

ETUDE COMPAREE DES LIPIDES ET DE LA FIXATION PASSIVE DU CALCIUM DANS LES RACINES ET LES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU *LUPINUS LUTEUS* ET DE LA *VICIA FABA*

ANNETTE OURSEL, ANDRÉ LAMANT, LOUIS SALSAC et PAUL MAZLIAK

Laboratoire de Physiologie cellulaire, 12, rue Cuvier, Université de Paris VI, France
et Laboratoire de Physiologie végétale 2 place Jussieu, Université de Paris VII, France

(Revisée reçu le 29 janvier 1973 Accepté le 22 février 1973)

Key Word Index—*Lupinus luteus*, *Vicia faba*, Leguminosae, lipids, phospholipids, calcium fixation

Abstract—In both lupin and broad bean, the root lipids contain paraffins, triglycerides, diglycerides, free fatty acids and polar lipids (phospholipids and galactolipids). The polar lipids and the triglycerides are the more abundant classes. The root galactolipids are mono- and di-galactosyldiglycerides, two steryl glycosides are also present. The phospholipids in both species are phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, diphosphatidylglycerol and phosphatidic acid. This last phospholipid represents 8.3% of total lipid phosphorus in *Lupinus* against 2.3% in *Vicia*. The other acidic phospholipids represent 30.4% in *Lupinus* against 20.9% in *Vicia*. The lipids of *Lupinus* are rich in linolenic acid whereas those found in *Vicia* are richer in linoleic acid. The various subcellular fractions prepared from the roots of both species have an homogeneous lipid composition, reflecting exactly that of entire cells. The calcium passive fixation capacity in microsomes and mitochondria of *Lupinus* roots is more important than that in the same organelles of *Vicia faba* roots. Thus a relationship is suggested between the amount of phospholipids in membranes and the passive fixation of calcium.

Résumé—Dans les deux espèces analysées, les lipides racinaires comportent des paraffines, des triglycérides, des diglycérides, des acides gras libres et des lipides polaires (phospholipides et galactolipides). Les lipides polaires et les triglycérides sont les catégories majoritaires. Les galactolipides racinaires sont les mono- et di-galactosyldiglycérides, on y a trouvé en outre deux stérylglycosides. Les phospholipides dans les deux espèces sont phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, diphosphatidylglycérol et acide phosphatidique. L'acide phosphatidique renferme 8,3% du phosphore lipidique dans le Lupin contre, 2,3% dans la Féverole. Les autres phospholipides acides représentent 30,4% dans le Lupin contre 20,9% dans la Féverole. Toutes les catégories lipidiques des racines de Lupin sont riches en acide linoléique, celles des racines de Féverole sont plus riches en acide linoléique. Les différentes fractions subcellulaires préparées à partir des racines des deux espèces ont une composition lipidique homogène, reflétant de près la composition des cellules entières. La capacité de fixation passive du calcium des microsomes et surtout des mitochondries de racines de Lupin est supérieure à celle des mêmes organites de racines de Féverole. Une relation est ainsi suggérée entre l'abondance des phospholipides acides dans les membranes et la capacité de fixation passive du calcium.

INTRODUCTION

LE LUPIN et la Féverole sont deux légumineuses fourragères qui se distinguent essentiellement par leur capacité d'absorption de certains ions minéraux, le calcium en particulier. Le Lupin jaune (*Lupinus luteus* L. var Weiko III) est une plante calcifuge, ne poussant pas naturellement sur terrains calcaires. Au contraire la Féverole (*Vicia faba* var Minor) est une plante calcicole, se développant naturellement sur terrain riche en carbonate de calcium¹.

Une hypothèse de travail peut être formulée à propos des capacités d'absorption différentes du calcium présentées par les racines de Lupin ou de Féverole: les membranes des

¹ SALSAC, L. (1970) Thèse de Doctorat d'Etat, Paris

cellules racinaires de ces deux plantes seraient différemment affines ou perméables vis à vis de l'ion calcium. Parmi les théories actuelles² sur le transport des ions à travers les membranes cellulaires, un certain nombre font jouer un rôle déterminant aux phospholipides membranaires. Ces lipides pourraient former des complexes intermédiaires avec les ions au cours de leur pénétration dans les cellules. Quelques travaux récents sont venus renforcer cette hypothèse. Rogeness et Abood³ démontrent que le calcium forme, avec des monocouches d'acide stéarique des composés de coordination qui augmentent la viscosité de surface de ces couches en éliminant les molécules d'eau. Grâce à l'utilisation de films monomoléculaires de phospholipides purifiés, Rojas et Tobias,⁴ étudient l'association de cations avec les groupements polaires de ces phospholipides. Dans certaines conditions précises de pH et de pK du milieu, la phosphatidyléthanolamine et surtout la phosphatidylsérine ont une capacité maximale d'absorption du calcium : cette capacité est nulle pour des monocouches de phosphatidylcholine non chargées négativement dans les conditions envisagées. Des expériences comparables de Shah et Schulman⁵ montrent que la liaison du calcium avec des monocouches de phospholipides varie selon le degré d'insaturation des acides gras constitutifs de ces phospholipides. Scarpa et Azzone⁶ évoquent un double aspect du rôle des phospholipides dans les membranes mitochondriales, ceux-ci intervenant dans la diffusion et la liaison des ions. Une perte de phospholipides entraîne une diminution des propriétés de semiperméabilité de la membrane mitochondriale et de sa capacité de liaison du calcium, propriétés restaurées quand la quantité de phospholipides présents est redevenue normale. Ils constatent que la phosphatidyléthanolamine est plus efficace que les autres phospholipides pour restaurer ces caractéristiques. Reynafarje et Lehninger⁷ considèrent que les deux composants majeurs de la membrane mitochondriale : protéines et phospholipides sont les espèces moléculaires auxquelles le calcium se lie par un processus de basse affinité. Signalons enfin que, très récemment, Cotmore, Nichols et Wuthier⁸ montrant qu'en présence de phospholipides acides le phosphore inorganique (Pi) augmente beaucoup la migration d'ions Ca^{2+} d'une phase aqueuse vers une phase organique en formant un complexe composé de quantités stoechiométriques de Ca^{2+} , Pi et phospholipides. Ils constatent, en outre, qu'en l'absence de lipides mais en présence de phosphore inorganique, le calcium s'accumule légèrement à l'interface des deux phases mais ne pénètre pas dans la phase organique.

Toutes ces études convergent donc pour faire jouer aux phospholipides membranaires un rôle déterminant dans le transport et la fixation des ions minéraux par les cellules. Il nous est donc apparu nécessaire, dans une première étape, de connaître exactement la composition lipidique de deux plantes qui ont un comportement différent dans l'absorption du calcium et c'est l'objet du présent article. Une étape ultérieure consistera à essayer de localiser les sites intracellulaires préférentiels de fixation du calcium. Nous avons déjà cependant, dans un premier temps analysé les lipides de différentes fractions subcellulaires des racines de Lupin et de Féverole. Nous avons, en outre suivi *in vitro*, sur ces fractions, la fixation non métabolique du calcium pour tenter de dégager une première relation entre la composition lipidique des membranes et la fixation passive du calcium par les racines.

² HOKIN, L. E. et HOKIN, M. R. (1963) *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 553.

³ ROGENESS, G. et ABOOD, L. G. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 483.

⁴ ROJAS, E. et TOBIAS, J. M. (1965) *Biochem. Biophys. Acta* **94**, 394.

⁵ SHAH, D. O. et SCHULMAN, J. H. (1965) *J. Lipid Res.* **6**, 341.

⁶ SCARPA, A. et AZZONE, G. F. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 78.

⁷ REYNAFARJE, B. et LEHNINGER, A. L. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 584.

⁸ COTMORE, J. M., NICHOLS, J. M. et WUTHIER, R. E. (1971) *Science* **172**, 1339.

RESULTATS

Séparation Préliminaire des Lipides Bruts en Catégories Moléculaires

Les lipides totaux extraits des racines sont divisés en classes par chromatographie sur couche mince de silice. Les lipides bruts des racines de Féverole ou de Lupin se séparent ainsi en 7 spots. En nous référant à la migration de substances témoins et aux R_f publiés par Mangold,⁹ nous pouvons distinguer de façon préliminaire les catégories lipidiques suivantes : paraffines, triglycérides, diglycérides, acides gras libres et lipides polaires (phospholipides et galactolipides). Un spot supplémentaire pouvant correspondre à des stérols est parfois important dans les racines de Féverole, et peut éventuellement masquer celui des diglycérides. Une analyse identique a été réalisée sur les extraits lipidiques des fractions subcellulaires préparées à partir des deux variétés étudiées. Nous ne constatons cette fois non plus aucune différence quant au nombre et à la qualité des lipides présents dans les organites cellulaires des racines de Lupin ou de Féverole. Nous retrouvons les constituants principaux repérés dans les racines entières : lipides polaires, stérols, diglycérides, triglycérides, paraffines.

TABLEAU 1 REPARTITION QUANTITATIVE DES DIVERSES CATEGORIES LIPIDIQUES DANS LES RACINES ENTIERES, LES MITOCHONDRIES ET LES MICROSOMES DE RACINES DE LUPIN ET DE FEVEROLE

Catégories	% des lipides totaux					
	Lupin			Féverole		
	Racines entières	Mitochondries	Microsomes	Racines entières	Mitochondries	Microsomes
Phospholipides	67,5	72,5	71,5	80,6	83,4	82,3
Lipides neutres	21,0	27,5	12,3	10,8	16,6	11,1
Monogalactosyl-diglycérine	6,8	Traces	8,2	5,7	Traces	3,2
Digalactosyl-diglycérine	4,7	Traces	8,0	2,9	Traces	3,4

Un autre type de développement a été utilisé pour mettre en évidence spécialement les galactolipides. Dans le cas des racines entières, l'extrait lipidique se sépare en huit spots pour la Féverole et en sept pour le Lupin. Nous pouvons identifier préliminairement par leur R_f , et en se rapportant aux données publiées par Gardner,¹⁰ la nature de ces spots : phospholipides, digalactosyldiglycérine, monogalactosyldiglycérine, deux stérylglycosides, lipides neutres et pigments. Aucune différence majeure n'est apparue entre les différentes fractions subcellulaires, si ce n'est une intensité plus faible des différents spots observés, notamment des galactolipides dans les noyaux et les mitochondries. Un dosage des différentes catégories lipidiques à partir du poids de leurs esters méthyliques respectifs (Tableau 1) montre que les phospholipides correspondent à la catégorie lipidique majeure dans les deux tissus (67,5% des lipides totaux du Lupin, 80,6% dans la Féverole). Les lipides neutres sont plus abondants dans les racines de Lupin (21% du total contre 10,8% pour la Féverole). Les galactolipides sont présents en faible quantité dans les deux espèces. Nous constatons également

⁹ MANGOLD, H. K. (1961) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **38**, 708.

¹⁰ GARDNER, H. W. (1968) *J. Lipid Res.* **9**, 139.

que les proportions des différentes catégories lipidiques sont comparables dans les fractions mitochondriales et microsomales isolées par rapport aux résultats obtenus avec les racines entières

Les résultats qualitatifs précédents sont confirmés par des chromatographies d'extraits lipidiques bruts de fragments de racines ayant métabolisé pendant 16 hr du $[1-^{14}\text{C}]$ acétate. L'acétate marqué est incorporé dans les divers acides gras et les restes glycérol ou stérol des divers lipides. Les autoradiogrammes, réalisés avec des extraits lipidiques marqués provenant de racines entières ou de fractions subcellulaires montrent toutes les fractions précédemment repérées à l'exception des paraffines. On sait que le métabolisme de ce type de constituant peut être très lent dans certains organes ¹¹

Analyse Spéciale des Phospholipides

Trois méthodes chromatographiques ont été utilisées pour analyser les phospholipides. Dans le cas des racines de Lupin, la présence d'une quantité importante de lipides neutres nous a parfois conduit à éliminer ceux-ci de l'extrait lipidique total par un fractionnement préalable sur acide silicique selon la technique de Tang et Castelfranco ¹²

Une première analyse est réalisée par chromatographie unidimensionnelle sur couche mince de silice selon la méthode de Lepage ^{13,14}. Nous avons pu ainsi identifier dans les racines ou fractions cellulaires analysées, les phospholipides suivants : phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine, des glycolipides : digalactosyldiglycérade, et monogalactosyldiglycérade et un spot de lipides neutres. Aucune différence essentielle n'apparaît quant au nombre ou à la qualité des spots entre les deux variétés de racines étudiées.

La chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silice (CHCl_3 - MeOH - H_2O , 65/25/4, et Me_2CO - HOAc - H_2O , 100/2/1) confirme les résultats obtenus ci-dessus. Cette deuxième méthode a l'avantage de séparer plus nettement les spots les uns des autres et nous avons pu ainsi mieux repérer et identifier les galactolipides présents dans l'extrait lipidique total. Une autre analyse des phospholipides est effectuée par chromatographie ascendante sur papier silicé selon la méthode de Marinetti ¹⁵. Cette méthode nous permet de séparer et de retrouver tous les lipides polaires, notamment les phospholipides, repérés lors des chromatographies sur couche mince de silice. De plus, parmi les phospholipides acides, le diphosphatidylglycérol (DPG) se sépare dans ce système de l'acide phosphatidique. Nous pouvons insister ici sur la présence constante d'un spot migrant au niveau de l'acide phosphatidique et qui paraît assez dense dans le cas des racines de Lupin. Des autoradiographies des chromatogrammes de phospholipides extraits de racines ayant métabolisé du $[1-^{14}\text{C}]$ acétate permettent de confirmer ces résultats. Nous constatons que tous les spots de phospholipides sont marqués ainsi que les lipides neutres, aussi bien dans le cas de racines entières que de fractions subcellulaires. La répartition de la radioactivité entre les spots est un peu différente entre les deux types de racines et ceci peut indiquer un métabolisme lipidique différent dans les deux plantes.

Une troisième série d'analyse des glycérophospholipides des racines étudiées est effectuée en préparant les produits de désacylation des phospholipides selon la méthode de Benson et Maruo, ¹⁶ par hydrolyse alcaline ménagée des liaisons esters entre glycérol et acides gras.

¹¹ MAZLIAK, P. (1968) *Prog. Phytochem.* 1, 49.

¹² TANG, W. J. et CASTELFRANCO, P. A. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1232.

¹³ LEPAGE, M. (1964) *J. Chromatog.* 13, 99.

¹⁴ LEPAGE, M. (1967) *Lipids* 2, 244.

¹⁵ MARINETTI, G. V. (1965) *J. Lipid Res.* 6, 315.

Pour faciliter la détection, les phospholipides des racines ont été au préalable marqués par le ^{32}P . Les produits d'hydrolyse des principaux phospholipides sont chromatographiés sur papier (méthode bidimensionnelle) selon les indications de Douce ¹⁷. Les produits de désacylation identifiés d'après leur R_f dans les deux systèmes chromatographiques utilisés (Tableau 2) correspondent bien aux phospholipides directement séparés par les chromatographies sur papier silicé ou sur couche mince de silice. Aucune différence qualitative majeure n'apparaît ainsi entre les racines entières de Lupin et de Féverole.

TABLEAU 2 ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE-2-D SUR PAPIER DES PRODUITS DE DESACYLATION DES PHOSPHOLIPIDES DES RACINES DE LUPIN OU DE FEVEROLE

Produits de désacylation	R_f (1ère migration)		R_f (2ème migration)	
	Racines	Témoins ¹⁷	Racines	Témoins ¹⁷
Glycérylphosphorylcholine	0,87	0,88	0,63	0,65
Glycérylphosphoryléthanolamine	0,54	0,57	0,31	0,32
Glycérylphosphorylglycérol	0,33	0,37	0,55	0,58
Glycérylphosphorylsérine	0,15	0,16	0,31	0,32
Glycérylphosphorylinositol	0,08	0,08	0,17	0,18
Diglycérylphosphorylglycérol	0,11	0,12	0,52	0,55
Glycérophosphate	0,22	—	0,63	—

1er solvant $\text{PhOH}-\text{H}_2\text{O}$ (100/38), 2ème solvant $\text{MeOH}-\text{HCO}_2\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ (80/13/7)

Les quantités des différents phospholipides sont mesurées par dosage colorimétrique du phosphore présent dans les différents spots d'un chromatogramme obtenu sur papier silicé. Les résultats moyens de plusieurs analyses sont présentés dans le Tableau 3. Pour les deux espèces étudiées, les phospholipides majeurs sont la phosphatidyléthanolamine (respectivement 24 et 28,9%) et la phosphatidylcholine (37,5 et 47,35%). Un spot migrant au niveau de l'acide phosphatidique représente 8,49% des phospholipides totaux du Lupin contre seulement 2,30% pour la Féverole. Les autres phospholipides acides forment ensemble 30,35% des phospholipides totaux du Lupin et 20,95% des phospholipides totaux de la Féverole. La composition en phospholipides des organites subcellulaires reflète assez fidèlement celle du tissu entier. Les proportions relatives de phospholipides acides et neutres en particulier, restent dans des rapports identiques dans le tissu entier et dans les fractions subcellulaires de racines.

La mesure de l'activité apparente de la phospholipase-D dans les tissus nous a semblé indispensable (à titre de contrôle) en raison de l'importance relative de l'acide phosphatidique dans les racines de Lupin. On peut en effet suspecter une libération artificielle de ce phospholipide au cours de l'extraction, sous l'effet des phospholipases-D endogènes, ¹⁸ dans les racines de Lupin. Nous avons donc procédé au dosage de l'activité phospholipasique-D dans les deux racines, suivant la technique récemment mise au point par Clermont ¹⁹. Contrairement à ce à quoi nous pouvions nous attendre, nous avons trouvé une activité

¹⁶ BENSON, A. A. et MARUO, B. (1958) *Biochim Biophys Acta* 27, 189.

¹⁷ DOUCE, R. (1964) *Compt Rend* 259, 3066.

¹⁸ VAN DEENEN, L. L. M. et DE HAAS, G. H. (1966) *Ann Rev Biochem* 35, 157.

¹⁹ CLERMONT, H. (1971) *Physiol Vég* 10, 153.

phospholipasique apparente beaucoup plus élevée dans les racines de Féverole que dans les racines de Lupin. Une mauvaise extraction des lipides aurait donc beaucoup plus de chance de produire de l'acide phosphatidique chez la Féverole que chez le Lupin, et nos résultats de dosage ne peuvent donc pas être mis au compte d'un artefact. Nous avons pris cependant la précaution, pour les deux types de racines d'ébouillanter le matériel frais pendant 5-10 min avant d'en extraire les lipides bruts. Nous supprimons ainsi toute possibilité d'action des différentes lipases contenues dans ces racines.

TABLEAU 3 COMPOSITION EN PHOSPHOLIPIDES DES RACINES ENTIÈRES ET DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE RACINES DE LUPIN ET DE FEVEROLE

Catégories	% du phosphore lipidique total					
	Racines de Lupin			Racines de Féverole		
	Racines entières	Mitochondries	Microsomes	Racines entières	Mitochondries	Microsomes
PI	8,25 ± 2,6	12,72	14,10	9,60 ± 2,4	13,18	10,35
PG + PS	15,35 ± 3,39	12,88	9,53	7,15 ± 3,7	15,09	13,55
PE	24 ± 3	23,68	28,21	28,9 ± 7,1	20,30	26,62
DPG	6,12 ± 0,8	8,95	7,46	4,18 ± 1,7	3,20	5,27
PA	8,49 ± 3,27	8,95	5,80	2,30 ± 2	1	2,13
PC	37,46 ± 3,68	32,82	34,90	47,4 ± 7,2	47,23	42,08

Abbreviations PI—phosphatidylinositol, PG—phosphatidylglycérol, PS—phosphatidylsérine, PE—phosphatidyléthanolamine, DPG—diphosphatidylglycérol, PA—acide phosphatidique, PC—phosphatidylcholine (Résultats moyens de dix analyses pour les tissus entiers)

Analyse et Dosage des Acides Gras

Une partie aliquote des lipides totaux des racines entières et des fractions subcellulaires ou bien les catégories lipidiques particulières préalablement séparées sur couche mince sont saponifiées et les esters méthyliques des acides gras sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats obtenus sont portés dans les Tableaux 4 et 5.

TABLEAU 4 PRINCIPAUX ACIDES GRAS IDENTIFIÉS PAR GLC DANS LES LIPIDES TOTAUX DE FRACTIONS SUBCELLULAIRES DE RACINES DE LUPIN ET DE FEVEROLE

Acides identifiés	% des acides gras totaux					
	Lupin			Féverole		
	Noyaux	Mitochondries	Microsomes	Noyaux	Mitochondries	Microsomes
C ₁₂	2,5	3,4	1,8	5,2	3,7	2,3
C ₁₃	2,6	2,2	1,8	3,7	3,9	3,4
C ₁₄	5,1	3,2	2,5	4,3	3,0	3,2
C _{14 1}	—	—	—	—	—	3,4
C ₁₅	—	—	—	—	—	4,1
C ₁₆	21,7	21,1	27,4	19,5	20,3	19,5
C _{16 1}	3,8	2,0	Traces	2,8	1,3	Traces
C ₁₇	—	1,9	2,8	—	—	—
C ₁₈	5,4	6,0	5,0	7,1	5,7	5,9
C _{18 1}	10,2	5,6	2,7	6,5	4,1	2,0
C _{18 2}	4,9	9,7	6,4	39,9	50,4	49,5
C _{18 3}	43,7	44,7	49,5	10,9	7,4	4,4

Les principaux acides gras identifiés dans les racines sont communs aux deux variétés étudiées. Constatons cependant que l'acide gras majeur est l'acide linoléique (49,4%) pour la Féverole et l'acide linolénique (52,4%) pour le Lupin. Les autres acides gras dominants dans les deux racines sont l'acide palmitique (17,3 et 22,2% dans la Féverole et le Lupin, respectivement) et l'acide stéarique (4,3 et 5,6%). Nous pouvons également remarquer qu'il existe une quantité d'acides gras à chaîne courte ($< C_{16}$) plus grande dans les racines de Féverole (19,40%) que dans les racines de Lupin (4,84%).

TABLEAU 5 PRINCIPAUX ACIDES GRAS DANS LES LIPIDES TOTAUX, LES PHOSPHOLIPIDES, LES LIPIDES NEUTRES, LE MONOGALACTOSYLDIGLYCERIDE (MGDG) ET LE DIGALACTOSYLDIGLYCERIDE (DGDG) DE RACINES ENTIÈRES DE LUPIN ET DE FEVEROLE

Acides identifiés	% des acides gras totaux									
	Lupin					Féverole				
	Lipides totaux	Phospho-lipides	Lipides neutres	MGDG	DGDG	Lipides totaux	Phospho-lipides	Lipides neutres	MGDG	DGDG
C ₁₂	1,6	1,4	5,0	2,4	2,7	5,6	—	2,2	2,7	6,3
C ₁₁	1,4	—	4,5	—	—	4,7	—	—	—	—
C ₁₃	1,8	1,4	4,3	0,9	3,3	6,5	—	1,9	—	—
C ₁₄ 1	Traces	—	4,0	—	—	1,2	—	—	—	—
C ₁₅	Traces	—	—	0,9	—	1,3	—	—	2,1	—
C ₁₆	22,2	27,7	25,3	28,0	31,3	17,3	17,9	15,2	22,0	17,8
C ₁₆ 1	—	2,9	5,4	3,7	4,2	—	—	2,2	1,3	1,3
C ₁₈	5,6	3,8	5,6	7,3	6,6	4,3	4,6	3,6	3,9	3,9
C ₁₈ 1	3,5	6,7	11,2	23,1	17,6	1,3	2,7	5,4	4,3	6,0
C ₁₈ 2	6,4	7,1	4,1	27,8	14,5	49,4	63,2	48,3	38,7	37,7
C ₁₈ 3	52,4	48,1	30,4	5,5	19,8	7,0	5,5	5,3	24,3	27,5
C ₂₀	Traces	—	—	—	—	—	3,5	3,6	—	—

L'examen des résultats d'analyse des acides gras des différentes catégories lipidiques amène les remarques suivantes. Les catégories lipidiques de la Féverole ont une composition en acides gras très voisine de celle des lipides totaux avec cependant des pourcentages en acide linolénique (24,3 et 26,4%) plus importants pour les galactolipides. Dans le cas du Lupin par contre, seuls les phospholipides et les lipides neutres ont une composition en acides gras qui reflète celle des lipides totaux. Il est curieux de constater que dans la racine de Lupin les galactolipides sont relativement plus pauvres en acide linolénique que les autres catégories lipidiques.

Les fractions subcellulaires des deux racines étudiées présentent des compositions globales en acides gras très semblables à celles observées dans le tissu entier (Tableau 5). Les fractions subcellulaires de Lupin présentent donc l'acide linolénique comme acide majeur, les fractions de Féverole ont de leur côté l'acide linoléique comme acide majeur.

Fixation Passive in vitro du Calcium sur les Mitochondries et les Microsomes des Deux Racines

Les différences de composition lipidique observées entre les deux types de plantes nous ont amenés à suivre la fixation passive du calcium sur deux fractions subcellulaires de racines : mitochondries et microsomes.

Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau 6 et sur les graphiques de la Fig. 1. Nous constatons que les teneurs initiales des organites en calcium sont tout à fait comparables dans les deux espèces. La capacité de fixation du calcium sur les microsomes des racines des deux plantes est du même ordre de grandeur (environ 1 μ eq/mg de protéine). Par contre le comportement des mitochondries vis à vis de ce cation est nettement différent, en effet, les mitochondries du Lupin en fixent deux fois plus. Si l'on étudie le rapport quantité maximale de Ca fixé/quantité initiale de Ca, on remarque alors des différences très

sensibles entre les deux espèces, ce rapport est deux fois plus important pour les fractions subcellulaires du Lupin comparées à celles de la Féverole. De même, si l'on ramène la quantité de calcium fixé au μg de lipides membranaires, on observe une valeur trois fois plus élevée du rapport (6,2 et 20) pour les mitochondries de Lupin, la différence étant plus faible dans les microsomes (11,8 Féverole, 17 Lupin).

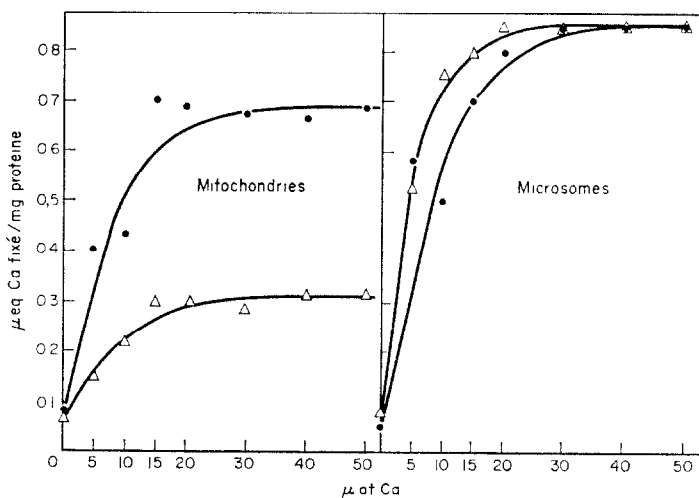


FIG 1 FIXATION PASSIVE DU CALCIUM, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU CATION DANS LE MILIEU, SUR LES MITOCHONDRIES ET LES MICROSOMES DE RACINES DE LUPIN (●) ET DE FEVEROLE (△)

TABLEAU 6 FIXATION PASSIVE DU CALCIUM SUR LES MITOCHONDRIES ET LES MICROSOMES DE LUPIN ET DE FEVEROLE (CONDITIONS D'INCUBATION DECRITES DANS EXPERIMENTALE)

		Teneur initiale μM Ca/mg protéine	μM Ca fixé/mg protéine (pour 50 μat de Ca dans le milieu)	Quantité max de Ca fixé Quantité initiale de Ca	Ca fixé/lipide (pour 50 μat de Ca) (dans le milieu)
Lupin	Mitochondries	80	680	8,5	20
	Microsomes	50	850	17	17
Féverole	Mitochondries	70	310	4,4	6,2
	Microsomes	80	850	10,6	11,8

DISCUSSION

Les résultats de l'étude analytique des lipides de racines de Lupin et de Féverole permettent-ils d'envisager une explication de leur comportement différent dans l'absorption du calcium ?

La composition en catégories de lipides bruts de ces deux racines est très voisine, notons cependant une quantité supérieure de lipides neutres et de galactolipides dans le Lupin par rapport à ce qu'on trouve dans la Féverole. Le dosage des phospholipides, composants majeurs des lipides bruts dans les deux plantes étudiées révèle quelques différences, la plus importante, est la présence dans les racines de Lupin d'un phospholipide migrant au niveau de l'acide phosphatidique et représentant 8,3% des phospholipides totaux (contre 2,3% seulement dans la Féverole). La présence de ce phospholipide acide ne peut être expliquée par une activité phospholipasique artificielle plus intense au moment de l'extrac-

tion dans les racines de Lupin puisque le dosage de la phospholipase-D dans les deux plantes montre que l'enzyme est beaucoup plus active dans la Féverole que dans le Lupin. Les phospholipides acides sont plus abondants dans le Lupin (30,4%) que dans la Féverole (20,9%). Dans les deux espèces par ailleurs les phospholipides majeurs sont les mêmes; phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine. Il est intéressant de remarquer que c'est l'espèce calcifuge qui renferme la plus grande quantité de phospholipides acides. Or, d'après les premiers résultats obtenus, la capacité de fixation non métabolique du calcium par les microsomes et surtout les mitochondries de racines de Lupin est beaucoup plus importante qu'elle ne l'est par les mêmes organites de Féverole. D'autre part, des expériences préliminaires semblent indiquer que la proportion de calcium échangeable après fixation est plus faible chez le Lupin que chez la Féverole. Il paraît donc intéressant de signaler le parallélisme entre le caractère calcifuge, la richesse en phospholipides acides et la plus grande capacité de fixation passive du calcium des racines de Lupin jaune. Par ailleurs les lipides du Lupin présentent très nettement un taux d'insaturation plus grand que ceux de la Féverole. Le degré d'insaturation plus grand des lipides de Lupin, comparés à ceux de la Féverole, favoriserait la fixation du calcium au niveau des membranes cellulaires, d'après les travaux de Shah et Schulman⁵.

Afin de confirmer ces premières données, une étude similaire sera entreprise au niveau du plasmalemme des racines des deux espèces. Cette membrane joue très vraisemblablement un rôle majeur dans la fixation du calcium. L'isolement de cette nouvelle fraction cellulaire vient d'être récemment mis au point par l'un d'entre nous²⁰.

EXPERIMENTALE

Matériel biologique. Notre étude a porté essentiellement sur deux Légumineuses fourragères: le Lupin jaune (*Lupinus luteus* L.) espèce calcifuge (sélection commerciale allemande Weiko III) et la Féverole (*Vicia faba* L., var. Minor), calcicole (Féverole de printemps 'Lorraine').

Conditions de germination et de développement. Les graines après avoir été désinfectées par une solution d'hypochlorite de calcium à 30 g/l pendant 1,5 hr sont mises à germer dans un bac en plastique contenant une faible quantité d'H₂O. Les graines sont recouvertes d'une feuille de papier filtre, imbibée d'eau renouvelée chaque jour, et placées dans une enceinte maintenue à 28–30°. Au bout de 3 à 4 jours, les graines germées sont repiquées sur des plaques en plastique perforées posées sur des bacs contenant de l'H₂O désionisée à laquelle on ajoute 100 ml d'une solution nutritive contenant les composés suivants (NO₃)₂ Ca, 0,1 mM, PO₄H₂K, 0,1 mM–MgSO₄, 0,1 mM. Le liquide de culture est constamment aéré et remplacé toutes les 24 hr. La température de l'enceinte de germination est maintenue à 25–29°. Germination et croissance des jeunes plantules se font à l'obscurité.

Extraction et analyse des lipides totaux. Cette extraction est faite selon la technique de Folch²¹ modifiée par Bligh et Dyer²². La séparation des lipides bruts en diverses catégories moléculaires est effectuée par chromatographie sur couche mince de silice, soit selon Mangold⁹ pour l'étude détaillée des lipides neutres, soit selon Gardner¹⁰ pour l'étude plus détaillée des glycolipides. Les phospholipides ont été séparés de l'extrait total par adsorption sur acide silicique (technique de Tang et Castelfranco¹³). Les séparations chromatographiques ultérieures sont faites: 1° sur couche mince de silice (techniques de Lepage^{13,14} ou Gardner¹⁰); 2° sur papier silicé (technique de Marinetti¹⁵). Le phosphore lipidique a été dosé colorimétriquement selon la méthode de Shibuya, Honda et Maruo²³. Les produits de désacylation ont été analysés par chromatographie bidimensionnelle sur papier selon la technique de Douce¹⁷.

Technique de fixation passive in vitro du calcium sur les mitochondries et les microsomes. Les fractions isolées sont remises en suspension dans l'eau distillée et les protéines dosées par la méthode du Biuret²⁴. Le milieu d'incubation²⁵ contient la solution de CaCl₂, 0,6 ml de tampon Tris-HCl (pH = 7,2), la suspension d'organites, le milieu est ajusté à 2 ml avec de l'H₂O distillée. Les incubations, en fonction des concentrations de CaCl₂, sont réalisées sur 1 mg de protéines entre 3 et 5° et constamment agitées pendant 15 min.

²⁰ LAMANT, A. et ROLAND, J. C. (1972) *Compt. Rend.* **274**, 3391.

²¹ FOLCH, J., LEES, M. et LOANE STANLEY, G. H. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 497.

²² BLIGH, E. G. et DYER, W. J. (1959) *J. Biochem. Physiol.* **37**, 911.

²³ SHIBUYA, I., HONDA, H. et MARUO, B. (1967) *Agr. Biol. Chem.* **31**, 111.

²⁴ GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. L. et DAVID, M. N. (1949) *J. Biol. Chem.* **177**, 751.

²⁵ ROSSI, C. S., AZZI, A. et AZZONE, G. F. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 951.

Après fixation, le milieu d'incubation est centrifugé (10 000 *g*, 15 min pour les mitochondries, 100 000 *g*, 60 min pour les microsomes). Les culots sont lavés plusieurs fois à l'H₂O distillée. L'extraction du calcium fixe est réalisée avec 1 ml de HNO₃ N/10, à 80°. Après addition d'un correcteur d'interférence (La³⁺), le calcium est dosé par photométrie d'absorption atomique (Photomètre Hilger et Watt).

Analyse des acides gras. Les acides gras sont obtenus par saponification rapide puis méthylation en présence de BF₃ de l'extrait lipidique total ou de diverses catégories moléculaires lipidiques, selon le procédé de Metcalfe *et al.*²⁶ modifié par Lechevallier.²⁷ Les esters méthyliques sont séparés et identifiés par GLC. Afin de doser les acides gras on ajoute aux esters méthyliques repris dans un volume donné de pentane une certaine quantité d'un témoin interne, l'heptadecanoate de méthyle. L'analyse des acides gras a été effectuée avec deux types d'appareils : Chromagaz C G 2 (Profit), muni d'un détecteur à ionisation de flamme et Varian Aerograph 1 400. Les esters sont séparés dans deux systèmes complémentaires. L'un comporte une phase stationnaire polaire : Butane-diolsuccinate (BDS), 20% sur Chromosorb W hexaméthylsilanisé, 60–80 mesh, le débit d'azote est de 3 l/hr (la température du four est de 185°) ; la longueur de la colonne 3 m. L'autre système comprend une phase stationnaire apolaire : le silicone 710 imprégné à 10% sur le Chromosorb W—le débit de l'azote, gaz vecteur, est de 3 l/hr, la température du four est 275°. L'identification des acides gras se fait en appliquant la loi de James et Martin.²⁸

Préparation des fractions subcellulaires. Les fractions subcellulaires des deux types de racines sont préparées par centrifugation différentielle selon la technique de Wiskich et Bonner²⁹ légèrement modifiée par Mazliak.³⁰ Les racines sont infiltrées 10 mn, à +1° environ dans un milieu tamponné Tris-HCl, pH 7,2 contenant du mannitol (0,3 M), de l'EDTA (1 mM), du BSA (0,1%), du MgCl₂ (1 mM) et de la cystéine (0,05%). Après avoir passé les racines au broyeur de Jones et Hulme,³¹ on recueille le mélange suc cellulaire + milieu de broyage sur 3 épaisseurs de gaze. Le mélange est homogénéisé dans un Potter par un piston en teflon puis centrifugé à vitesses croissantes pour obtenir successivement les culots de noyaux (accélération 1500 *g* × 10 min), mitochondries (15 000 *g* × 10 min), microsomes (100 000 *g* × 60 min) et le surnageant final.

Technique de mise en incubation dans l'acétate-1-¹⁴C. Les racines sont séparées des plantules et découpées en tronçons de 1 cm environ. Ces fragments sont incubés dans une fiole pendant 16 hr. Le milieu d'incubation est constitué d'eau désionisée à laquelle on ajoute le précurseur (ici l'1-¹⁴C-acétate) à raison de 2 μ Ci/ml de milieu. Au bout de 16 hr, les lipides totaux sont extraits des racines selon les techniques exposées précédemment. La radioactivité totale des lipides est déterminée par comptage direct en scintillation liquide d'une partie aliquote (mélange scintillant PPO 0,5% diméthyl POPOP 0,03% dans le toluène).

Remerciements.—Les auteurs expriment leurs vifs remerciements à Melle Clermont et M. Douce qui les ont guidés pour étudier les produits de désacylation et l'activité de la phospholipase-D ainsi qu'à MM Dupont et de Virville pour leur excellente collaboration technique.

²⁶ METCALFE, L. D., SCHMITZ, A. A. et PELKA, J. R. (1966) *Anal. Chem.* **38**, 514.

²⁷ LECHEVALLIER, D. (1966) *Compt. Rend.* **263**, 1849.

²⁸ JAMES, A. T. et MARTIN, A. J. P. (1952) *J. Biochem.* **50**, 679.

²⁹ WISKICH, J. T. et BONNER, W. D. (1963) *Plant Physiol.* **38**, 594.

³⁰ MAZLIAK, P. (1968) *Compt. Rend.* **267**, 1720.

³¹ JONES, J. D. et HULME, A. C. (1961) *Nature* **191**, 370.