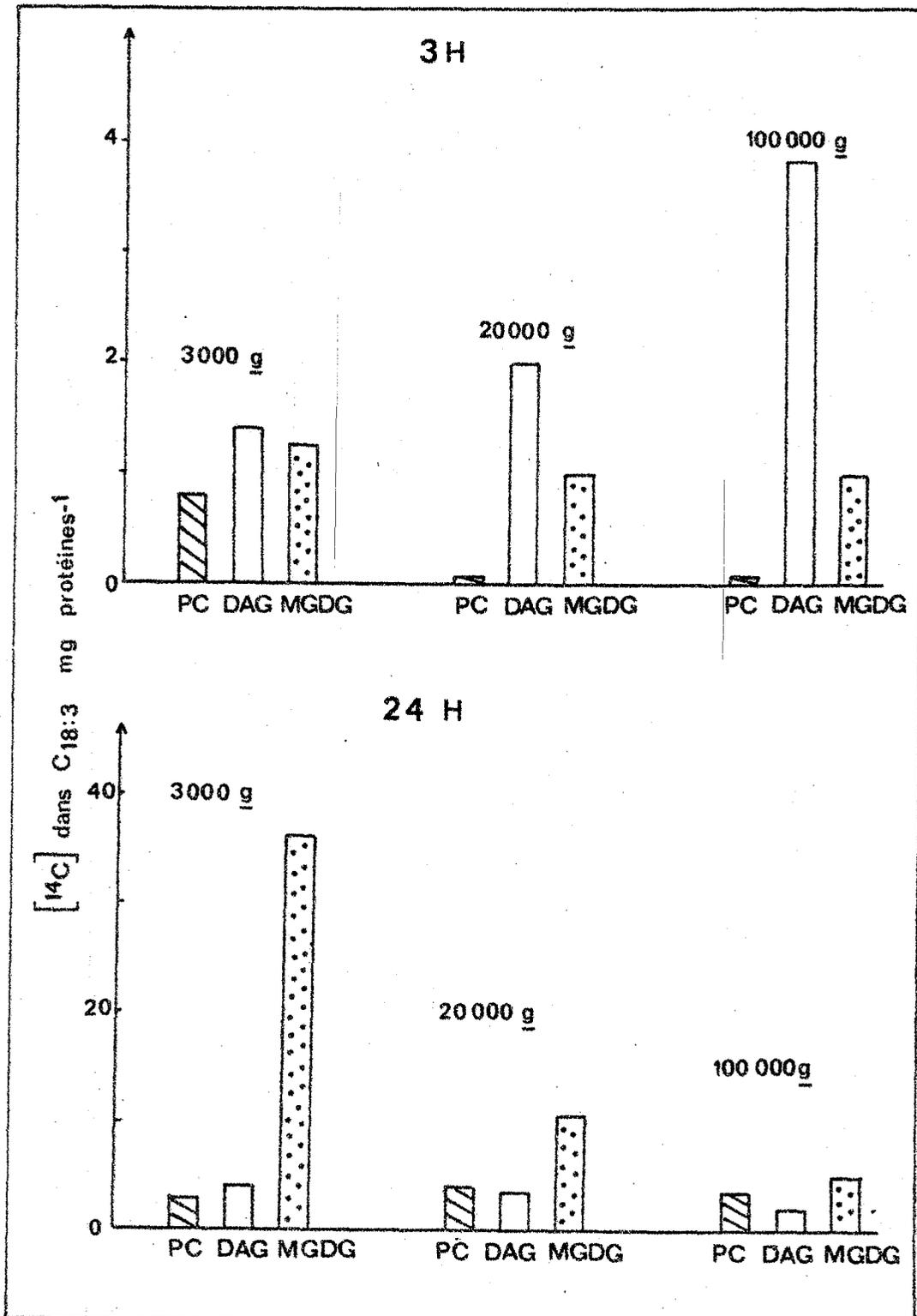


FIGURE 40 - Désaturation de [¹⁻¹⁴C]-linoléate dans les catégories lipidiques des différentes fractions cellulaires obtenues à partir de cotylédons de Carthame

Si on exprime la désaturation par la quantité d'acide linoléique formé en nmoles/mg de protéines, les DAG de la fraction microsomale forment un site cellulaire où la désaturation est plus active que dans la fraction chloroplastique (fig. 40). Deux possibilités sont alors envisagées :

- soit la désaturation de linoléate a lieu dans la PC de la fraction microsomale et il y a rapidement libération des DAG contenant un fort pourcentage d'acides gras triinsaturés. Ce serait la raison pour laquelle on détecte un faible pourcentage de linoléoyl-PC.
- soit la désaturation se fait dans les DAG de la fraction microsomale. Les DAG-C_{18:3} seraient transférés dans les chloroplastes puis galactosylés. C'est en effet au niveau des galactolipides que l'on retrouve (dès 3 heures de marquage) les pourcentages les plus élevés de C_{18:3}.

Conclusion

Les résultats obtenus grâce au fractionnement cellulaire indiquent que l'incorporation de [¹⁴C]-linoléate (fourni sous forme de sel d'ammonium) se fait principalement dans la PC des fractions microsomale et mitochondriale. L'évolution de la radioactivité en fonction du temps indique que la fraction microsomale est seule impliquée dans la synthèse des acides gras polyinsaturés qui s'accumulent finalement dans les galactolipides des plantes. Ces résultats mettent en évidence :

- 1) la coopération des microsomes et des chloroplastes dans la synthèse des galactolipides. Quand du linoléate est fourni à la cellule, il se retrouve principalement sous la forme de linoléoyl-PC.
- 2) le faible pourcentage de désaturation trouvé au niveau du PC de la fraction microsomale ne nous permet pas de conclure comme STYMNE et APPELQVIST (1978) ou BROWSE et SLACK (1981) que la désaturation de linoléate en linoléate a lieu dans la PC des microsomes.
- 3) le taux élevé de désaturation dans les DAG dérivant de PC, laisse penser que probablement la désaturation pourrait avoir lieu dans cette catégorie lipidique. Cependant on ne peut écarter l'hypothèse d'une désaturation de C_{18:2} → C_{18:3} dans la PC du réticulum endoplasmique. On pourrait alors expliquer le faible pourcentage de désaturation retrouvé dans PC par la libération immédiate des DAG contenant des acides gras triinsaturés. La forme sous laquelle se ferait le transfert des DAG, du réticulum endoplasmique vers le chloroplaste, reste à élucider.

Plusieurs hypothèses ont été envisagées quand à la formation du MGDG riche en linoléate.

1 - Le linoléoyl-PC pourrait être transféré du réticulum endoplasmique vers le chloroplaste par l'intermédiaire des protéines de transfert des phospholipides, les "PLTP" (JULIENNE *et al.*, 1981 ; KADER *et al.*, 1982 ; DRAPIER *et al.*, 1982 ; YAMADA et OHNISHI, 1982). Dans le chloroplaste, le C_{18:2}-PC serait utilisé pour la formation des galactolipides. La désaturation de linoléate en linoléate aurait lieu dans les galactolipides (SLACK et ROUGHAN, 1975 ; TREMOLIERES *et al.*, 1979 ; OHNISHI et YAMADA, 1980, 1982).

2 - Le linoléoyl-PC serait désaturé en linoléoyl-PC dans le réticulum endoplasmique puis transporté vers le chloroplaste pour la synthèse des galactolipides. La troisième désaturation serait donc liée au réticulum endoplasmique (WILLIAMS *et al.*, 1979 ; SIMPSON *et al.*, 1979 ; WILLIAMS, 1980).

3 - Le linoléoyl-PC donnerait naissance dans le cytoplasme à un linoléoyl-DAG qui serait transféré vers le chloroplaste et galactosylé pour la formation de C_{18:2}-MGDG. La 3^{ème} désaturation aurait lieu sur le galactolipide (SIMPSON *et al.*, 1979 ; ROUGHAN et SLACK, 1982 ; SLACK *et al.*, 1977). Les résultats obtenus nous permettent de proposer une quatrième hypothèse pour la synthèse de l'acide linoléique (Schéma IX).

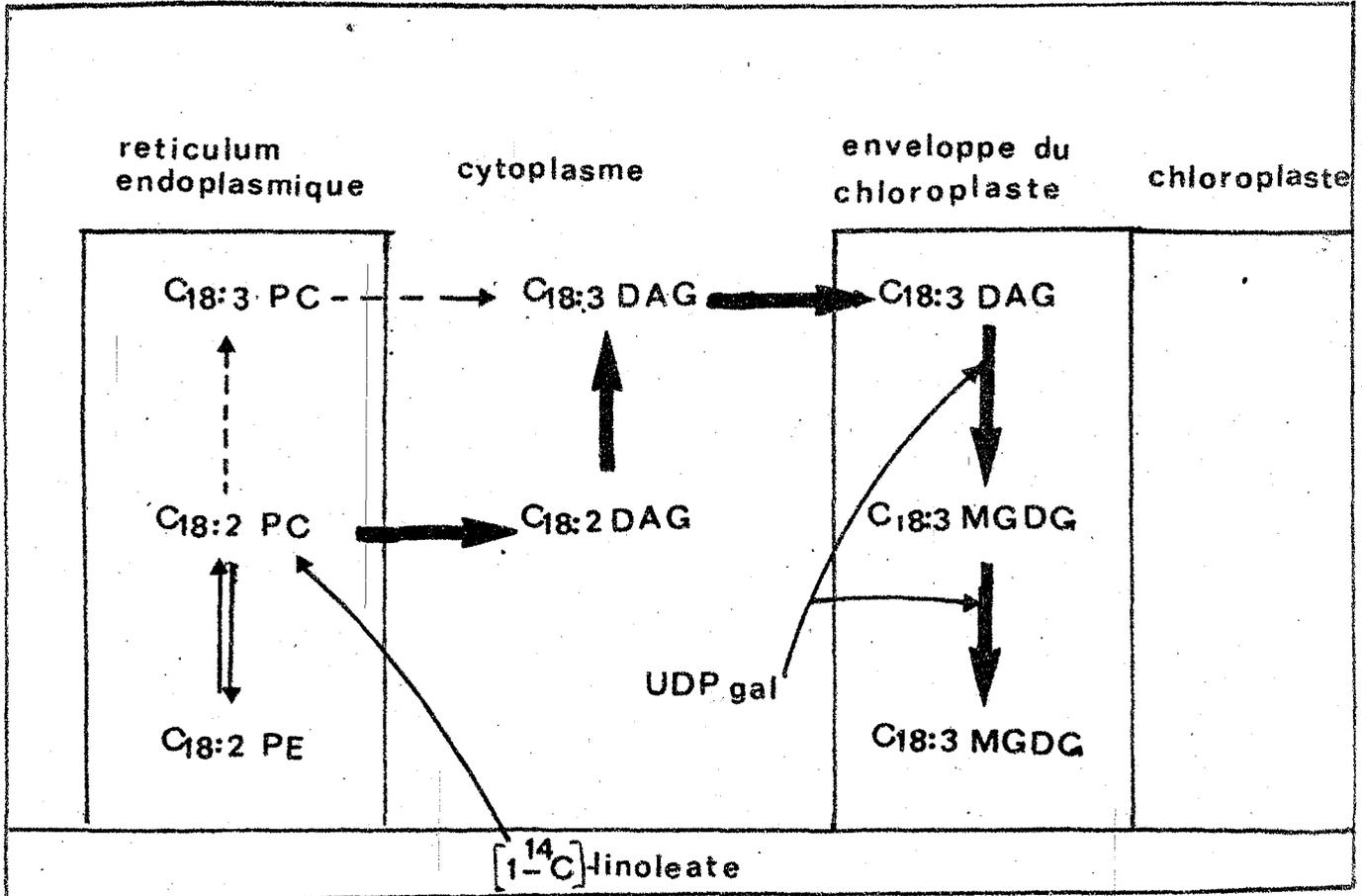


Schéma IX - Nouvelle hypothèse pour la biosynthèse de l'acide linoléique

Le linoléoyl-PC des microsomes fournirait des linoléoyl-DAG (par la voie inverse de la biosynthèse, avec du CMP comme cofacteur - et la désaturation du résidu linoléoyl ($C_{18:2}$) en résidu linoléoyl ($C_{18:3}$) se ferait dans ces molécules de DAG, au niveau du réticulum endoplasmique.

Il reste à comprendre comment les molécules de linoléoyl-DAG sont transférées vers le chloroplaste pour y être galactosylées.

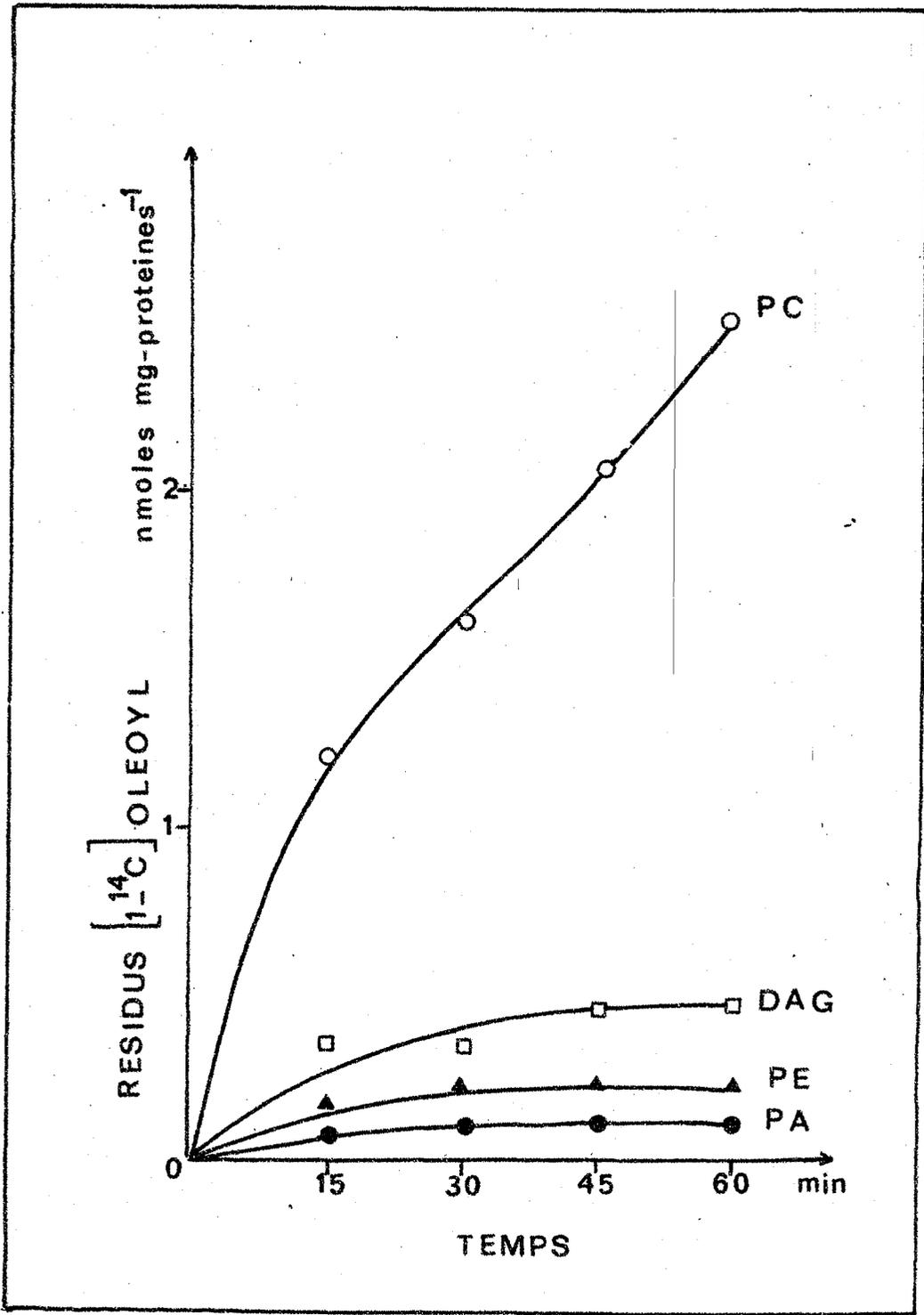


FIGURE 41 - Cinétique d'incorporation *in vitro* de [¹⁴C]oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques de microsomes de Carthame

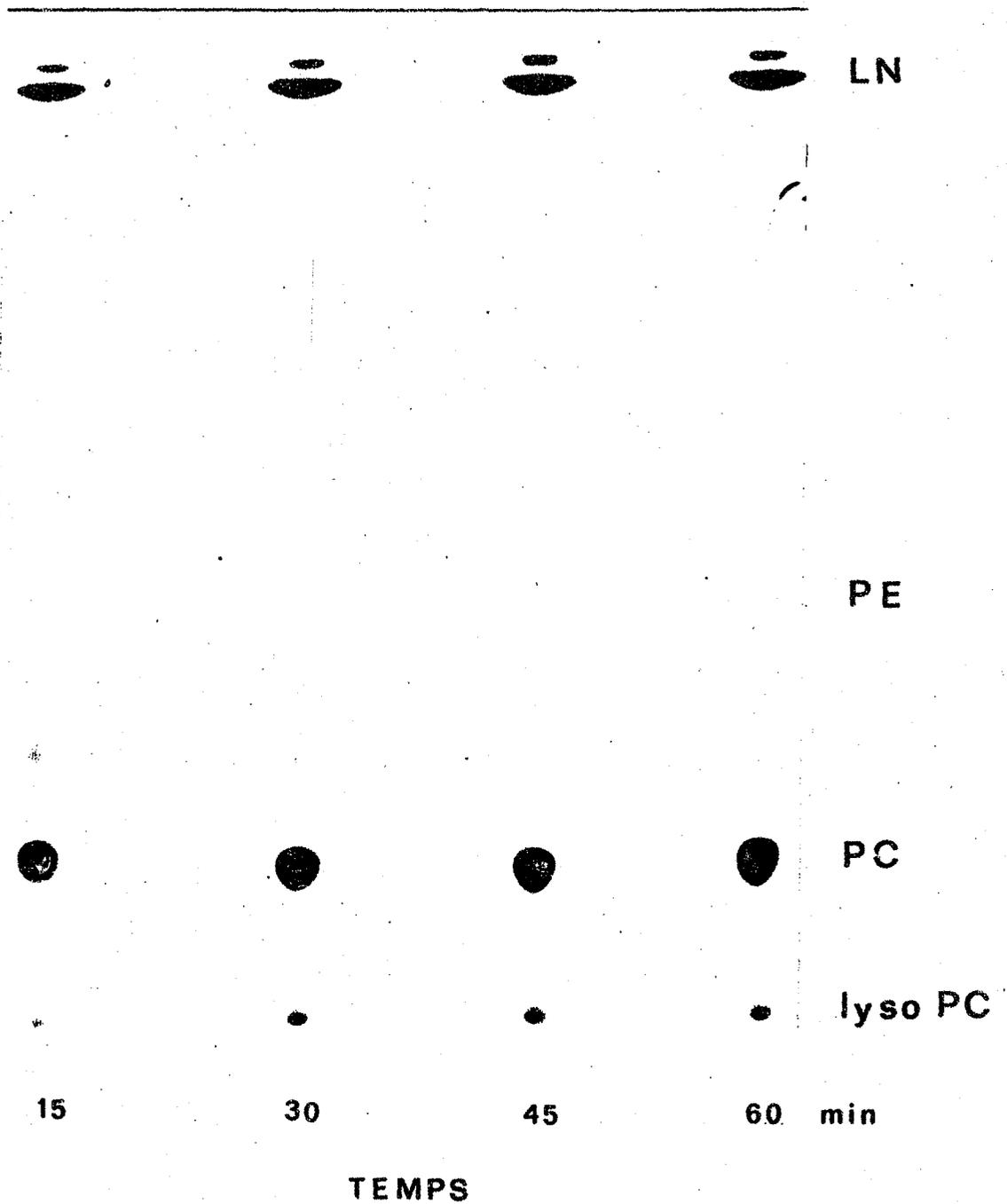


FIGURE 42 - Cinétique d'incorporation *in vitro* de [¹⁴C]-oléoyl-CoA dans les phospholipides de microsomes de Carthame

D - ETUDE DES DESATURATIONS IN VITRO

Afin de confirmer les résultats obtenus par les expériences conduites "in vivo", des expériences ont été réalisées "in vitro", avec des chloroplastes isolés, purifiés sur gradient de Percoll, et avec des microsomes. Les études effectuées à l'aide de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléoyl-CoA utilisé comme précurseur n'ont fourni aucun résultat exploitable, soit que le précurseur ait été immédiatement dégradé au contact des organites, soit qu'il ait été très mal utilisé sous la forme d'un thioester du Coenzyme A. Il nous a donc fallu conduire cette expérimentation "in vitro" avec de l' $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA.

1 - Etude avec les microsomes

a - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA

L'incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les microsomes augmente en fonction de temps. Cependant plus de 70% du précurseur fourni n'est pas métabolisé et se retrouve sous la forme d'acides gras libres (tableau XXXVI).

TABLEAU XXXVI - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les microsomes.

Temps (mn)	Incorporation nmoles/mg de protéines		
	Incorporation totale	AGT	AGL
15	9,5	8	7
30	15	12	8,9
45	18	14	9,2
60	22	21	10

b - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques

La figure 41 illustre l'incorporation d' $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques des microsomes. Le précurseur s'accumule très rapidement dans les phospholipides. La PC est le phospholipide le plus marqué. La radioactivité dans la PE et PA représente 1/10 de celle détectée dans la PC après 1 heure d'incubation (fig. 42).

Les DAG sont beaucoup plus faiblement marqués. L'autoradiographie des acides gras des DAG séparés sur nitrate d'argent a montré que les produits d'oxydation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA migrent au même niveau que les DAG. Le

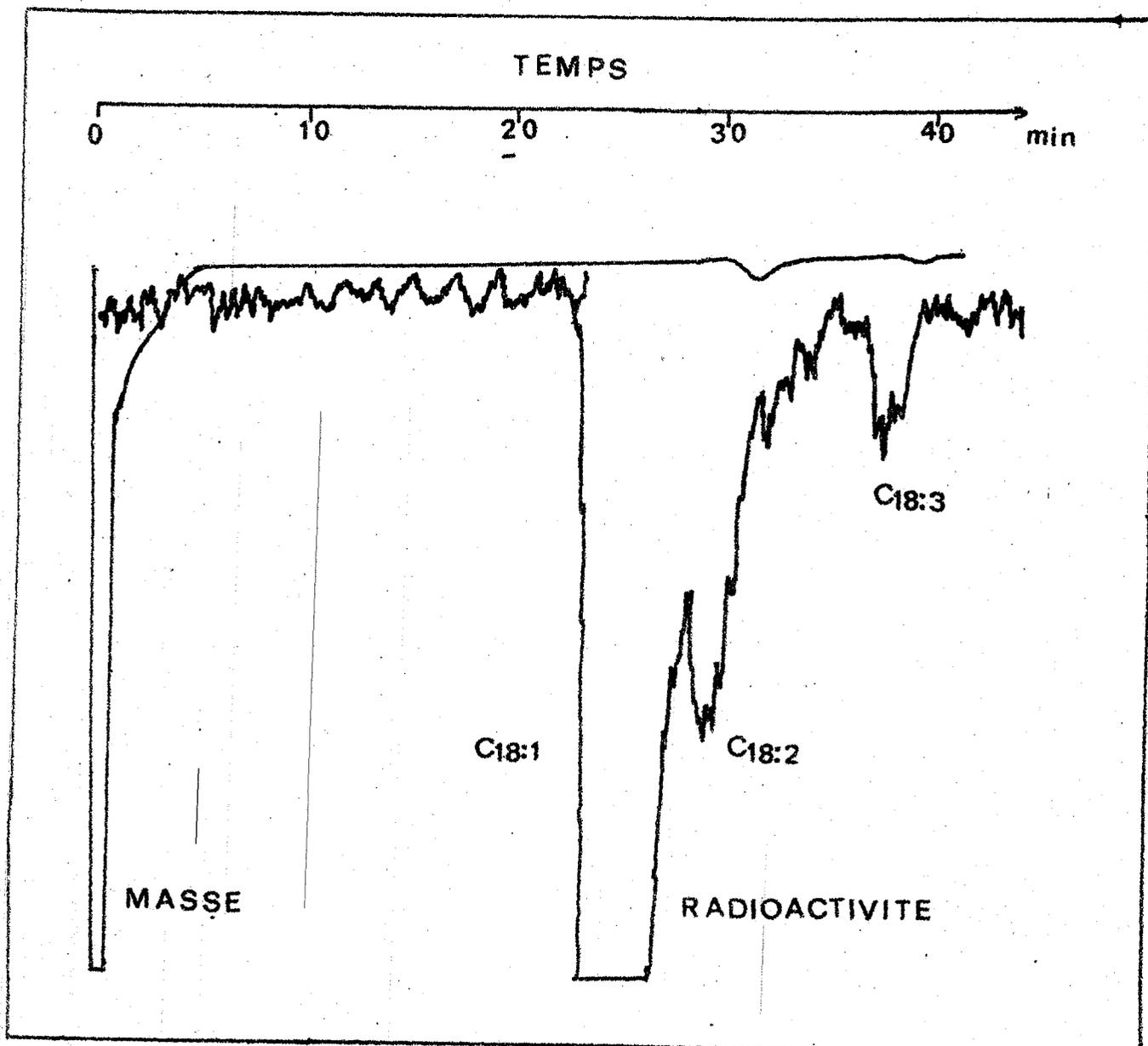


FIGURE 43 - Radiochromatogramme montrant la désaturation des résidus $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl dans la phosphatidylcholine des microsomes de Carthame

pourcentage de produits d'oxydation trouvé est de 14%. Il nous a fallu alors corriger la valeur de la radioactivité trouvé dans les DAG. Les valeurs données sur les graphiques sont corrigées. La distribution de la radioactivité des résidus dans les différentes catégories de lipides montre une augmentation de la radioactivité dans PC et une diminution dans les DAG en fonction du temps (tableau XXXVII).

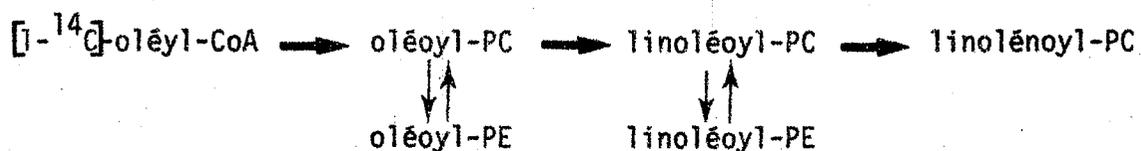
TABLEAU XXXVII - Distribution de la radioactivité incorporée dans les différentes catégories lipidiques des microsomes

Temps (mn)	% de la radioactivité incorporée				
	DAG	Lyso-PC	PC	PE	PA
15	18	4	63	8	4
30	16	4	68	8	4
45	16	6	70	6	3
60	14	5	71	5	2,8

c - Désaturation des résidus $[1-^{14}C]$ -oléoyl

Les résidus d' $[1-^{14}C]$ -oléoyl incorporés dans la PC sont désaturés rapidement en linoléoyl-PC. Le pourcentage de désaturation augmente en fonction de temps et atteint 25% après une heure d'incubation (tableau XXXVIII). Il est intéressant de noter que la désaturation de linoléoyl-PC en linolénoyl-PC a lieu dans les microsomes. Cependant, le pourcentage de la troisième désaturation reste faible (5%) (fig. 43).

La composition des acides gras de PE montre un fort pourcentage de résidus $[1-^{14}C]$ -linoléoyl. Il est peu probable que $[1-^{14}C]$ -oléoyl soit désaturé dans ce phospholipide car l'incorporation du précurseur est très faible. On doit donc envisager la conversion de $[1-^{14}C]$ -linoléoyl-PC en $[1-^{14}C]$ -linoléoyl-PE suivant le schéma :



Le pourcentage de désaturation trouvé dans les DAG s'est révélé très important. Après 15 mn d'incubation, on obtient 40% de linoléate et 12% de linolénoate.

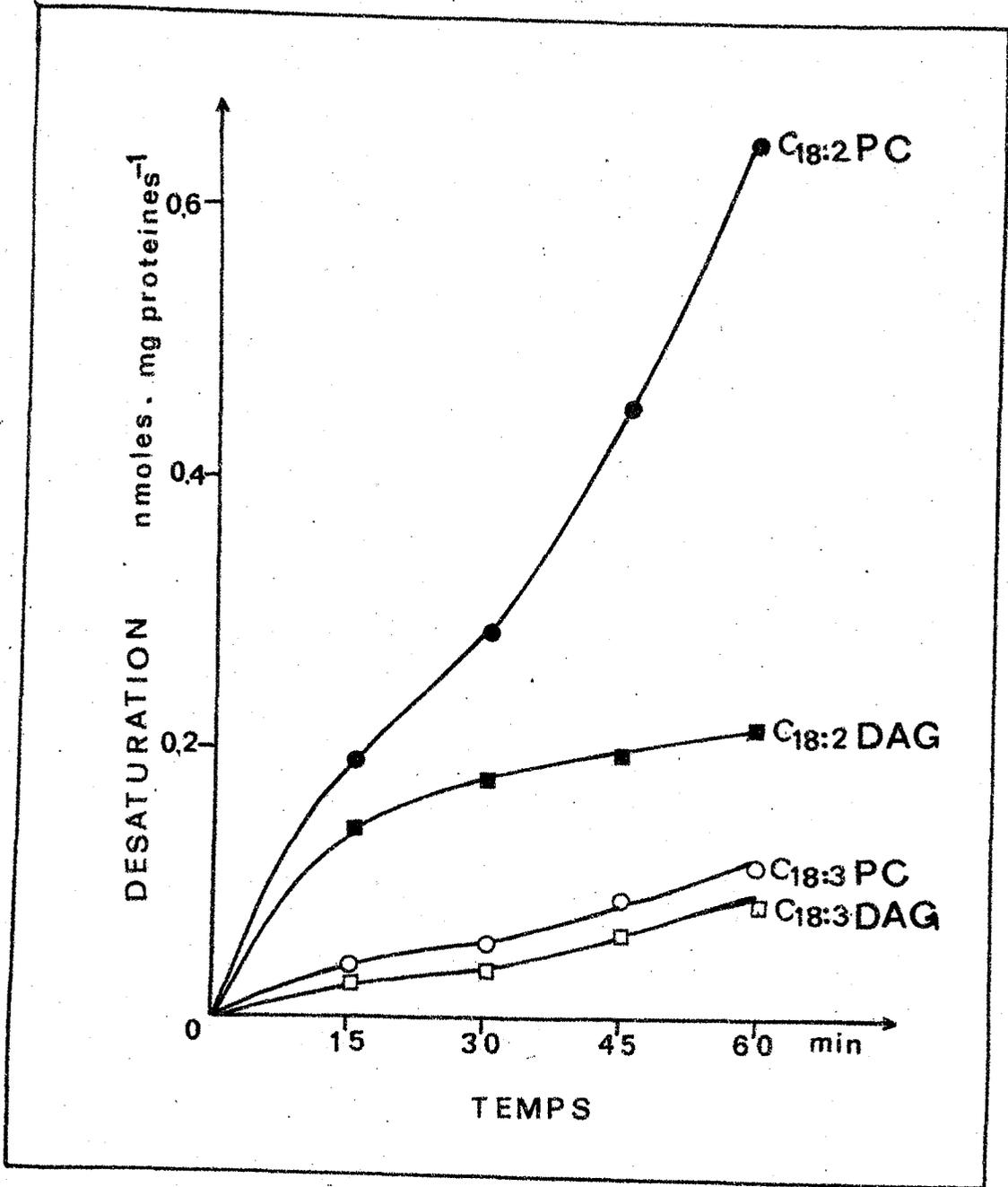


FIGURE 44 - Cinétique de désaturation *in vitro* de résidus $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl dans la phosphatidylcholine et les diacylglycérols de microsomes de Carthame

TABLEAU XXXVIII - Désaturation des résidus d' [1-¹⁴C] -oléoyl dans les catégories lipidiques des microsomes (en %)

Temps (mn)	Désaturation en %								
	PC			PE			DAG		
	18:1	18:2	18:3	18:1	18:2	18:3	18:1	18:2	18:3
15	82	14	3	69	30	--	26	40	12
30	79	17	3	60	40	--	20	50	12
45	75	21	3	54	45	--	21	50	15
60	69	25	5	54	45	--	16	50	19

Cependant la désaturation exprimée en nmoles de linoléate et linoléinate synthétisés en fonction du temps dans les différentes catégories lipidiques indique que l'oléoyl désaturase et la linoléoyl désaturase utilisent préférentiellement la PC comme substrat (fig. 44). En effet, la valeur trouvée pour le [1-¹⁴C]-linoléoyl-PC est 3 fois plus importante que celle trouvée pour le [1-¹⁴C]-linoléoyl-DAG ; de même la radioactivité du linoléoyl-PC est 2 fois plus importante que celle du linoléoyl-DAG.

Conclusion

Les résultats *in vitro* nous ont permis de mettre en évidence la désaturation de l'oléate en linoléate et linoléinate dans les microsomes. Ils montrent donc que l'oléoyl désaturase et la linoléoyl désaturase sont toutes les deux liées aux microsomes. Les cinétiques d'incorporation et de désaturation montrent que les substrats de ces enzymes sont l'oléoyl phosphatidylcholine et la linoléoyl-phosphatidylcholine, en bon accord avec SLACK *et al.* (1979).

La désaturation de linoléate en linoléinate a donc lieu avant la formation des galactolipides. D'après les résultats obtenus, il semblerait que dès que le linoléoyl-PC est formé, il serait rapidement converti en 18:3-DAG et CDP-choline selon la réaction :



Les 18:3-DAG seraient alors transférés vers le chloroplaste et galactosylés avec formation de MGDG. Les résultats obtenus *in vitro* peuvent finalement être schématisés de la façon suivante :

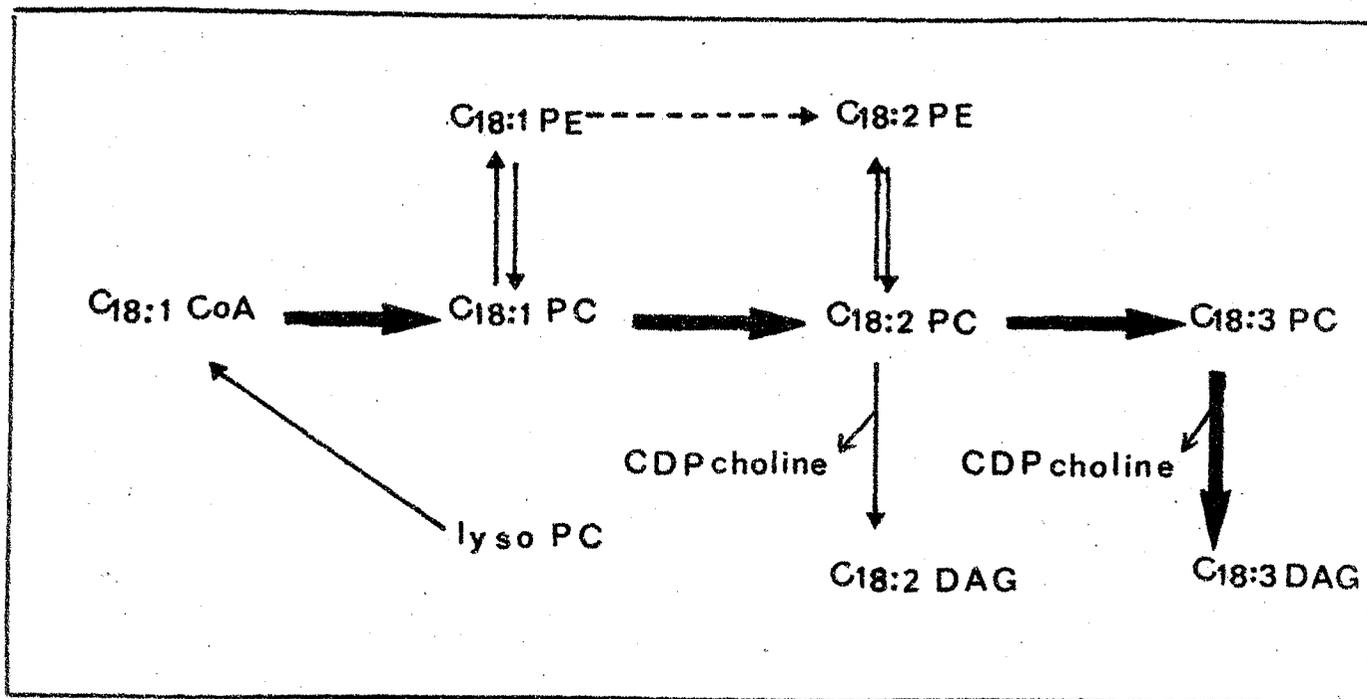


Schéma X - Désaturation "in vitro" de [1-¹⁴C]-oléoyl-CoA dans les microsomes de Carthame

2 - Etude avec les chloroplastes

300 µg de chloroplastes ont été mis en incubation dans un milieu contenant divers cofacteurs et du [1-¹⁴C]-oléoyl-CoA. Une série a été étudiée sans UDP-galactose dans le milieu, une autre série en présence d'UDP-galactose.

a - Incorporation de [1-¹⁴C]-oléoyl-CoA dans les chloroplastes

L'incorporation de [1-¹⁴C]-oléoyl-CoA dans les chloroplastes est faible. En effet plus de 80% de la radioactivité se retrouve sous la forme d'acides gras libres, vraisemblablement à cause de la présence dans les organites d'une thioestérase très active. L'incorporation du précurseur est à peu près identique en présence ou en absence de UDP-galactose (tableau XXXIX).

TABLEAU XXXIX - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les chloroplastes

nmoles/mg de chlorophylle						
Temps	- UDP gal			+ UDP gal		
	LT	AGT	AGL	LT	AGT	AGL
30 mn	4,7	4	3	5,3	4,3	3
1 h	6,7	5,5	4	6,8	5,9	4
1 h 30	8,9	6,7	5	8,9	7,7	5
2 h	10	9	7	10,7	8,9	7

b - Incorporation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques

Le tableau XXXX montre la répartition de la radioactivité incorporée dans les catégories lipidiques. L'acide phosphatidique est le phospholipide le plus marqué. Après 2 heures d'incubation, à peu près 60% de la radioactivité se retrouve dans ce phospholipide, alors que la PC ne renferme que 20% de la radioactivité.

TABLEAU XXXX - Répartition de la radioactivité incorporée dans les catégories lipidiques des chloroplastes

% de la radioactivité incorporée							
Temps	DAG	X	PC	PG	PA	MGDG	DGDG
en absence d'UDP gal							
30 mn	20	42	16	2	30	2,4	6
1 h	25	14	21	2	52	2,8	5
1 h 30	32	8	21	3	58	3	4
2 h	35	7	20	3	58	4	3
en présence d'UDP gal							
30 mn	23	38	20	3	27	4	6
1 h	28	8	23	4	48	10	5
1 h 30	30	10	19	2	53	10	3
2 h	30	4	21	3	53	14	3

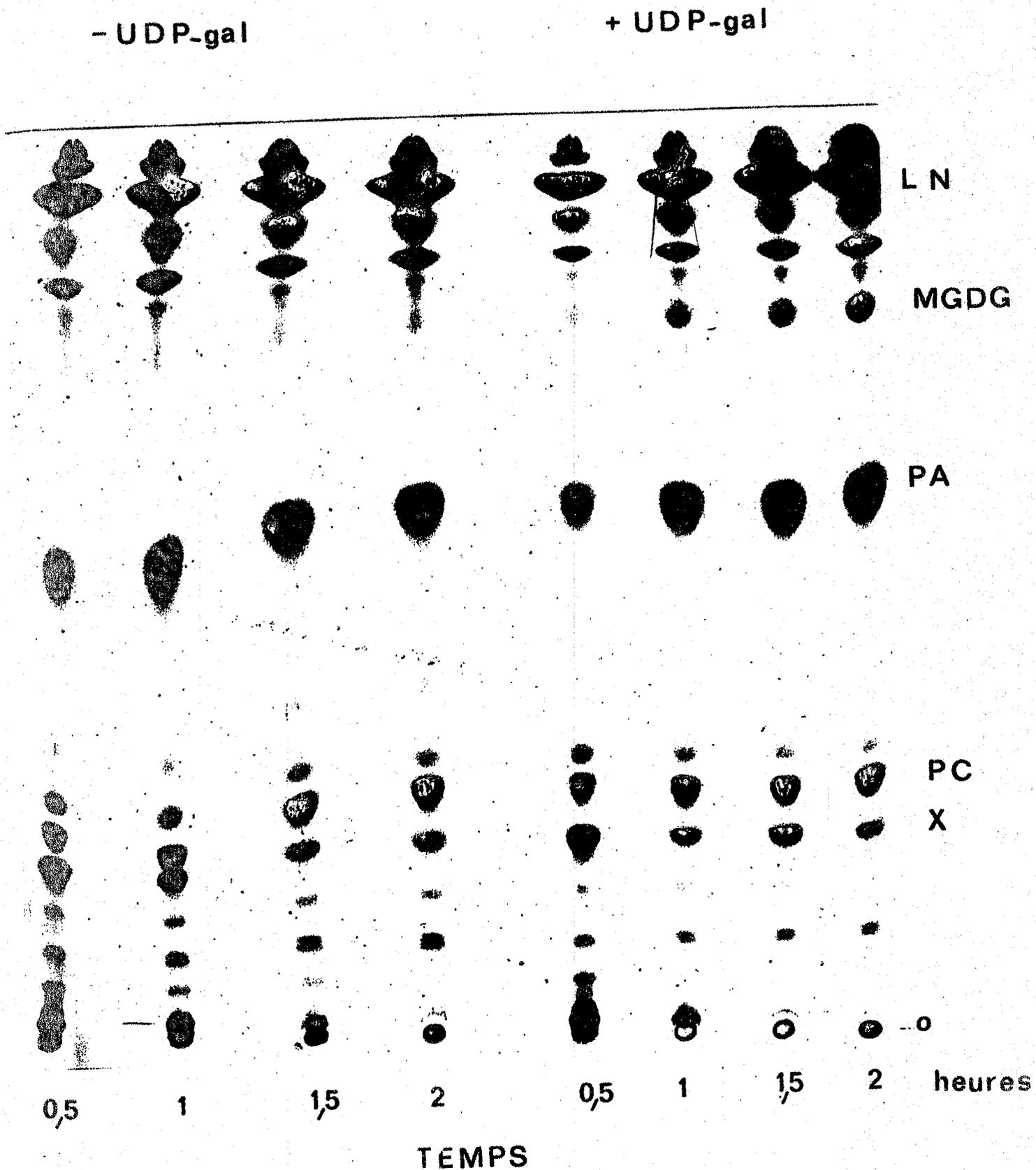


FIGURE 45 - Cinétiques d'incorporation *in vitro* de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les phospholipides de chloroplastes de Carthame

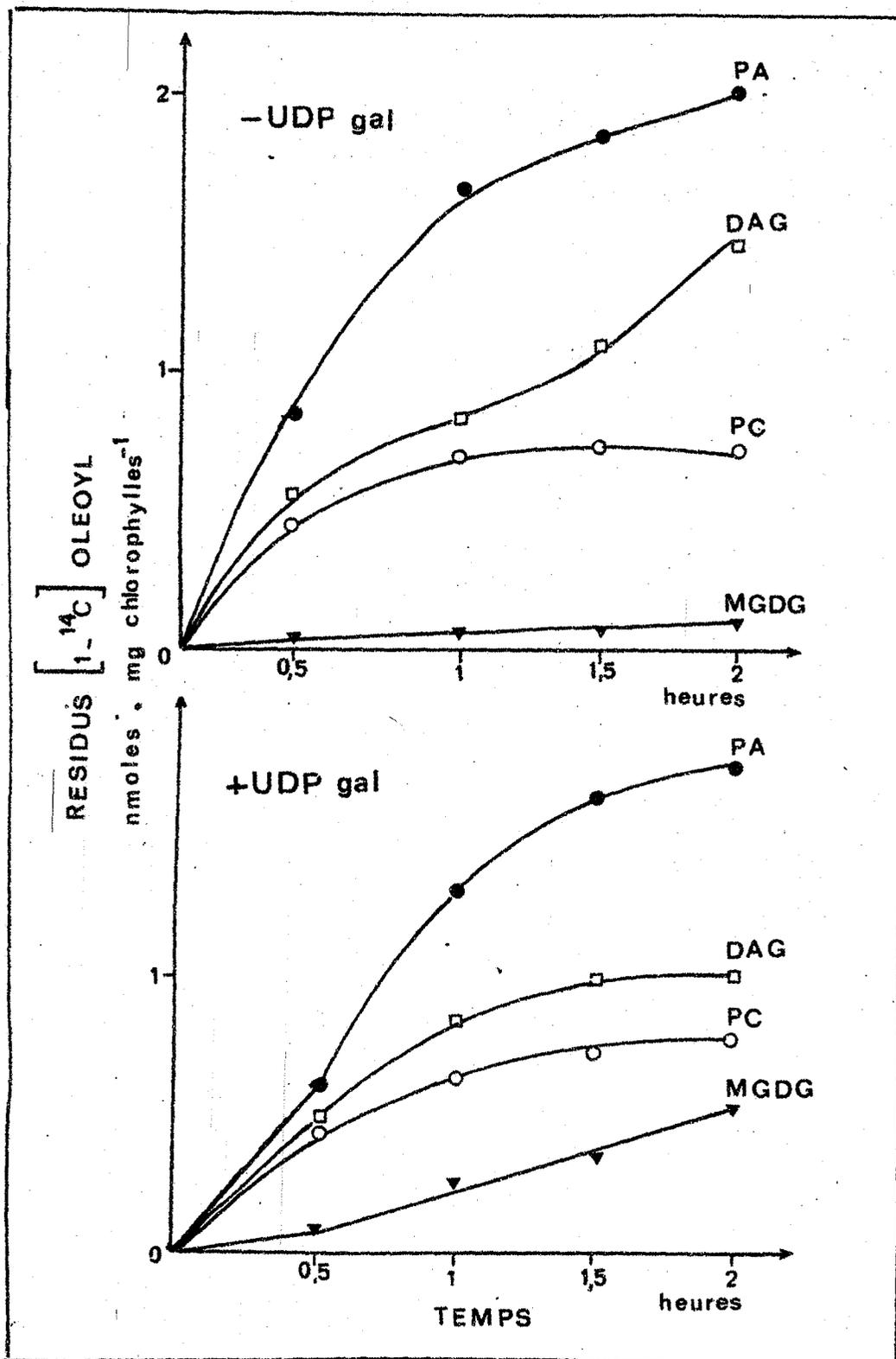


FIGURE 46 - Cinétiques d'incorporation *in vitro* de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les catégories lipidiques de chloroplastes de Carthame

Après 30 mm d'incubation, la plus grande partie de la radioactivité est retrouvée dans un composé migrant sur les plaques au niveau du PI (40%). Cette valeur diminue considérablement et après 2 heures d'incubation elle n'est que de 4%. Nous n'avons donc pas poussé plus loin l'identification de ce composé (fig. 45).

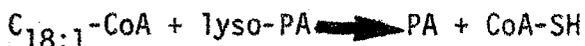
La radioactivité dans les DAG est également importante. On note un pourcentage légèrement moins important en présence d'UDP-galactose.

L'évolution du marquage dans les galactolipides montre une augmentation de la radioactivité dans le MGDG en présence d'UDP-galactose. Dans le DGDG, la radioactivité reste faible : après 2 heures d'incubation, le pourcentage de radioactivité atteint est de 14% pour MGDG et uniquement 3% pour le DGDG.

L'incorporation exprimée en nmoles montre que le PA est activement synthétisé en présence de Sn-G₃P et de deux acyltransférases localisées dans l'enveloppe du chloroplaste. La première acyl-transférase catalyse la réaction suivante :



et la deuxième intervient dans la transformation du lyso-PA en PA



La figure 4 montre également que les DAG sont activement synthétisés. La cinétique d'incorporation met en évidence l'augmentation de la radioactivité en absence d'UDP-gal. Ces DAG proviennent probablement d'une déphosphorylation de PA par une phosphatase alcaline (JOYARD et DOUCE, 1976, 1977) présente dans l'enveloppe du chloroplaste. Les DAG peuvent provenir d'une hydrolyse de PC mais jusqu'à présent on n'a pas détecté de phospholipase de type C hydrolysant la PC en DAG.

En présence d'UDP-gal, la radioactivité des DAG plafonne après 1 heure d'incubation. Les DAG sont galactosylés en présence d'une diacylglycérol galactosyltransférase présente également dans l'enveloppe du chloroplaste (CLINE et KEEGSTR, 1983 ; DORNE *et al.*, 1982 ; SANDELIUS *et al.*, 1984)



La synthèse du DGDG est beaucoup plus lente et moins importante. Elle peut se faire par l'intermédiaire de deux enzymes :

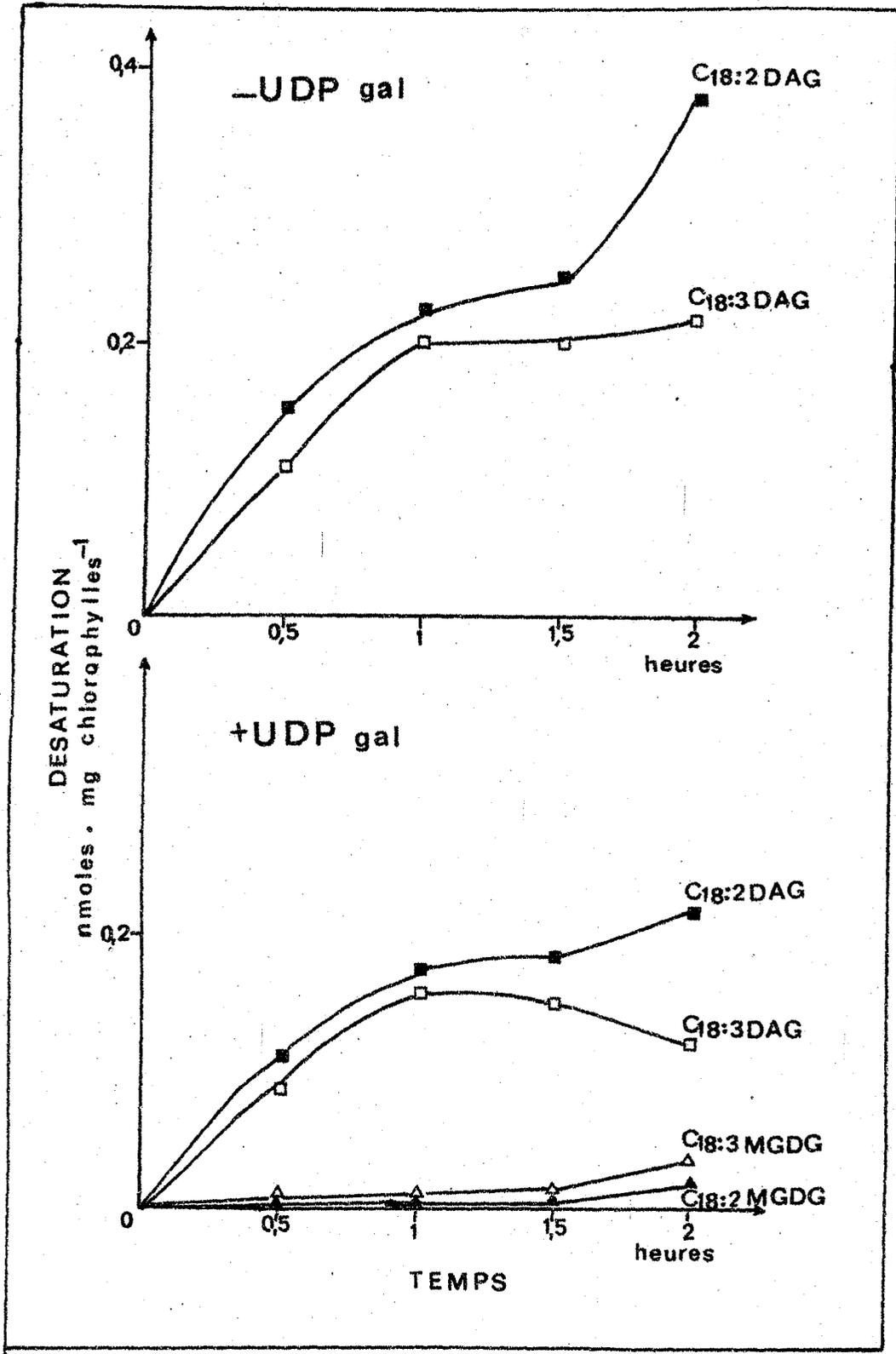


FIGURE 47 - Cinétique de désaturation *in vitro* des résidus [1-¹⁴C]-oléoyl dans les diacylglycérols et le monogalactosyldiacylglycérol de chloroplaste de Carthame

- 1 - MGDG galactosyltransférase (DOUCE et JOYARD, 1980)
 $\text{UDP-gal} + \text{MGDG} \longrightarrow \text{DGDG} + \text{UDP}$
- 2 - galactolipide galactosyltransférase (VAN BESOW et WINTERMANS, 1978)
 $\text{MGDG} + \text{MGDG} \longrightarrow \text{DGDG} + \text{DAG}$

c - Désaturation des résidus $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl

La cinétique de marquage des acides des phospholipides ne montre aucune activité de désaturation. L'oléoyl-CoA n'est pas désaturé ni au niveau de PA ni au niveau de PC.

Cependant on observe une désaturation au niveau des DAG du chloroplaste. Il est intéressant de noter l'apparition du $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléate et $[1-^{14}\text{C}]$ -linolénoate après 30 mn d'incubation.

Les pourcentages de désaturation représentés dans le tableau XXXXI indiquent une désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les DAG. Cependant la diminution du pourcentage du résidu linolénoyl s'explique par l'augmentation des produits d'oxydation au cours de l'incubation.

Les résultats d'incorporation $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA données dans les DAG ont été corrigés.

TABLEAU XXXXI - Désaturation de $[1-^{14}\text{C}]$ -oléoyl-CoA dans les DAG du chloroplaste

Temps	% de désaturation							
	Produits d'oxydation	- UDP-gal			+ UDP-gal			Produits d'oxydation
		18:1	18:2	18:3	18:1	18:2	18:3	
30 mn	20	28	27	20	21	31	28	18
1 h	21	25	28	25	21	37	21	20
1 h 30	27	34	22	18	26	40	18	15
2 h	28	32	25	15	28	38	22	12

La désaturation exprimée en nmoles de $[1-^{14}\text{C}]$ -linoléoyl et $[1-^{14}\text{C}]$ -linolénoyl synthétisés montre que les désaturases ne sont pas liées aux galactolipides. La figure 47 met en évidence la diminution des résidus linolénoyl dans les DAG après une heure d'incubation en présence d'UDP-gal. Cette diminution est accompagné de l'apparition de $[1-^{14}\text{C}]$ -linolénoyl dans la molécule de MGDG.

Sans UDP-gal la quantité de [$1-^{14}C$]linolénoyl dans les DAG reste stationnaire après une heure d'incubation.

Conclusion

Les chloroplastes isolés en présence d' [$1-^{14}C$]oléoyl-CoA synthétisent une grande quantité de PA et de DAG. Cette synthèse semble avoir lieu dans l'enveloppe du chloroplaste. En présence d'UDP-gal, il se forme du MGDG à partir des DAG.

Il est intéressant de noter que les DAG du chloroplaste contiennent des acides gras di et triinsaturés. La désaturation semble avoir lieu avant la formation des galactolipides.

La voie de synthèse probable de l'acide α linoléinique dans les chloroplastes isolés se résumerait donc de la façon suivante :

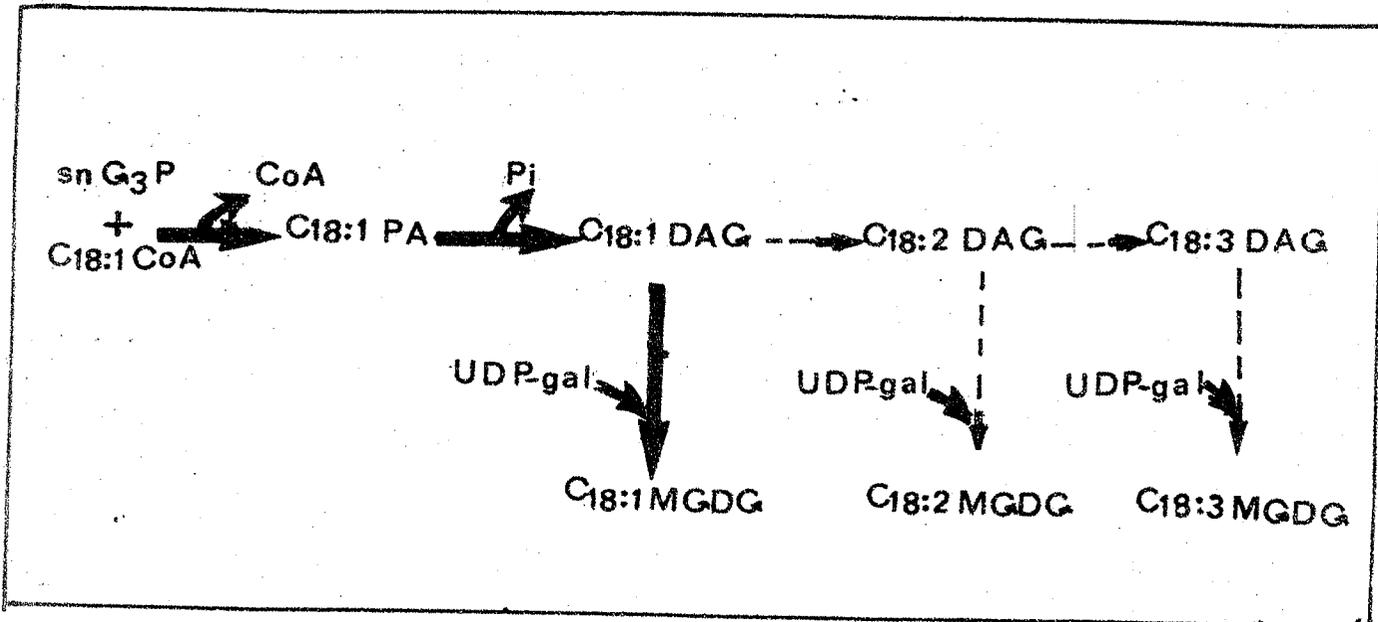


Schéma XI - Voie de synthèse de l'acide α linoléinique dans les chloroplastes isolés

Les travaux effectués sur les chloroplastes isolés en présence d'acétate et oléoyl-CoA montrent que la désaturation a lieu dans la molécule de MGDG (OHNISHI et YAMADA, 1980, 1982 ; TREMOLIERES *et al.*, 1979, 1980).

Nos résultats montrent une désaturation des molécules de DAG. Cependant la radioactivité étant faible dans ces catégories lipidiques, on n'a

pu identifier de façon certaine les produits de désaturation soit par hydrogénation, soit par radiochromatographie. Des expériences complémentaires devront être réalisées à l'avenir pour confirmer ce point important, qui remettait partiellement en cause l'hypothèse d'une coopération nécessaire entre chloroplastes et microsomes pour la synthèse de l'acide linoléique des galactolipides.

CONCLUSIONS GENERALES

Outre son intérêt économique pour la production d'huile consommable, le Carthame est un bon matériel biologique pour une recherche fondamentale sur le fonctionnement des désaturases végétales.

Dans ce travail nous avons abordé la formation des lipides lors de la maturation de l'akène. L'accumulation des lipides se fait de façon assez semblable à ce qui se produit dans les autres semences oléagineuses (CHERIF, 1975 ; MAZLIAK, 1968). La synthèse active des lipides semble avoir lieu à partir de la troisième semaine après la floraison. Dans la semence néoformée on assiste principalement à une synthèse des lipides polaires entrant dans la constitution des structures membranaires, puis ces premières synthèses cèdent rapidement la place à une accumulation des lipides de réserves.

L'étude du métabolisme lipidique dans les feuilles cotylédonnaires des plantules de Carthame nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

- 1 - Les études d'incorporations effectuées "*in vivo*" à l'aide du $[1-^{14}C]$ -acétate montre que l'oléate et le linoléate apparaissent rapidement dans la PC. Les acides palmitique et palmitoléique apparaissent eux très rapidement dans le PG.
- 2 - L'étude du fonctionnement des désaturases effectué à l'aide de $[1-^{14}C]$ -oléate et $[1-^{14}C]$ -linoléate montre que l'oléyl phosphatidylcholine est le substrat de la première désaturase et que la linoléoyl-PC est le substrat de la deuxième. Le fort pourcentage d'acide linoléique trouvé dans les DAG indique une implication de ces molécules dans le métabolisme ultérieur de cet acide gras triinsaturé.
- 3 - Les expériences de marquage "*in vivo*" effectuées avec du $[1-^{14}C]$ -linoléate, suivies d'un fractionnement cellulaire, montrent une apparition rapide du linoléate radioactif dans les DAG du réticulum endoplasmique, suggérant également une participation de ces molécules au métabolisme de l'acide linoléique. On note aussi la présence de linoléate radioactif dans les molécules de PC des différentes fractions cellulaires. Ces résultats ne permettent donc pas de préciser le site cellulaire de la désaturation de linoléate. De plus, la réaction de désaturation peut utiliser comme substrat, soit la PC, où le linoléate est fortement incorporé, soit les DAG dérivant de la PC.
- 4 - Les expériences effectués "*in vitro*" sur les microsomes et chloroplastes isolés ont permis de mettre en évidence l'apparition de linoléate radioactif dans la PC des microsomes.

Une activité linoléoyl désaturase a été trouvée dans les microsomes de Lin (BROWSE et SLACK, 1981) et les microsomes d'Epinard (DUBACQ *et al.*, 1983). D'après les résultats obtenus, on peut penser que dès que la désaturation a eu lieu, il y a libération des DAG contenant un fort pourcentage d'acides gras triinsaturés. Ces DAG seraient alors transférés vers le chloroplaste où l'acide linoléique serait incorporé aux galactolipides. Il restera à étudier sous quelle forme se fait le transfert des DAG.

- Par l'intermédiaire des protéines d'échanges, comme les phospholipides (MAZLIAK et KADER, 1980) ?
- Par flux membranaire (MORRE, 1975) ?
- Par diffusion entre le réticulum et le chloroplaste ?

La formation de l'acide linoléique dans le Carthame se ferait donc selon la voie "eucaryote" définie par ROUGHAN (1970). Cette voie présente dans les plantes en C_{18:3} a été beaucoup étudiée. A partir de l'acétate le chloroplaste synthétise les acides gras saturés avec formation du palmityl-ACP et stéaryl-ACP. La formation de l'oléoyl-ACP se fait également dans le chloroplaste.

- 2 - L'oléoyl-CoA est exporté lors du chloroplaste (DRAPIER, 1984) et désaturé dans le réticulum endoplasmique. Il se trouve alors sous la forme de linoléoyl-PC.
- 3 - Le linoléoyl-PC est soit désaturé dans le réticulum endoplasmique (TREMOLIERES *et al.*, 1983 ; BROWSE et SLACK, 1981) et transféré par l'intermédiaire de "protéines d'échanges de phospholipides" vers le chloroplaste, soit transféré vers le chloroplaste puis désaturé après formation des galactolipides (YAMADA et OHNISHI, 1982).

Nos résultats nous permettent de proposer une nouvelle voie de synthèse de galactolipides riches en acide α linoléique (schéma XII).

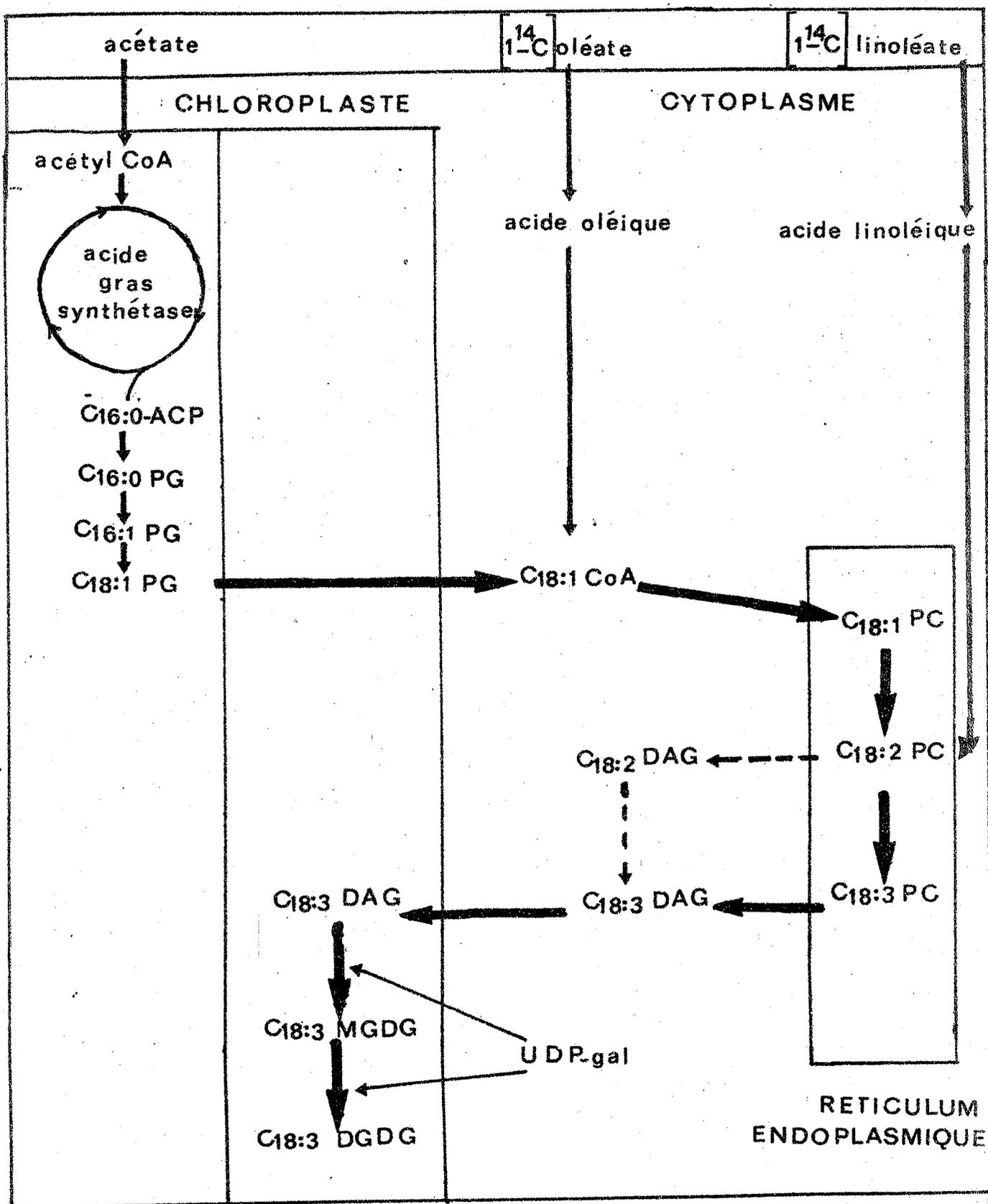


Schéma XII - Une nouvelle hypothèse pour la formation de l'acide linoléique des chloroplastes

Cependant les résultats obtenus avec le chloroplaste isolé ne nous permettent pas d'exclure totalement l'hypothèse d'une série de désaturations se produisant dans cet organite cellulaire. Ces désaturations pourraient être complémentaires de la voie principale impliquant la coopération plaste-microsomes. Par exemple il pourrait y avoir désaturation dans l'enveloppe du chloroplaste ; il nous resterait dans ce cas à déterminer les conditions requises pour l'activité des désaturases du chloroplaste.

BIBLIOGRAPHIE

- APPELQVIST L.A. (1975) - Biochemical and structural aspects of storage and membrane lipids in developing of seed. In : Recent advances in the Chemistry and Biochemistry of plant lipids. T. GALLIARD, E.P. SPENCER ed., Academic press, New York, 247-286.
- APPELQVIST L.A. (1980) - Biogenesis of lipids in oilseed plants. In : Biogenesis and function of plant lipids. P. MAZLIAK, P. BENVENISTE, C. COSTES et R. DOUCE, ed. Elsevier/North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, 177-189.
- ARNON D.I. (1949) - Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol., 24, 1-15.
- BEEVERS H. (1980) - The role of the glyoxylate cycle. In : Biochemistry of plants. IV Lipids : Structure and function. STUMPF P.K., ed. Academic Press New-York, London, 117-130.
- BEN ABDELKADER A., CHERIF A., DEMANDRE C. et MAZLIAK P. (1973) - The oleyl coenzyme A desaturase of potato tubers. Europ. J. Biochem., 32, 155-165.
- BLIGH E.G. et DYER W.J. (1959) - A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem., 37, 911-917.
- BOLTON P. et HARWOOD J.L. (1978) - Fatty acid synthesis by slices from developing leaves. Planta, 138, 223-229.
- BROWSE J.A. et SLACK C.R. (1981) - Catalase stimulates linoleate desaturation in microsome preparations from developing linseed cotyledons. F.E.B.S. Letters, 131, 111-114.
- BROWSE J.A. et SLACK C.R. (1983) - The effects of temperature and oxygen on the rates of fatty acid synthesis and oleate desaturation in safflower (Carthamus tinctorius) seed. Biochim. Biophys. Acta, 753, 145-152.
- CARREAU J.P. et DUBACQ J.P. (1978) - Adaptation of a macroscale method to the microscale for fatty acid methyl trans esterification of biological extracts. J. Chromatogr., 151, 384-390.
- CHERIF A. (1975) - Formation de l'acide linoléique dans les tubercules de Pomme de terre et dans les graines de quelques espèces oléagineuses (Lin, Colza, Tournesol). Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences naturelles, Paris, 101p.
- CHERIF A., DUBACQ J.P., MACHE A., OURSEL A. et TREMOLIERES A. (1975) - Biosynthesis of α linolenic acid by desaturation of oleic and linoleic acids in several organs of higher and lower plants and algae. Phytochem., 14, 703-706.

- CHERIF A. et MAZLIAK P. (1978) - Formation de l'acide linoléique dans les graines de Tournesol. Rev. Fr. Cons. Gras, 25, 15-20.
- CLINE K. et KEEGSTRAL (1983) - Galactosyl-transferases involved in galactolipid biosynthesis are located in the outer membrane of pea chloroplast envelopes. Plant Physiol., 71, 366-372.
- DORNE A.J., BLOCK M.A., JOYARD J. et DOUCE R. (1982) - The galactolipid : galactolipid galactosyl-transferase is located on the outer surface of the outer membrane of the chloroplast envelope. F.E.B.S. Letters, 145, 30-34.
- DOUCE R. et JOYARD J. (1980) - Plant galactolipids. In : Biochem. of plants, vol. 4, STUMPF, ed. Academic Press, New-York, 321-362.
- DRAPIER D. (1984) - Coopération entre les chloroplastes et d'autres organites cytoplasmiques pour la synthèse des lipides foliaires de Pois et de l'Epinard. Thèse de Doctorat d'Université, Paris, 85p.
- DRAPIER D., DUBACQ J.P., TREMOLIERES A. et MAZLIAK P. (1982) - Cooperative pathway for lipid biosynthesis in young pea leaves : oleate exportation from chloroplasts and subsequent integration into complex lipids of added microsomes. Plant cell physiol., 23, 125-135.
- DUBACQ J.P., DRAPIER D. et TREMOLIERES A. (1983) - Polyunsaturated fatty acid synthesis by a mixture of chloroplasts and microsomes from spinach leaves : evidence for two pathways of biosynthesis of trienoic acids. Plant cell physiol., 24, 1-9.
- DUBACQ J.P., DRAPIER D., TREMOLIERES A. et KADER J.P. (1984) - Role of phospholipid transfer protein in the exchange of phospholipids between microsomes and chloroplasts. Plant cell physiol., 25, 1197-1204.
- DUBACQ J.P., MAZLIAK P. et TREMOLIERES A. (1976) - Subcellular localization of the oleyl coenzyme A desaturase activity in pea leaves. F.E.B.S. Letters, 66, 183-186.
- DUBACQ J.P. et TREMOLIERES A. (1983) - Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing Δ^3 trans hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. Physiol. vég., 21, 293-312.
- GARDINER S.E., ROUGHAN P.G. et BROWSE J. (1984) - Glycerolipid labelling kinetics in isolated intact chloroplasts. Biochem. J., 224, 637-643.
- GARDINER S.E., ROUGHAN P.G. et SLACK C.R. (1982) - Manipulating the incorporation of $1-^{14}\text{C}$ -acetate into different leaf glycerolipids in several plant species. Plant physiol., 70, 1316-1320.
- GOLDAM P. et VAGELOS P.R. (1961) - Chemical synthesis of acyl-CoA esters. J. Biol. Chem., 236, 2620-2629.

- GUILLOT-SALOMON T., TREMOLIERES A., TUQUET C. et DUBACQ J.P. (1980) - Trans -3 hexadecenoic acid and grana stacking. In : Biogenesis and function of plant lipids. P. MAZLIAK, E. BENVENISTE, C. COSTES et R. DOUCE, ed. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 95-98.
- GURR M.I. (1980) - The biosynthesis of triacylglycerols. In : Biochem plant, vol. 4, ed. STUMPF P.K. et CONN E.E., 205-248.
- HARRIS R.V. et JAMES A.T. (1965) - Linoleic and linolenic acid biosynthesis in plant leaves and a green alga. Biochim. Biophys. Acta, 106, 456-464.
- HARRIS R.V. et JAMES A.T. (1969) - The effect of low temperature on fatty acid biosynthesis in plants. Biochem. J., 112, 325-330.
- HAWKE J.C., RUMSBY M.G. et LEECH R.M. (1974) - Lipid biosynthesis in green leaves in developing maize. Plant physiol., 53, 555-561.
- HAWKE J.C. et STUMPF P.K. (1980) - The incorporation of oleic and linoleic acids and their desaturation products into the glycerolipids of maize leaves. Arch. Biochem. Biophys., 203, 296-306.
- HEINZ E. et ROUGHAN P.G. (1983) - Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplast isolated from C_{18:3} and C_{16:3} plants. Plant physiol., 72, 273-279.
- HORSTEIN I., CROUSE P.F. et RUCK J.B. (1967) - Séparation des lipides sans chromatographie. Anal. Chem., 39, 352-354.
- HULANICKA D., ERWIN J. et BLOCK K. (1964) - Lipid metabolism of Euglena gracilis. J. Biol. Chem., 239, 2778-2787.
- ICHIHARA K.I. et NODA M. (1980) - Fatty acid composition and lipid synthesis in developing safflower seeds. Phytochem., 19, 49-54.
- ICHIHARA K.I. et NODA M. (1981) - Lipid synthesis in germinating safflower seeds and protoplasts. Phytochem., 20, 1023-1030.
- ICHIHARA K.I. et NODA M. (1982) - Some properties of diacylglycerol acyltransferase in particulate fraction from maturing safflower seeds. Phytochem., 21, 1895-1901.
- JACOBSON B.S., KANNANGARA C.G. et STUMPF P.K. (1973a) - Biosynthesis of α linoleic acid by disrupted spinach chloroplast. Biochem. Biophys. Res. Comm., 51, 487-493.
- JACOBSON B.S., KANNANGARA C.G. et STUMPF P.K. (1973b) - The elongation of medium chain trienoic acids to α linolenic acid by spinach chloroplast stroma system. Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 1190-1198.
- JAWORSKI J.C. et STUMPF P.K. (1974) - Properties of a soluble stearyl-ACP desaturase from maturing Carthamus tinctorius. Arch. Biochem. Biophys., 162, 158-165.

- JOYARD J. et DOUCE R. (1976) - Mise en évidence et rôle des diacylglycérols de l'enveloppe des chloroplastes d'Épinard. Biochim. Biophys. Acta, 424, 125-131.
- JOYARD J. et DOUCE R. (1977) - Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 486, 273-285.
- JULIENNE M., VERGNOLLE C. et KADER J.P. (1981) - Activity of phosphatidylcholine transfer protein from spinach (Spinacia oleracea) leaves with mitochondria and chloroplasts. Biochem. J., 197, 763-766.
- KADER J.C., DOUADY D., JULIENNE M., GROSBOIS M., GUERBETTE F. et VERGNOLLE C. (1982) - Phospholipid transfer proteins from maize seeds and spinach leaves. In : Biochem. and Metabolism of plants lipids. J.F.G.M. WINTERMANS et P.J.C. KUIPER, ed., Elsevier Biomedical, 8, 107-110.
- KANNANGARA C.G., JACOBSON B.S., STUMPF P.K. (1973) - In vivo biosynthesis of α linolenic acid in plants. Biochem. Biophys. Res. Comm., 52, 648-655.
- KASAI R., KITAJIMA Y., MARTIN C.E., NOZAWA Y., SKRIVER L. et THOMPSON G.A. (1976) - Molecular control of membrane properties during temperature acclimatation. Membrane fluidity regulation of fatty acid desaturase action. Biochem., 15, 5228-5233.
- KENNEDY E.P. (1961) - Biosynthesis of complex lipids. Fed. Proc. Am. Exp. Biol., 20, 934-940.
- LEPAGE M. (1967) - Identification and composition of turnip root lipids. Lipids, 2, 244-250.
- LEM N.W. et WILLIAMS J.P. (1983) - Changes in the ^{14}C -labelling of molecular species of 3-monogalactosyl 1,2-diacylglycerol in leaves of Vicia faba treated with compound sam 9785. Biochem. J., 209, 513-518.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RENDALL R.J. (1951) - Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAC MAHON V. et STUMPF P.K. (1964) - Synthesis of linoleic acid by particulate system from safflower seeds. Biochim. Biophys. Acta, 84, 359-361.
- MAC MAHON V. et STUMPF P.K. (1966) - Fat metabolism in higher plants. XXVI Biosynthesis of fatty acids in tissues of developing seeds and germinating seedlings of safflower (Carthamus tinctorius L.). Plant Physiol., 41, 148-156.
- MANGOLD H.K. (1961) - Thin layer chromatography of lipids. J. am. Oil. chemist's soc., 38, 708-724.
- MANGOLD H.K. (1964) - Thin layer chromatography of lipids. J. am. oil. chemist's soc., 47, 762-773.

- MAZLIAK P. (1968) - Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures. Masson et Cie ed., Paris 223p.
- MAZLIAK P. (1973) - Lipid metabolism in plant. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 287-310.
- MAZLIAK P. (1980) - Formation des acides gras polyinsaturés dans le règne végétal. Ann. Nutr. Alim., 34, 189-206.
- MAZLIAK P, JOLLIOT A. et BONNEROT C. (1982) - Biosynthesis and metabolism of phospholipids. Biochem. Metabolism of plant lipids, 8. WINTERMANS J.F.G.M. et KUIPER P.J.C. ed., Elsevier Biomedical, 89-98.
- MAZLIAK P. et KADER J.C. (1980) - Phospholipid-exchange systems Biochemistry of plants, 4, STUMPF, ed. Academic Press, New-York, 283-298.
- MAZLIAK P. et TCHANG F. (1983) - Installation et utilisation des réserves lipidiques dans les graines oléagineuses. Bul. Soc. Bot. F., 34, 49-56.
- MILLS W.R. et JOY K.W. (1980) - A rapid method for isolation of purified physiologically active chloroplasts, used to study the intracellular distribution of amino acids pea leaves. Planta, 148, 75-83.
- MONGA P.K., MUNSHI S.K. et SUKHIJA P.S. (1983) - Lipid biosynthesis in the developing sunflower (Heliantus annuus L.) seeds. Plant Sci. Letters, 31, 311-321.
- MURPHY D.J. et STUMPF P.K. (1979a) - Light dependent induction of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in greening Cucumber cotyledons. Plant Physiol., 63, 328-335.
- MURPHY D.J. et STUMPF P.K. (1979b) - Elongation pathway for α linolenic acid synthesis in spinach leaves. Plant Physiol., 64, 428-430.
- MURPHY D.J. et STUMPF P.K. (1980) - In vivo pathway of oleate and linoleate desaturation in developing cotyledons of Cucumis sativus L. seedlings. Plant Physiol., 66, 666-671.
- MURPHY D.J. et STUMPF P.K. (1981). The origin of chloroplastic coenzyme A. Arch. Biochem. Biophys., 212, 730-739.
- MOORE T.S. (1982) - Phospholipid biosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol., 33, 235-259.
- MORRE D.J. (1975) - Membrane biogenesis. Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 441-481.
- MUTO S. et BEEVERS H. (1974) - Lipase activities in castor bean endosperm during germination. Plant Physiol., 54, 23-28.
- NAGAI J. et BLOCK K. (1968) - Enzymatic desaturation of stearyl ACP. J. Biol. Chem., 243, 4626-4633.

- OHLROGGE J.B., SHINE W.E. et STUMPF P.K. (1979) - Fat metabolism in higher plants : characterization of plant acyl ACP and acyl CoA hydrolases. Arch. Biochem. Biophys., 189, 382-391.
- OHNISHI J. et YAMADA M. (1980) - Glycerolipid synthesis in avena leaves during greening of etiolated seedlings. Plant cell Physiol., 21, 1607-1618.
- OHNISHI J. et YAMADA M. (1982) - Glycerolipid synthesis in avena leaves during greening of etiolated seedlings. III Synthesis of α linolenoyl monogalactosyl diacylglycerol from liposomal linoleoyl phosphatidylcholine by avena plastids in the presence of phosphatidylcholine exchange protein. Plant cell Physiol., 23, 767-773.
- OHNISHI J. et YAMADA M. (1983) - Glycerolipid synthesis in avena leaves during greening of etiolated seedlings. IV Effect of light on fatty acid desaturation. Plant cell Physiol., 24, 1553-1557.
- ROUGHAN P.G. (1970) - Turnover of the glycerolipid of pumpkin leaves. The importance of phosphatidylcholine. Biochem. J., 117, 1-8.
- ROUGHAN P.G., HOLLAND R. et SLACK C.R. (1979a) - On the control of long chain fatty acid synthesis in isolated spinach (Spinacia oleracea) chloroplasts. Biochem. J., 184, 193-202.
- ROUGHAN P.G., MUDD J.B., McMANUS T.T. et SLACK C.R. (1979b) - Linoleate and α linolenate synthesis by isolated spinach chloroplasts. Biochem. J., 184, 571-574.
- ROUGHAN P.G. et SLACK C.R. (1977) - Long chain acyl coenzyme A synthetase activity of spinach chloroplasts is concentrated in the envelope. Biochem. J., 162, 457-459.
- ROUGHAN P.G. et SLACK C.R. (1982) - Cellular organization of glycerolipid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 33, 97-132.
- SANDELIUS A.T. et SELSTAM E. (1984) - Localization of galactolipid biosynthesis in etioplasts isolated from dark grown wheat (Triticum aestivum L.). Plant Physiol., 76, 1041-1046.
- SIEBERTS H.P. et HEINZ E. (1977) - Labelling experiments on the origin of hexa and octadecatrienoic acids in galactolipids from leaves. Z. Naturforsch., 32, 193-205.
- SIMPSON E.E. et WILLIAMS J.P. (1979) Galactolipid synthesis in Vicia faba leaves. IV Sites of fatty acid incorporation into the major glycerolipids. Plant Physiol., 63, 674-676.
- SIMS R.P.A., Mc GREGOR W.G., PLESSERS A.G. et MESS J.C. (1961) - Lipid changes in maturing oil bearing plants. I Gross changes in safflower and flax. J. am. oil. chemist's soc., 38, 273-328.

- STYMNE S. et STOBART A.K. (1984b) - The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower (Helianthus annuus L.). Biochem. J., 220, 481-488.
- STYMNE S. et STOBART A.K. (1985) - Oil synthesis in vitro in microsomal membranes from developing cotyledons of Linum usitatissimum L. Planta, 164, 101-104.
- STYMNE S., STOBART A.K. et GLAD G. (1983) - The role of the acyl-CoA pool in the synthesis of polyunsaturated 18-carbon fatty acids and triacylglycerol production in microsomes of developing safflower seeds. Biochim. Biophys. Acta, 752, 198-208.
- SUKHIJA P.S., BORTHABEUR A. et BATHIA I.S. (1980) - Effect of irrigation on lipid biosynthesis in maturing sunflower seeds. J. Sci. Food Agric., 31, 225-228.
- TREMOLIERES A., DRAPIER D., DUBACQ J.P. et MAZLIAK P. (1980) - Oleyl coenzyme A metabolism by subcellular fractions from growing pea leaves. Plant Sci. Letters, 18, 257-269.
- TREMOLIERES A., DUBACQ J.P. et DRAPIER D. (1982) - Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape : regulation by temperature and light intensity. Phytochem., 21, 41-45.
- TREMOLIERES A., DUBACQ J.P., MULLER M., DRAPIER D. et MAZLIAK P. (1979) - Oleyl CoA and linoleyl CoA desaturase activities and α linolenic acid biosynthesis in subcellular fractions from young pea leaves. Advances in Biochem. Physiol. plant lipids. ed. APPELQVIST L.A., 437-442.
- TREMOLIERES A. et LEPAGE M. (1971) - Changes in lipid composition during greening of etiolated pea seedlings. Plant Physiol., 47, 329-334.
- TREMOLIERES A. et MAZLIAK P. (1970) - Formation de lipides au cours du développement de la feuille de Trèfle (Trifolium repens L.). Physiol. Vég., 8, 135-150.
- TREMOLIERES A. et MAZLIAK P. (1974) - Biosynthetic pathway of α linolenic acid in developing pea leaves : in vivo ou in vitro study. Plant Sci. Letters, 2, 193-201.
- TRIKI S. (1981) - Evolution des lipides de la graine de Tournesol (Helianthus annuus L.) au cours de la maturation. Thèse de Doctorat de Spécialité. Faculté de Tunis, 102p.
- VAN BESOW A., WINTERMANS J.F.G.M. (1978) - Galactolipid formation in chloroplast envelopes. I Evidence for two mechanisms in galactosylation. Biochim. Biophys. Acta, 529, 44-53.

- VIJAY I.K. et STUMPF P.K. (1971) - Fat metabolism in higher plants. XLVI Nature of the substrate and the product of oleyl coenzyme A desaturase from Carthamus tinctorius. J. Biol. Chem., 246, 2910-2917.
- WANNER G., FORMANECK H. et THEIMER R.R. (1981) - The ontogeny of lipid bodies (Spherosomes) in plant cells. Ultrastructural evidences. Planta, 151, 109-123.
- WEAIRE P.J. et KEKWICK R.G.D. (1975) - The synthesis of fatty acids in avocado mesocarp and cauliflower bud tissue. Biochem. J., 146, 425-437.
- WILLIAMS J.P. (1980) - Galactolipid synthesis in Vicia faba. V Redistribution of ¹⁴C labelling in the polar moieties and molecular species of mono and di galactosyldiacylglycerols. Biochim. Biophys. Acta, 618, 461-472.
- WILLIAMS J.P., SIMPSON E.E., CHAPMAN D.J. (1979) - Galactolipid synthesis in Vicia faba leaves. III Sites of galactosyl transferase activity. Plant Physiol., 63, 669-673.
- WILLIAMS J.P., WATSON G.R. et LEUNG S.P. (1976) - Galactolipid synthesis in Vicia faba leaves. II Formation and desaturation of long chain fatty acids in phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and the galactolipids. Plant Physiol., 57, 179-184.
- WRIGHT R.S. (1971) - Reagent for a non destructive location of steroids and some lipophilic materials on silica gel thin layer chromatography. J. Chromatogr., 59, 220-221.
- YAMADA M. et OHNISHI J.I. (1982) - Glycerolipid synthesis in avena leaves during greening of etiolated seedlings. III Synthesis of α linolenoyl monogalactosyl diacylglycerol from liposomal linoleoyl phosphatidylcholine by avena plastids in the presence of phosphatidylcholine exchange protein. Plant cell. Physiol., 23, 767-773.