

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Anticorps monoclonaux dirigés contre l'appareil de Golgi

De Becker, Sophie

Award date:
1987

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

1987



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ANTICORPS MONOCLONAUX

DIRIGES CONTRE L'APPAREIL DE GOLGI .

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

SOPHIE DE BECKER .

Au terme de cette année je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur R. Wattiaux qui m'accueillie dans son département de chimie physiologie .

Madame S. Wattiaux-De Coninck qui a suivi ce travail tout au long de l'année avec beaucoup d'intérêt , de disponibilité et de patience .

Le Professeur A. Depelchin qui m'accueillie dans son département d'immunologie .

Le Docteur J-J Letesson pour ces nombreux conseils .

Tous les membres des départements d'immunologie et de chimie physiologie qui m'ont donné leurs conseils et tout particulièrement à monsieur F: Dubois .

Mes parents qui m'ont permis d'entreprendre ces études .

Introduction

I. L'appareil de Golgi

I.1. Introduction

I.2. Données morphologiques

I.3. Données biochimiques

a) Compartimentalisation

Cis Median Trans

b) Les fonctions de l'appareil de Golgi

1. Clivage protéolytique des pro-protéines

2. Glycosylation des glycoprotéines et des protéoglycans

3. Retrait, réutilisation et recyclage des composés de membrane

c) Mode de déplacement des glycoprotéines dans le Golgi

1ère hypothèse

2ème hypothèse

d) Biogenèse et replication de l'appareil de Golgi

e) Les enzymes marqueurs du Golgi

f) La composition de la membrane du Golgi

- les protéines

- les lipides

- les phospholipides

II. Les anticorps monoclonaux

II.1. les anticorps en général

II.2. Les antigènes en général

II.3. Les anticorps monoclonaux

- les anticorps monoclonaux

- fusion et clonage

- principe de la production

II.4. Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'appareil de Golgi

III. But du Travail

IV MATERIEL ET METHODES .

1. Purification de membranes de Golgi .
 - 1.1. Principe .
2. Evaluation de la purification du Golgi .
 - 2.1. Principe .
 - 2.2. Mesure des activités enzymatique et dosages des protéines .
 - 2.2.1. La galactosyl transférase .
 - 2.2.2. Phosphodièstérase alcaline .
 - 2.2.3. 5'AMPase .
 - 2.2.4. La NADPH cyt C réductase .
 - 2.2.5 Les protéines .
3. Purification de lysosomes et de membrane lysosomale de foie de rat .
 - 3.1. Principe .
 - 3.2. Mesure des activités enzymatiques et dosage des protéines .
 - 3.2.1 la phosphatase acide .
 - 3.2.2 La β Galactosidase .
 - 3.2.3 Dipeptidyl peptidase IV .
 - 3.2.4 Les protéines .
- 4 . Purification de membranes plasmiques .
 - 4.1. Principe .
 - 4.2 Evaluation de la purification de la membrane plasmique
5. Immunisation de souris BALB/C par une préparation de Golgi purifiée .
6. Fusion des cellules myélomateuses et des cellules lymphocytaires
 - 6.1 Principe de base
 - 6.2 Méthodes .
7. Clonage et multiplication du clone .
- 8 . Détermination du titre de l'anticorps monoclonal et de l'antisérum .
 - Etapes de la mesure du titre .
 - dosage de la quantité de protéines attachées à la plaque .
 - test ELISA .
9. Electrophorèse sur gel d'acrylamide .
 - principe
 - methode

10. L'immunoblotting .
 - Principe .
 - Méthode .
- 11 . Microscopie à fluorescence .
 - Principe .
 - Méthode .

V RESULTATS ET DISCUSSIONS .

1. Purification de membranes de foie de rat .
 - 1.1. Purification du Golgi de foie de rat .
 - 1.2. Purification de membrane plasmique .
 - 1.3. Purification de la membrane lysosomale .
 - Activité spécifique relative .
 - du Golgi .
 - de la membrane plasmique .
 - au niveau des lysosomes .
2. Obtention d'anticorps monoclonaux .
 - 2.1. Immunisation de souris BALB/C au moyen de Golgi purifié .
 - 2.2. Contrôle des antisérums .
 - Mesure de la quantité de protéines adsorbées dans le fond des puits des plaques Titertek .
 - Influence sur le test ELISA de la quantité de protéines déposées sur le fond des puits .
 - 2.3. Recherche d'hybridomes producteurs d'anticorps .
 - 2.4. Détection des clones après dilution limite et recherche d'anticorps monoclonaux .
 - test ELISA sur surnageants de clones 3G3E3 3G3D10 1H8D6 ET 4E7E9 .
 - Titration de surnageants de clones producteurs d'anticorps 3G3E3 3G3D10 1H8D6 4E7E9 .
 - clones producteurs d'anticorps anti Golgi .
 - test réalisé en présence de NP40 à différentes concentrations .
3. Caractérisation des antigènes correspondant aux clones : poids moléculaire .
 - 3.1. Inventaire des protéines présentes dans la préparation de Golgi purifiée GD et de membrane plasmique purifiée .
 - électrophorèse sur gel d'acrylamide en gradient 5-20 % .

-Electrophorèse sur gel d'acrylamide à 12% .

3.2. Poids moléculaire des antigènes correspondant à
3G3E3 3G3D10 1H8D6 4E7E9

-	Electrophorèse et immunoblotting	N°1.
-	"	" N°2
-	"	" N°3
-	"	" N°4
-	"	" N°5

3.3. Recherche d'hybridomes produisant des anticorps
dirigés contre d'autres protéines du Golgi .

4 . Caractérisation des antigènes correspondant aux clones :
Immunocytochimie .

VI Conclusions générales .

ANNEXE : - electrophorèse .
- immunoblotting .

I. L'APPAREIL DE GOLGI

I.1. Introduction

La cellule est l'unité de base de tous les organismes. Chaque cellule est subdivisée en un certain nombre de compartiments ou organites qui ont chacun un ensemble de fonctions spécifiques.

Chaque compartiment possède des protéines et des marqueurs enzymatiques qui lui sont propres. Après synthèse sur les polysomes liés au RER, la glycosylation et le tri des protéines destinées à la membrane plasmique, aux lysosomes et à la sécrétion s'effectue dans le Golgi. Les protéines destinées au cytoplasme, mitochondries, peroxysomes sont synthétisées sur les polyribosomes cytoplasmiques et ne passent pas dans l'appareil de Golgi.

La première description de l'appareil de Golgi à partir de l'étude des cellules nerveuses remonte à 1898 par CAMILLO GOLGI, lauréat du Prix Nobel en 1906.

Présent dans toutes les cellules d'eukaryotes, l'appareil de Golgi se situe généralement dans la région périnucléaire de la cellule au niveau des centrioles.

I.2. Données morphologiques

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)

L'appareil de Golgi est constitué par un système de membranes de type lisse limitant une série de cavités.

Cette membrane d'une épaisseur de 75 Å est une bicouche lipidique où s'insèrent les protéines. Le dictyosome se reconnaît par l'arrangement régulier des systèmes membranaires qui le constituent ; ceux-ci se présentent sous forme d'empilements de petits sacs aplatis, très allongés et clos appelés saccules. Chaque pile de 4 à 8 saccules qui ont la forme d'un disque légèrement concave, est un dictyosome.

L'appareil de Golgi est une structure polarisée. On appelle Cis la face du Golgi où les vésicules provenant du RER et contenant les glycoprotéines nouvellement synthétisées fusionnent avec les saccules du Golgi. On l'appelle aussi zone chromophile (due à la possibilité de la colorer avec OsO_4) ou zone de formation. Les glycoprotéines passent vectoriellement de la face Cis à la face Trans de l'appareil de Golgi. La face Trans de l'appareil de Golgi est habituellement appelée zone de maturation. Elle possède un pH plus bas que le côté Cis et n'est pas colorable à l'acide osmique.

I.3. Données biochimiques

Le Golgi joue un rôle central dans les phénomènes de synthèse de protéines destinées à certains compartiments intracellulaires et à la sécrétion. La sécrétion est divisée en plusieurs étapes 1) SYNTHÈSE 2) SEGREGATION 3) TRANSPORT INTRACELLULAIRE 4) CONCENTRATION 5) STOCKAGE INTRACELLULAIRE 6) DECHARGE. Le Golgi est impliqué dans la fin de la première étape et les étapes 2 et 3. Le processus de sécrétion est un processus généralisé Le foie est spécialisé dans la sécrétion de la plupart des protéines du plasma en particulier l'albumine et les lipoprotéines.

a) Compartmentalisation du Golgi Cis Median Trans

La première constatation qui semblait indiquer que l'appareil de Golgi était formé de compartiments spécialisés quant à leurs fonctions biochimiques, fut obtenue grâce à l'utilisation de la technique de centrifugation isopycnique en gradients de saccharose (6).

Par analyse biochimique de tels gradients, on a découvert que la mannosidase I ne se trouve pas dans la même partie du Golgi que la Galactosyl transférase ou la sialyl transférase. De plus, S. KORNFELD et collaborateurs (6) ont montré que les enzymes responsables de l'addition de phosphate aux protéines destinées aux lysosomes se trouvaient dans une troisième fraction. Cependant, cette technique ne permet pas de situer le compartiment biochimique tel qu'il est disposé dans la cellule. Il faut faire appel à la microscopie électronique pour visualiser ces compartiments. Si on établit par centrifugation isopycnique que tel enzyme est associé à un compartiment bien déterminé, on peut ensuite à condition de purifier cet enzyme et de produire des anticorps dirigés contre cet enzyme, le localiser in situ par l'une ou l'autre technique immunocytochimique. C'est ce qui a été fait pour la Galactosyl transférase qui s'est avérée

localisée dans le compartiment Trans du Golgi. (4) (17).

Le schéma à trois compartiments ébauché ci-dessus ne décrit peut-être pas complètement la structure du Golgi, il peut exister des subdivisions plus fines. Il se pourrait fort bien que des recherches futures révèlent de nouvelles unités fonctionnelles mais il n'y a pas de raison de penser que leur nombre s'accroît de beaucoup. Cette compartimentalisation des empilements de l'appareil de Golgi faciliterait considérablement la glycosylation séquentielle des protéines, leur tri et leur adressage à mesure qu'elles traversent l'appareil de Golgi.

L'organisation du Golgi dépend du bon état fonctionnel des microtubules (12). Le cytosquelette est constitué de microtubules, microfilaments, filaments intermédiaires, et microtrabécules. Les microtubules sont constitués de tubuline, dimère de deux polypeptides lié de manière non covalente. Ils sont stabilisés par des ions Mg^{++} , Guanosine triphosphate (GTP). La formation des microtubules est aussi influencée par certaines protéines (microtubules - associated proteins) (MAPs) et nécessite des centres organisant les microtubules (MTOCs). L'intégrité des microtubules est indispensable à l'organisation de l'appareil de Golgi. Si on traite les cellules avec de la colchicine ou de la vinblastine, on retrouve le complexe de Golgi fragmenté ; les piles des citernes sont détachées les unes des autres et s'éparpillent dans le cytoplasme.

Les microtubules sont responsables du maintien et du fonctionnement du complexe de Golgi, ceci en arrangeant les piles de citernes en trois dimensions dans la cellule, en permettant la relation avec d'autres organelles et en assurant un flux normal de matériel dans et au delà de lui.

b) Les fonctions de l'appareil de Golgi1) Clivage protéolytique des pro-protéines

Un grand nombre de protéines sécrétées et de protéines de membrane sont sélectivement clivées durant leur passage à travers le Golgi. Le précurseur de la protéine est élagué, coupé et transformé. Le site covalent de protéolyse est très uniforme. Dans beaucoup de cas, le clivage se passe sur un à 4 acides aminés basiques et résulte dans la libération de lysine ou asparagine (33).

Une telle activité protéolytique a déjà été utilisée comme marqueur du Golgi. Les protéases de l'appareil de Golgi peuvent être transportées avec les produits de sécrétion. C'est le cas de la proalbumine proinsuline et des précurseurs de protéines virales. Ceci n'indique pas cependant que le clivage est un prérequis pour le transport. Dans le traitement de la proopiomélanocortine, des clivages successifs peuvent se passer dans différents compartiments. B-lipotropin et ACTH sont générés durant le transport, plus tard la conversion en endorphine se passe dans les granules de sécrétion.

2) Glycosylation des glycoprotéines et des protéoglycans

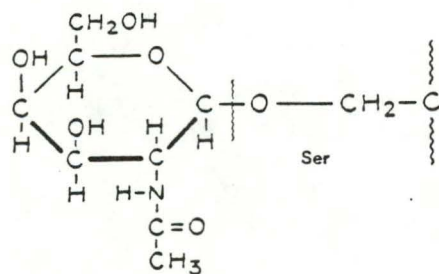
Les glycoprotéines et les protéoglycans sont deux classes de molécules existant principalement dans l'espace extracellulaire mais aussi sur la membrane plasmique et dans la membrane de l'appareil de Golgi et des lysosomes. Elles sont synthétisées à l'intérieur des cellules en étroite association avec les protéines de la membrane plasmique ou du réticulum endoplasmique ou complexe de Golgi. La partie oligosaccharidique semble importante pour l'adressage et la stabilité de la molécule. Alors que les glycoprotéines contiennent en poids 1 à 60 % d'hydrate de carbone, les protéoglycans en contiennent habituellement 90 à 95 %.

Une glycoprotéine possède une ou des chaînes oligosaccharidiques liées de manière covalente au squelette polypeptidique ; c'est ce qui la distingue des autres protéines. Elle possède peu de monosaccharides différents (glucose, galactose, mannose, Nacétylgalactosamine, xylose, acide sialique sont les plus représentés) mais leur contenu en carbohydrates varie largement. Les hydrates de carbone jouent un rôle clé dans les phénomènes de reconnaissance tels que ceux qui régulent la différenciation et la croissance ; l'altération de cette reconnaissance peut être un facteur pathologique. (33) (6) (15)

Les chaînes oligosaccharidiques sont attachées au squelette polypeptidique par l'un des cinq résidus d'acide aminé : asparagine, sérine, thréonine et plus rarement hypoxylisine, hypoxyproline.

1ère étape de la glycosylation

Il existe deux types de liaisons chimiques qui fournissent les sites d'attache O-glycosidique



N-glycosidique

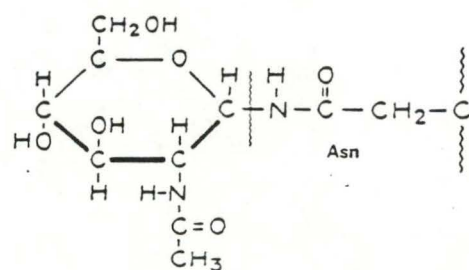
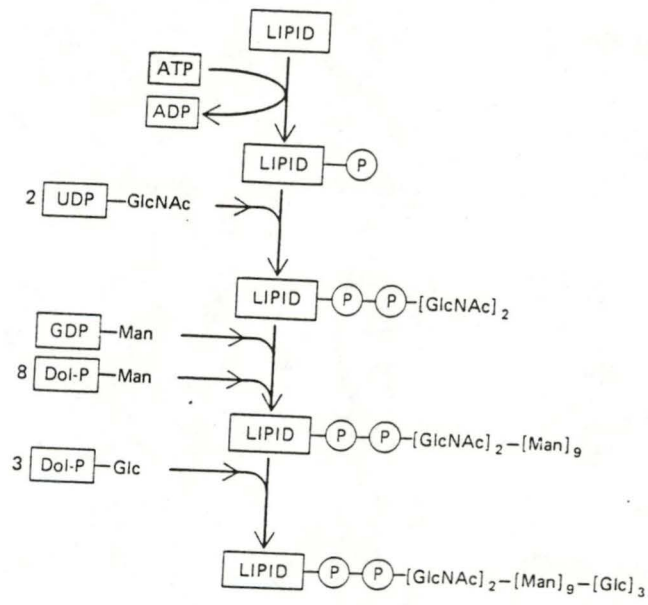


Fig 1 .

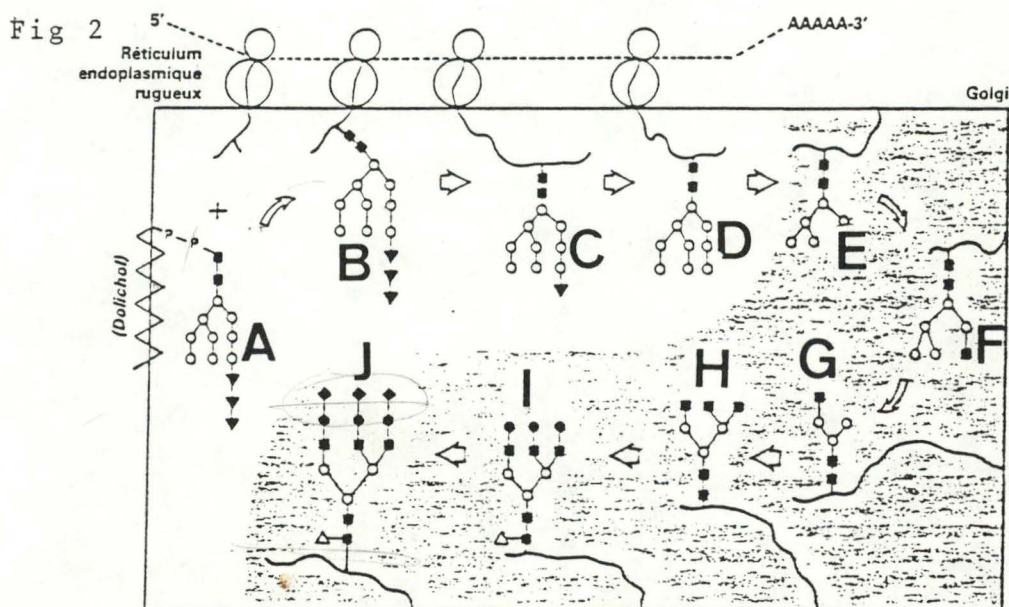


La biosynthèse des oligosaccharides commence au niveau du RER. Un simple précurseur contenant par exemple les complexes saccharidiques GLC_3MAN_9 (GLCNAC)₂ lié au dolichol phosphorylé sera transféré du dolichol à un acide aminé de la chaîne polypeptidique (fig. 1).

Le dolichol est une structure polyisoprénoïde de nature lipidique. Il sert donc d'amorce pour la liaison de la structure oligosaccharidique (fig. 1 où le terme lipide représente le dolichol). Cette glycosylation initiale d'une protéine dans le réticulum endoplasmique sera suivie par un processus important de remodelage de l'oligosaccharide. Les 3 glucoses sont rapidement éliminés. Le reste du remodelage s'effectue dans le Golgi.

-N-glycosidique lié à l'asparagine (26) Fig.2

La liaison N-glycosidique des oligosaccharides aux protéines s'effectue exclusivement par une liaison GlcNAc-Asn où le Asn fait partie d'une séquence Asn-X-SÉR(Thr), habituellement à un tour bêta de la molécule protéique enroulée (15). L'oligosaccharide lié à l'azote consiste en une région centrale ayant la structure $\text{Man-1,4-GlcNAc-1,4-GlcNAc-Asn}$.

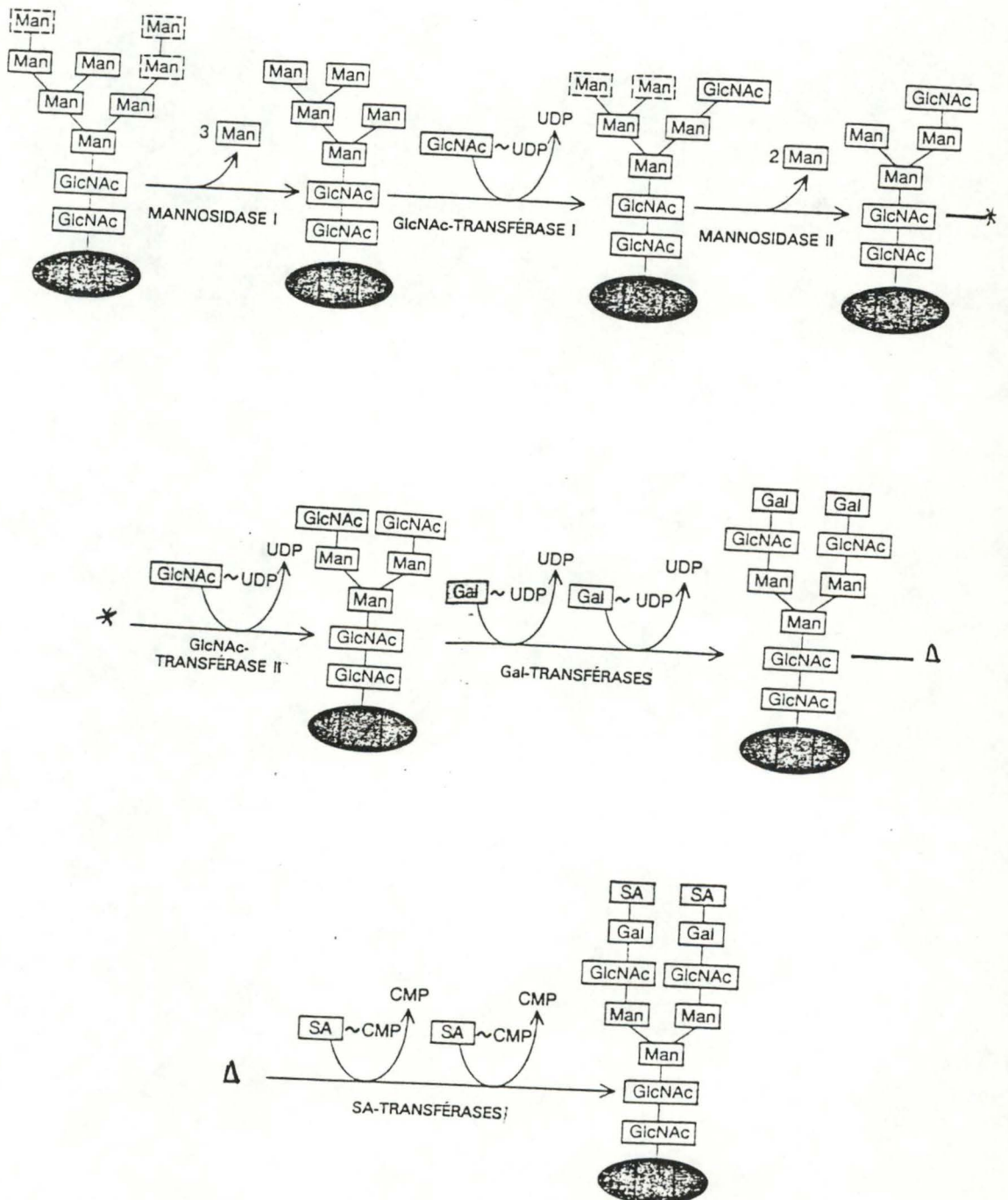


Séquence proposée pour la transformation des chaînes oligosaccharidiques liées à l'azote et rattachées à un peptide: ■, résidu de N-acétylglucosamine; ○, résidu de mannose; ▼, résidu de glucose; ●, résidu de galactose; ◆, résidu d'acide sialique. Le trait ondulé représente la chaîne polypeptidique; le trait discontinu est le mRNA. Les processus à l'intérieur de la surface ombrée se passent dans le complexe de Golgi. (Modifié et reproduit, avec permission, de Lennarz, W.J. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, 1980.)

- O-glycosidique lié à la sérine ou à la thréonine. (25) (15)

implique les groupements alcools libres des résidus sérine et thréonine du polypeptide dans une séquence tripeptidique Asn-Y-Ser(Thr), Y étant un acide aminé différent de l'aspartate. Le résidu glucidique le plus communément attaché au résidu sérine ou thréonine est le Gal N Ac.(ser)

2ème étape de la glycosylation (Fig. 3)



La séquence de réactions enzymatiques qui se déroulent dans le Golgi et modifient la partie polysaccharidique des glycoprotéines, protéoglycans et glycosaminoglycans est à ce jour bien connue, surtout en ce qui concerne les protéines N-glycosylées.

Le processus de traitement des protéines N liées commence dans la lumière du reticulum endoplasmique par la fixation grâce au dolichol d'un polysaccharide unique sur l'asparagine de la glycoprotéine en formation. Ce polysaccharide possède 14 molécules de sucre : 2 GlcNAc, 9 mannoses et 3 glucoses. Avant que les protéines ne quittent le reticulum endoplasmique, les trois résidus glucoses (et peut-être un résidu mannose) se détachent rapidement ; ensuite, les protéines sont transférées dans des vésicules jusqu'à l'appareil de Golgi. (6)

Après avoir quitté le réticulum endoplasmique, les divers types de glycoprotéines bordant la face CIS d'un empilement de l'appareil de Golgi portent toutes le même polysaccharide. Cependant, une fois à l'intérieur de l'empilement, les protéines destinées aux lysosomes sont reconnues et sont pourvues d'un groupement phosphate fixé en position 6 sur un mannose. Elles ne subissent guère de modifications ultérieures. Les protéines porteuses de l'étiquette "phosphate" sont capturées par un système de récepteurs spécifiques et emballées dans des vésicules qui vont fusionner avec les lysosomes. Les ou les récepteurs à mannose 6P existent au niveau du Golgi Cis et Trans.

Les protéines destinées à la sécrétion ou à la membrane plasmique sont transformées plus radicalement. Une telle modification résulte de la perte de la plupart de leurs résidus mannoses, perte qui se déroule en deux étapes. D'abord, une enzyme appelée mannosidase I enlève 3 molécules particulières de mannose à la protéine. Si le processus

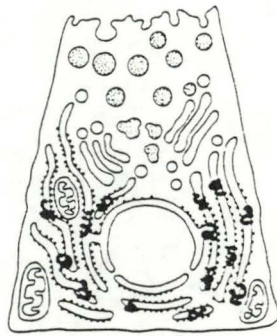
s'arrête là, la glycoprotéine est appelée glycoprotéine à haut mannose. (étape **D** Fig 2) Si le processus continue, une enzyme appelée Glc Nac transférase I attach une molécule de GlcNac à l'une des mannoses restants ; puis l'enzyme mannosidase II enlève encore 2 résidus mannoses et l'enzyme Glc Nac transférase II ajoute une autre molécule de Glc Nac. A la fin du processus, d'autres enzymes ajoutent du galactose. Enfin, une addition d'acide sialique termine la séquence oligosaccharidique complexe de la glycoprotéine. (étape **J** dans fig.2).

La vitesse de la glycosylation est mise en évidence par l'utilisation d'isotopes radioactifs : on peut visualiser par autoradiographie le passage d'une glycoprotéine depuis sa formation au niveau du réticulum endoplasmique jusqu'à sa sécrétion au niveau de la membrane. Si on marque au tritium les acides aminés constituant de la protéine, on constate qu'après trois minutes, celle-ci se situe au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. (10)

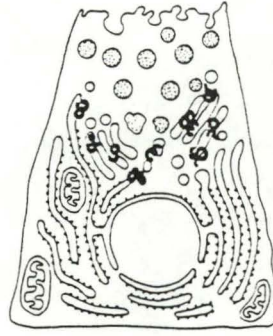
Les protéines sont alors encapsulées dans une vésicule de transport constituée d'un fragment de la membrane du réticulum.

Après 20 minutes, les vésicules ont fusionné avec la membrane de la citerne du côté Cis de l'appareil de Golgi.

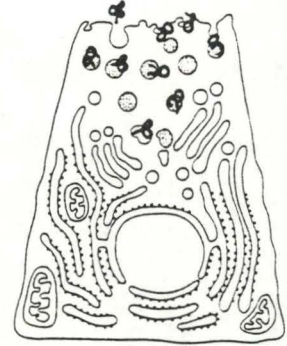
Après 90 minutes, le Golgi bourgeonne du côté Trans et les protéines sont retrouvées dans les granules de sécrétion.



3 minutes:
silver grains over the ER



20 minutes:
silver grains over the
Golgi apparatus



90 minutes:
silver grains over
secretory vesicles

Les protéoglycanes sont aussi des protéines comportant des chaînes oligosaccharidiques liées par co valence à leur squelette polypeptidique, mais les oligosaccharides diffèrent chimiquement et en abondance de ceux liés aux glycoprotéines. Les chaînes d'oligosaccharides des protéoglycane possèdent des segments saccharidiques répétitifs qui renferment :

- une glucosamine ou galactosamine
- un acide uronique (sauf pour le sulfate du kératane)
- ils contiennent presque tous un groupe sulfate soit sous forme O-ester ou sous forme de N-sulfate (à l'exception de l'acide hyaluronique)
- ils ne contiennent en principe pas d'acide sialique.

(15)

On peut distinguer 7 types de polysaccharides, attachés de manière covalente aux polypeptides des protéoglycane, différents par leur composition en monomères, leur liaison glycosidique, la quantité et l'endroit de leurs substituants sulfatés. Tous, sauf l'acide hyaluronique, renferment des glucides sulfatés.

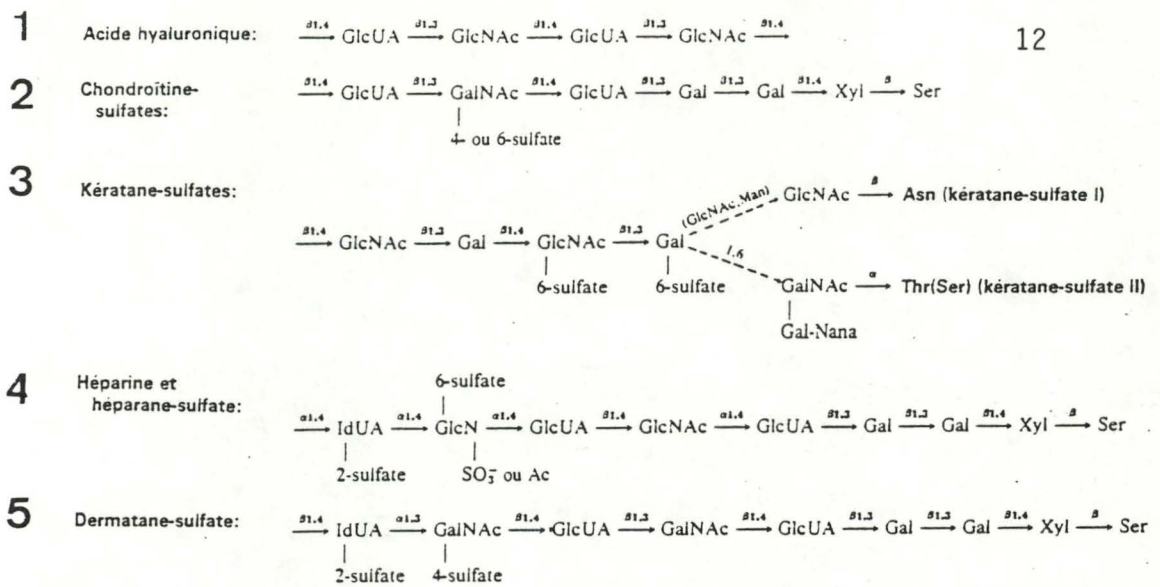


Fig 4 Résumé des structures des protéoglycanes et des glycosaminoglycanes. (GlcUA, acide D-glucuronique; IdUA, acide L-iduronique; GlcN, D-glucosamine; GalN, D-galactosamine; Ac, N-acétyle; Gal, D-galactose; Xyl, D-xylose; Ser, L-sérine; Thr, L-thréonine; Asn, L-asparagine; Man, D-mannose; Nana, acide N-acétylneuraminique.) Les structures sommaires ne sont que des représentations qualitatives; par exemple, elles ne reflètent pas la composition de l'acide uronique des polysaccharides hybrides tels que l'héparine et le dermatane-sulfate qui contiennent à la fois de l'acide uronique et de l'acide D-glucuronique. Il ne faudrait pas non plus penser que les substituants indiqués sont toujours présents; e.g., la plupart des résidus d'acide iduronique dans l'héparine transportent un groupement 2-sulfate, mais une proportion beaucoup plus petite de ces résidus sont sulfatés dans le dermatane-sulfate. (Légèrement modifié et reproduit, avec permission, de Lennarz, W.J. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, 1980.)

La formation des polysaccharides utilise des voies à peu près similaires à celles responsables de l'attachement et de la croissance des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines N liées.

Une UDP-XYL transférase attache 1 XYL du glucide nucléotidique à la sérine pour former la liaison O-Glycosidique Xyl-Sér, ceci pour les voies de glycosylation 2, 4, 5 de la fig.4. Une UDP-Gal-N-Ac transférase semblable intervient probablement dans la formation de la liaison O-glycosidique entre Gal-N-Ac et la sérine (ou la thréonine). (Voies 1 et 3 de la fig. 4). Il est quasi certain que la liaison N-glycosidique entre Glc-N-Ac et l'azote de la fonction amide de l'Asn implique le dolichol -P-P (voie 3). Le processus d'élongation de la chaîne fait intervenir les sucres nucléosides diphosphates agissant comme donneur.

Ici la terminaison des protéoglycanes résulte de la sulfatation des glucides et de la progression du polysaccharide particulier loin du site dans la membrane où s'effectue la catalyse.

Cette addition est particulièrement importante pour les mucopolysaccharides des cellules épithéliales, gastrointestinales et des chondrocytes. (8).

Il est à noter que les groupements SO_4 peuvent marquer non seulement les protéoglycans mais aussi des stéroïdes, les phénols, les dérivés tyrosines et les lipides.

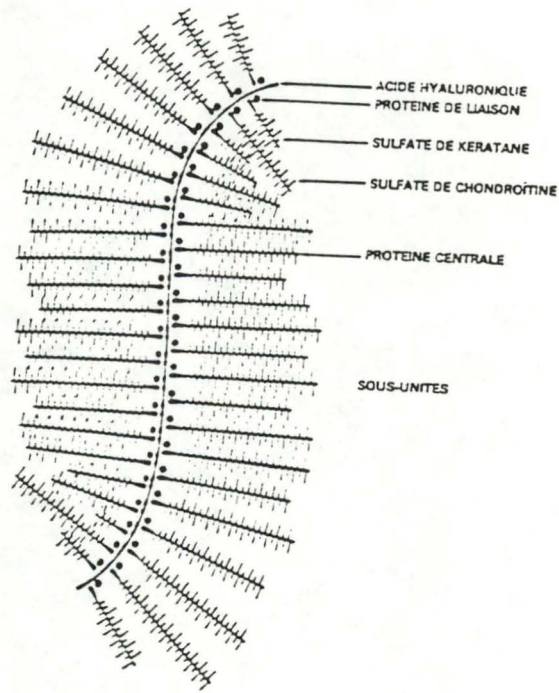
Deux étapes interviennent dans l'addition de groupements SO_4 aux chaînes oligosaccharidiques (8) : - formation de composés possédant des groupes sulfates actifs. L'activation du sulfate nécessite des ATP et deux types d'enzymes : ATP sulfurylase catalyse la réaction entre ATP et SO_4

↓
Adénosine - 5' - phosphosulfate (APS)

↓
3' - phosphoadénosine APS-phosphokinase

- le sulfate activé est transféré à la molécule acceptrice par une deuxième classe d'enzyme : les sulfotransférases. (15)

Les protéoglycans de PM $2,5 \times 10^6$ daltons s'agrègent en complexes qui peuvent être de PM 50×10^6 daltons. Ces agrégats s'intercalent dans la substance fondamentale entre les fibres de collagène (15)



Remarque 2

Les glycosaminoglycans sont des structures oligosaccharidiques qui ont été enlevées du squelette protéique du précurseur protéoglycane. (15) (Fig. 5)

Fig 5

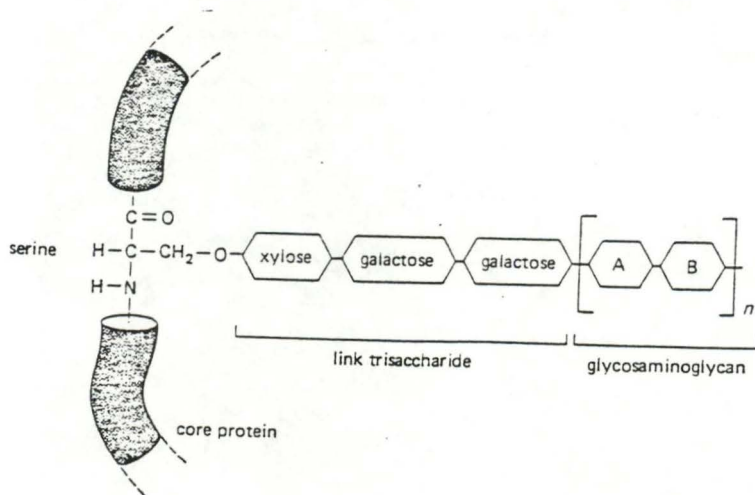
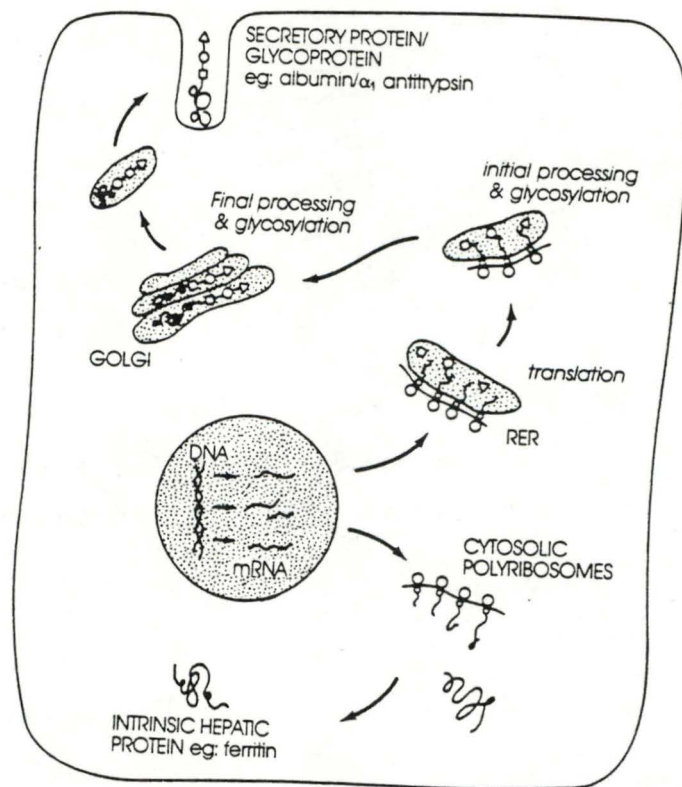


Fig 6



3) Retrait, réutilisation et recyclage des composés de membrane

Le trafic est centrifuge et centripète. Lors de la synthèse et de l'exocytose, il est dirigé vers l'extérieur ; lors de l'endocytose, il est dirigé vers l'intérieur de la cellule. TOUTES les protéines de membranes d'une cellule d'eukaryote sauf celles des mitochondries et des peroxysomes trouvent leur origine dans le réticulum endoplasmique et acquièrent leur individualité par un processus de différenciation complexe au cours duquel des vésicules bourgeonnent du réticulum endoplasmique et fusionnent avec le Golgi (Fig. 6) (42).

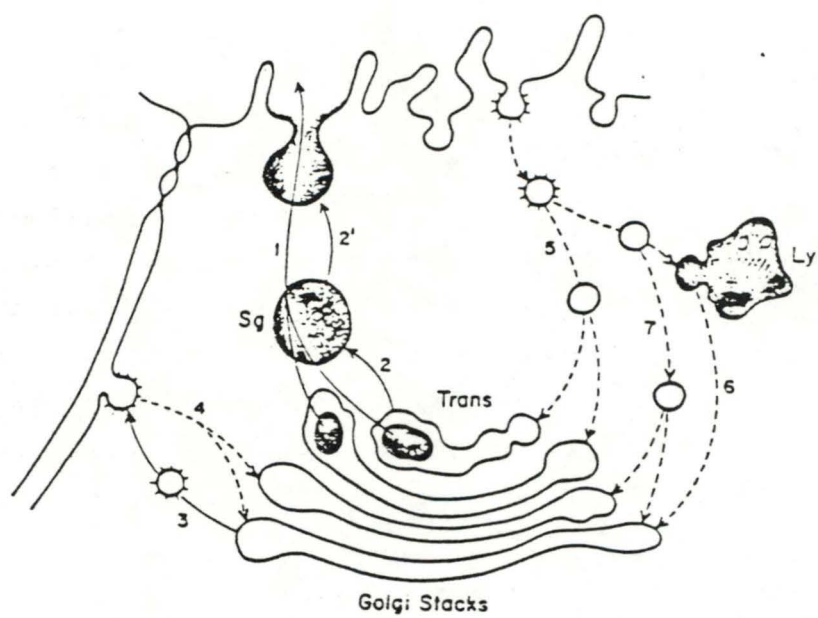
C'est le Golgi qui occupe la place centrale dans le tri des composants membranaires et les adresse au Golgi, à la membrane plasmique, au lysosome, aux granules de sécrétion et peut-être à l'enveloppe nucléaire.

La distribution se fait probablement par des vésicules qui bourgeonnent aux extrémités des citernes.

Ce mouvement de membranes s'accompagne donc par un retrait tout à fait sélectif de certains composés de la membrane du réticulum d'abord, du Golgi ensuite ou peut-être même des différents saccules.

La composition oligosaccharidique d'une glycoprotéine dans une vésicule porteuse est la mémoire moléculaire du dernier compartiment cellulaire auquel la glycoprotéine a été exposée. Qu'est-ce qui régule le mouvement de ces vésicules et leur spécificité de telle sorte que chaque compartiment intracellulaire garde son individualité ? Il a été suggéré que l'initiation serait liée à l'accrochage d'un "coat" à l'extrémité des citernes de Golgi suivi du

Fig 7



bourgeoisement de vésicules (à l'intervention de protéines ou cytosol et ATP) mais qu'est-ce qui détermine la fusion de ces vésicules donneuses avec la membrane acceptrice ? Quels sont les récepteurs responsables de la spécificité des interactions ? Toutes questions qui restent ouvertes.

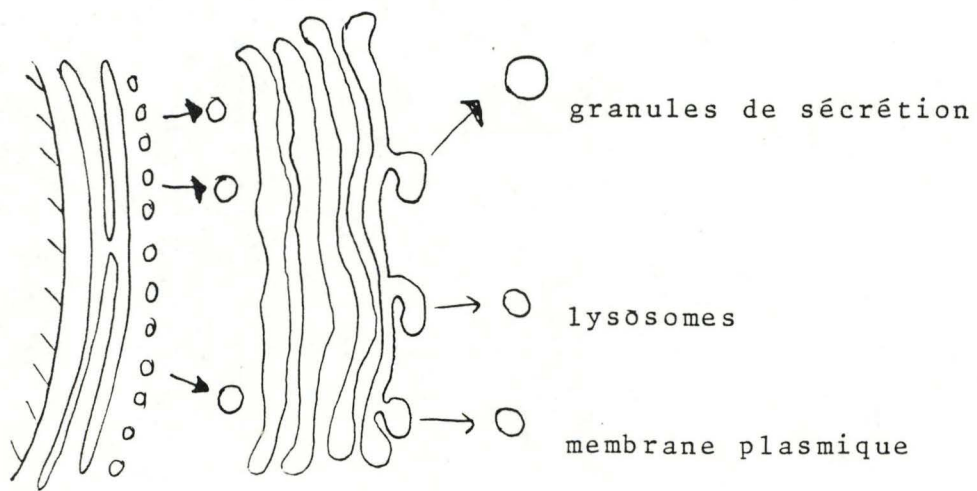
Au cours du mouvement centripète, lors de l'endocytose, les mouvements membranaires sont aussi tout aussi importants. Ils ont été mis en exergue par le fait que les macrophages internalisent, pendant le processus d'endocytose, jusqu'à 200 % de leur surface membranaire par heure. Il est certain que la synthèse ne peut compenser cet influx de membrane et qu'un retour des membranes internalisées vers la surface s'impose. L'endocytose par récepteurs fait intervenir plusieurs compartiments membranaires : le ligand passe de la membrane plasmique ou des régions spécialisées de celle-ci par les endosomes ou réceptosomes, pour aboutir aux lysosomes. Le récepteur est soit recyclé à partir de l'endosome vers la membrane plasmique ou détourné vers l'appareil de Golgi où il serait réparé avant de rejoindre la membrane plasmique. (Fig. 7) (14)

c) Mode de déplacement des glycoprotéines dans le Golgi

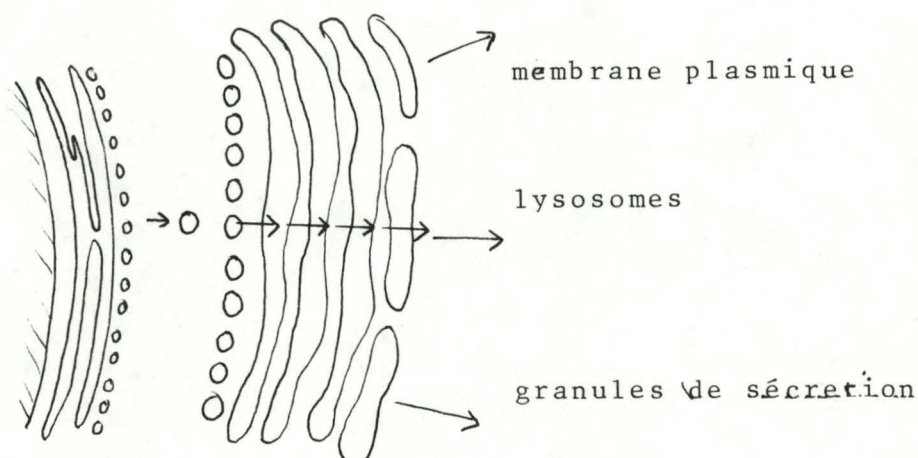
Deux modèles ont été proposés pour expliquer comment les glycoprotéines traversent l'appareil de Golgi. (6) (32).

Première hypothèse : la progression des citernes.

Une nouvelle citerne se forme lors de la fusion des vésicules provenant du réticulum endoplasmique avec la face Cis d'un empilement et la citerne néo-formé progresse vers l'intérieur de l'empilement.



A mesure que d'autres citernes se forment sur la face Cis, la citerne se déplace à travers l'empilement. Au cours de sa progression, les activités biochimiques se modifient et la citerne assume successivement les fonctions des 3 compartiments ; arrivée sur la face Trans, la citerne se fragmente en vésicules qui conduisent les protéines à destination.



Cette hypothèse est abandonnée à l'heure actuelle.

Seconde hypothèse : le transfert vésiculaire.

Les glycoprotéines sont transportées d'un compartiment au suivant par des vésicules formés par bourgeonnement de la membrane des citernes.

Jusqu'à une date assez récente, l'hypothèse de la progression des citernes était la plus généralement admise. Cependant, le saut d'une protéine d'un empilement de Golgi à l'autre et l'individualité de la composition enzymatique des citernes sont manifestement incompatibles avec cette hypothèse. Les glycoprotéines sont donc probablement transportées d'un compartiment au suivant par des vésicules.

d) Biogénèse et répllication de l'appareil de Golgi (8)

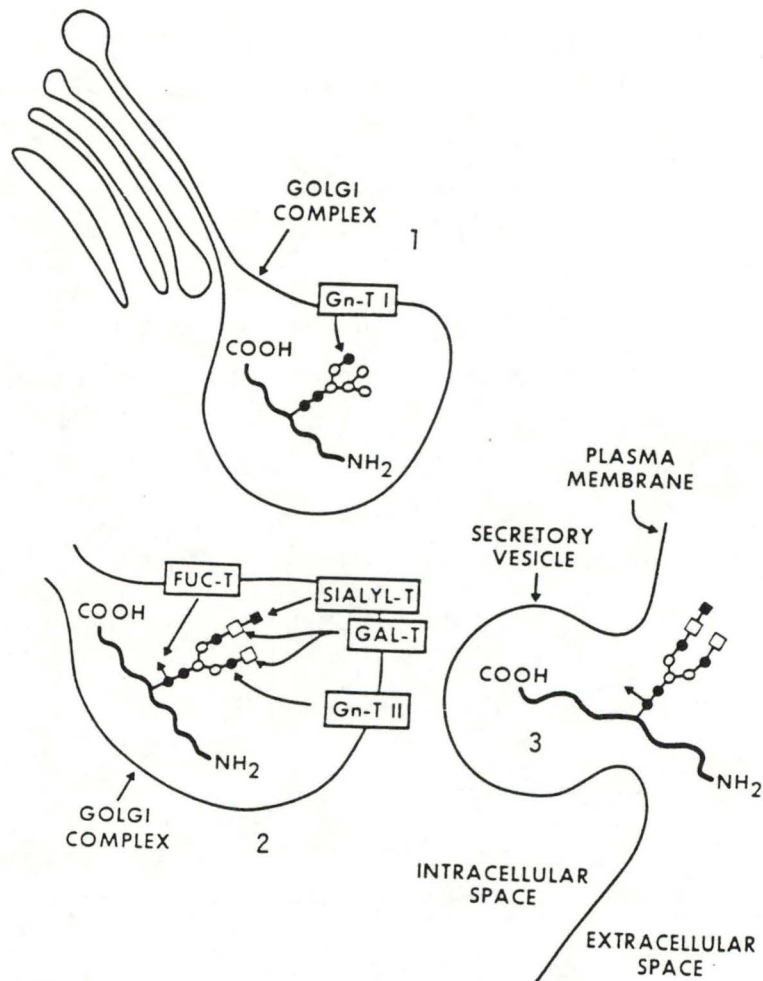
C'est PERRANCITO qui a spécialement exploré le phénomène de répllication au niveau de l'appareil de Golgi. Il constate que la division de l'appareil de Golgi ne correspond pas jusqu'à un certain point à la division cellulaire. A cette division de l'organelle, il donne le nom de dictyocinèse. L'appareil de Golgi se subdivise en plus petites unités lesquelles sont appelées dictyosomes.

En 1957, GATENBY a proposé la reproduction par fission, par fragmentation. Il se peut que l'organelle se divise différemment dans les différents types de cellules ou étapes de développement ; mais c'est une structure complexe incluant la différenciation d'une face par rapport à l'autre. Sa répllication semble inclure quelques principes complexes de l'organisation cellulaire. On ne peut donc pas se limiter à l'hypothèse de la fragmentation.

En 1969, BROWN et en 1971 MOLLENHAUER émettent l'hypothèse que l'organisation de l'enveloppe des citernes proviendrait de l'extension de membranes provenant d'autres régions cellulaires.

En 1965, BROUCK a proposé que l'enveloppe nucléaire et le RER seraient la source des citernes proximales. Le RER aurait lui-même une origine nucléaire.

Fig 7 bis



Terminal stages in the processing of a secretory glycoprotein in the Golgi apparatus. (1) The partially processed glycoprotein is transported to the Golgi apparatus for elongation (see Figure 1). GlcNAc-transferase I (Gn-T I) adds a GlcNAc residue to the oligosaccharide. (2) Two more mannose residues are removed and GlcNAc-transferase II (Gn-T II), fucosyltransferase (FUC-T), galactosyltransferase (GAL-T), and sialyltransferase (SIALYL-T) complete elongation. (3) A secretory vesicle transports the completed glycoprotein from the Golgi apparatus to the plasma membrane. Membrane fusion occurs, followed by secretion of the glycoprotein. Abbreviations: Gn, *N*-acetyl-D-glucosamine; ●, GlcNAc; ○, Man; ▲, Fuc; □, Gal; ■, sialic acid.

e) Les enzymes marqueurs du Golgi (Fig 7 bis)

La plupart des marqueurs du Golgi connus jusqu'à présent sont en relation avec le processus de glycosylation des protéines elles-mêmes synthétisées dans le réticulum endoplasmique rugueux.

- DANS LA PARTIE CIS

La mannosidase I a pour rôle de retirer les mannoses des glycoprotéines (6).

La N-Acetyl glucosaminyl phosphotransférase transfère une N-Acetyl glucosamine sur un mannose restant de la chaîne oligosaccharidique. (6)

Phosphodiester glycosidase

NADH cyt C réductase / joue le rôle de couple redox. (43)

Nucléoside diphosphate phosphatase : dégrade l'UDP relâché suite au transfert de galactose de l'UDP-Gal aux glycoprotéines naissantes (1).

Phosphodiesterase : clive la N-Acetyl glucosamine à partir du mannose-6-P. (31).

- DANS LA PARTIE MEDIANE

Glc-N-Ac transférase : transfère le Glc-N-Ac sur le mannose restant de la chaîne oligosaccharidique naissante (6).

Mannosidase II : enlève encore 2 mannoses (6).

Fucosyl transférase : transfère du fucose au polypeptide naissant (6).

- DANS LA PARTIE TRANS

Galactosyl transférase : cfr schéma ci-contre.

Sialyl transférase : cfr schéma ci-contre.

Thiamine pyrophosphatase (TTPase) : son activité est due à la Nucléoside

diphosphatase diphosphatase (UDPase)

CMPase : dégrade le CMP relâché après transfert de l'acide sialique du CMP-acide sialique à la chaîne oligosaccharidique naissante (6).

Phosphodiesterase : cfr ci-dessus.

pH : aux environs de (4).

f) Composition de la membrane du Golgi1) Les protéines

Sur gel d'électrophorèse de polyacrylamide SDS jusqu'à 40 bandes peuvent être mises en évidence . Leurs poids moléculaires s'échelonnent entre 10 000 et 300 000. (13).

Aucune bande ne compte plus de 5 % du total.

Les principales bandes ont un poids moléculaire de 210 000, 130 000, 80 000, 70 000, 67 000, 45 000, 43 000, 38 000, 30 000, 20 000. (16)(13)

Sur membranes de Golgi purifiées, après l'utilisation de cycloheximide qui va vider le Golgi de tous les produits de sécrétion, on peut mettre en évidence 4 protéines majeures de poids moléculaire de 115 000, 83 000, 67 000, 50 000. Il semblerait que ce soient les protéines les plus abondantes de la membrane de Golgi. (34)

Le poids moléculaire de la galactosyl transférase se situe généralement entre 35 000 et 55 000 daltons et la valeur la plus représentée est de 50 000 daltons. Cette différence de poids moléculaire de la galactosyl transférase est fonction de l'espèce, de l'origine et de la méthode de séparation des protéines. Par exemple chez l'homme, la galactosyl transférase du sérum, par la technique de filtration sur gel le PM se situe entre 70 000 et 75 000 alors ; en SDS-PAGE il est de 49 000. Par contre chez le rat, au niveau du foie, en SDS-PAGE, il est de 67 000 daltons alors qu'en équilibre de sédimentation il est de 48 200 daltons. (17)

Le récepteur des enzymes lysosomiaux possède un PM de 215 000 daltons. Sa situation au niveau du Golgi reste encore fort discutée ; BROWN et FARQUHAR (44) le localisent au niveau du Golgi CIS, d'autres chercheurs le localisent dans la partie TRANS et parfois dans les deux parties. (18)

Les sialyltransférases sont restreintes à un système d'interconnection consistant aux citernes TRANS du Golgi et un réseau tubulaire TRANS. Deux protéines ont été identifiées comme étant des sialyltransférases et correspondent aux poids moléculaires de 41 000 et 47 000 daltons. (28)

2) Les lipides du Golgi (11)

Les composés lipidiques de la membrane de Golgi sont nécessaires dans les processus de glycosylation et de sécrétion, le transport intracellulaire et la fusion de membrane. On peut relever la présence de glycérophospholipides, sphingomyéline, cholestérol et ubiquinone en grand pourcentage (voir tableau). La vitamine A est aussi un lipide présent de la membrane de Golgi mais elle se retrouve cependant dans un grand nombre de fractions subcellulaires. Récemment, on lui a attribué une fonction dans la membrane en rapport avec la glycosylation des glycoprotéines (11). Le cholestérol apparaît être en proportion plus élevée dans le foie que dans d'autres organes, ceci serait à mettre en relation avec les propriétés sécrétrices du foie. (il est à noter cependant que la plus grande proportion de cholestérol se retrouve dans la membrane plasmique .

Tableau

	<u>Protéines</u>
lipides phosphorylés :	51,3 µg/mgr
glycérophospholipides phosphorés	47 µg/mgr
ubiquinone	7,5 µg/mgr
vitamine A	4,9 µg/mgr
phosphore total	77,6 µg/mgr

3) Les phospholipides de la membrane de Golgi (11)

(voir tableau)

Les phospholipides sont les constituants principaux des lipides de membranes.

Ce groupe de lipides contient du phosphore sous forme d'acide phosphorique. Ils contiennent 2 molécules d'acides gras estérifiant le premier et le deuxième hydroxyle du glycérol, alors que le troisième hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide phosphorique. Un groupe alcool estérifié par l'acide phosphorique est localisé sur la tête polaire de la molécule de phospholipides. D'après l'alcool terminal, on a différents types de phospholipides. Tous, sauf la sphingomyéline, contiennent du glycérol.

Les proportions de phospholipides présents dans le Golgi ont été estimés par (11) sur le foie de rat ;

Tableau

	<u>Protéines</u>
phosphatidylcholine	109,6 µgr/mgr
phosphatidyléthanolamine	40,4 ugr/mgr
sphingomyéline	15,3 µgr/mgr
phosphatidyl Inositol	16 µgr/mgr
phosphatidylsérine	5,4 µgr/mgr
composés lyso	6,9 µgr/mgr
Indéterminés	2,61 µgr/mgr

II. LES ANTICORPS MONOCLONAUX

La propriété fondamentale des anticorps est leur "SPECIFICITE" induite par les antigènes correspondants. Un sérum normal contient une diversité d'anticorps dans des proportions variables, mais par immunisation intensive, un animal formera de grandes quantités d'anticorps qui constitueront alors une part importante de ses immunoglobulines sériques, dont la concentration globale sera fortement accrue.

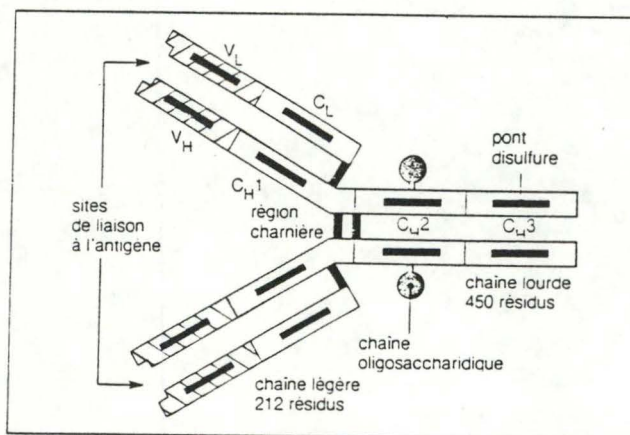
II.1. Les anticorps en général Fig. 8 (40) (9)

Les immunoglobulines sont constituées de 4 chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères (L) de 210 à 220 a.a (de 25 000 daltons) associées à une paire de chaînes lourdes d'environ 450 a.a (de 50 à 77 000 daltons).

La formule générale est H_2L_2 .

Des ponts disulfures relient les chaînes entre elles.

Fig 8



Structure de base d'une IgG. Les régions N-terminales des chaînes lourdes (H) et des chaînes légères (L) sont caractérisées par des séquences variables (V) appelées respectivement régions V_H et V_L . Le reste de la molécule a une structure relativement constante. La partie constante de la chaîne légère est appelée région C_L . La partie constante de la chaîne lourde comprend 3 régions différentes : C_H1 , C_H2 et C_H3 . Ces régions globulaires, stabilisées par des ponts disulfures intracaténaires, sont appelées «domaines». Les 2 sites de liaison à l'antigène sont localisés dans les domaines variables. La région charnière, segment mal défini de la chaîne lourde, est localisée entre C_H1 et C_H2 ; la flexibilité de cette zone permet des variations de distance entre les 2 sites de liaison à l'antigène, leur assurant ainsi une indépendance opérationnelle. Les chaînes polysaccharidiques sont attachées au domaine C_H2 .

La fonction spécifique de liaison à un antigène est localisée à l'extrémité de chacune des branches de cet Y. Les immunoglobulines sont bivalentes ce qui veut dire que chaque extrémité de l'Ig va reconnaître un déterminant antigénique identique.

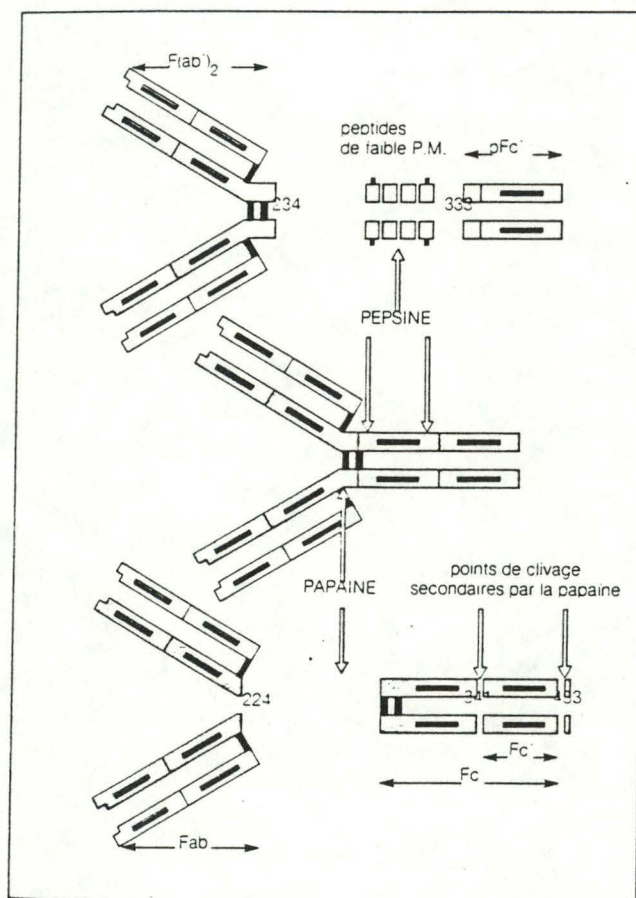
Il existe au niveau de la partie N terminale une zone de 107 à 113 aa variables qui est constituée de 3 séquences appelées "zones hypervariables". C'est elle qui va déterminer la spécificité de l'anticorps pour son antigène.

Le reste constitue la partie constante. Il existe plusieurs types de chaînes H : $\gamma, \delta, \mu, \epsilon, \delta$ qui correspondent aux Ig A, G, M, E et D. Les chaînes légères peuvent être de deux types soit chaînes K (kappa), soit lambda.

Les liaisons covalentes (pont disulfure) et non covalentes permettent une structuration secondaire, tertiaire et quaternaire.

L'action dégradante de certains enzymes : sur une immunoglobuline G est représentée à la Fig.

La pepsine clive la chaîne lourde en libérant les fragments $F(ab)_2$ et pFc . Une hydrolyse prolongée coupe le fragment central en peptides de faible poids moléculaire. La papaïne clive la molécule dans la région charnière (au résidu 224) libérant 2 fragments Fab et un fragment Fc ; la coupure ultérieure du fragment Fc libère Fc' .



II.2. Les antigènes en général

Pour engendrer la production d'anticorps par l'organisme, l'antigène doit remplir certaines conditions.

Il est nécessaire que celui-ci possède un poids moléculaire suffisamment élevé ($> 1\ 000$) et au moins deux épitopes. Il doit aussi être assez différent du self (le self étant tout ce qui est propre à l'individu). Plus cette différence sera grande, plus l'immunogénicité de cet antigène sera marquée.

L'antigène doit aussi entrer en contact avec le système immunitaire. Ceci par voie parentérale : voie intraveineuse, intramusculaire et sous cutanée, accidentelle ou expérimentale.

De manière fondamentale, on peut dire qu'une substance étrangère sera immunogène pour autant qu'elle soit reconnue par les lymphocytes du receveur.

Le pouvoir immunogène d'une particule peut être augmenté par addition d'adjuvants. On appelle adjuvant, des substances non antigéniques par elles-mêmes qui, mélangées à un antigène en augmentent l'immunogénicité. Le plus communément utilisé est l'adjuvant de FREUND complet et/ou incomplet, constitué d'un mélange d'huiles minérales et de substances particulières dérivées de la pétrochimie.

L'adjuvant de FREUND complet est obtenu par adjonction de mycobactérium tuberculosis tués par la chaleur.

II.3. Les anticorps monoclonaux

L'intérêt des anticorps monoclonaux réside dans le fait de disposer d'un seul clone comme source permanente d'anticorps de même classe, de même affinité, dirigée contre un seul "épitope". C'est ce qu'on appelle la spécificité de l'anticorps monoclonal. Mais celle-ci ne pourra jamais être établie de manière absolue car il n'est pas possible de tester chaque source alternative de tissus. La spécificité ne pourra être établie que dans le contexte de l'utilisation potentielle de l'anticorps.

Fusion et clonage

Lorsque l'on injecte un agent immunogène à un animal, celui-ci répond par la synthèse de toute une série d'anticorps dirigés contre les différents épitopes de cet antigène. Ces anticorps ne font pas nécessairement partie de la même classe isotypie et n'ont pas nécessairement une affinité semblable. Un sérum est donc constitué d'un mélange d'anticorps variables.

Or chaque anticorps est fabriqué par un clone unique de lymphocyte B. Par la technique du clonage et dilutions limites, il est possible d'isoler statistiquement une seule cellule (par puits de culture).

Mais les cellules cultivées in vitro ne vivent que quelques générations ... Il a donc été nécessaire de trouver une méthode qui permette de les faire vivre éternellement. Le problème fut résolu lorsque KOHLER et MILSTEIN (9) eurent l'idée de fusionner des cellules de myélome de souris avec des lymphocytes B issus de la rate d'une souris immunisée avec un antigène choisi. Les cellules hybrides nées de cette fusion sont appelées hybridomes. Elles possèdent à la fois le caractère immortel du myélome et la propriété lymphocytaire de produire des anticorps spécifiques.

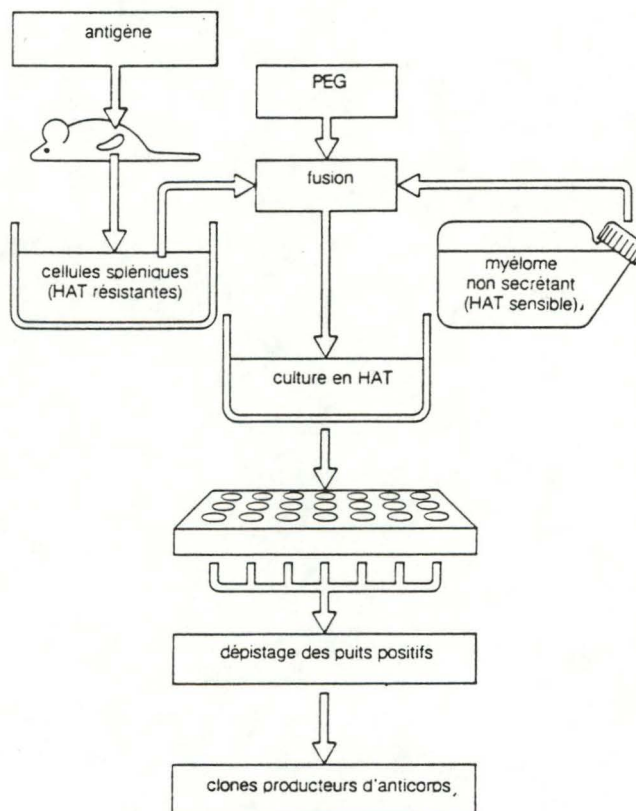
Par la technique de clonage classique, il est possible d'isoler l'hybridome, de le conserver indéfiniment et de le multiplier avec la production de grandes quantités d'anticorps identiques par la spécificité, la classe et l'affinité.

Principe de la production

La fusion de 2 types cellulaires est réalisée grâce au P E G (polyéthylène glycol), agent actif sur les membranes. Le nombre de cellules hybrides est faible et il est nécessaire d'avoir un rapport de 10 / 1 (cellule lymphocytaire sur cellule cancéreuse) pour obtenir des résultats valables.

Après fusion, il est nécessaire de pouvoir éliminer tout ce qui n'est pas hybride. On utilise donc des cellules myélomateuses déficientes pour un enzyme intervenant dans une des voies accessoires de synthèse de l'ADN : HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase) et/ou TK (thymidine kinase). En présence d'une substance bloquant la voie majeure de synthèse des nucléotides (aminoptérine), seules subsistent des cellules qui possèdent les enzymes de ces deux voies de remplacement. Dès lors, dans un milieu H A T (hypoxanthine + aminoptérine + thymidine), les cellules résultant de la fusion d'un lymphocyte normal et d'une cellule myélomateuse déficiente pourront survivre grâce à l'apport enzymatique d'origine lymphocytaire. Tandis que les cellules myélomateuses non fusionnées auront un blocage non compensé de leur synthèse d'ADN, les lymphocytes normaux meurent naturellement après 1 à 2 semaines.

Production d'anticorps monoclonaux. Les animaux (généralement souris ou rats) sont immunisés avec l'antigène. Lorsqu'une bonne réponse en anticorps est obtenue les lymphocytes spléniques sont préparés (les cellules des nodules lymphoïdes peuvent aussi être utilisées). Ces cellules sont fusionnées avec des cellules d'une lignée de myélome par addition de polyéthylène glycol (PEG) qui induit la fusion membranaire. Seulement une petite proportion des cellules fusionne avec succès. Le mélange est ensuite mis en culture dans un milieu contenant «HAT». HAT est un mélange d'hypoxanthine, aminoptérine et thymidine. L'aminoptérine est une toxine puissante qui bloque une voie métabolique. Cette voie peut être shuntée si la cellule est nourrie avec les intermédiaires métaboliques hypoxanthine et thymidine. Les cellules spléniques peuvent pousser en milieu HAT, mais les cellules de myélome ont un défaut métabolique et ne peuvent utiliser le shunt, de sorte qu'elles meurent en milieu HAT. Quand la culture est développée en milieu HAT, elle contient les cellules spléniques, les cellules de myélome et les hybrides. Les premières meurent naturellement après 1-2 semaines ; les secondes sont tuées par le HAT, mais les hybrides survivent car ils ont l'immortalité des cellules de myélome et le shunt métabolique des cellules spléniques. Certains auront également la capacité de produire des anticorps comme les cellules spléniques. Tous les puits contenant des cellules se multipliant sont testés pour la production de l'anticorps souhaité (souvent par RIA ou ELISA) et, s'ils sont positifs, la culture est clonée, c'est-à-dire répartie dans des plaques de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits. Cela donne un clone cellulaire provenant d'une seule cellule souche qui est à la fois immortelle et productrice d'anticorps (monoclonal).



Les hybridomes sélectionnés par analyse de la spécificité de l'anticorps produit pourront servir à une production abondante de celui-ci par 2 méthodes différentes : soit par croissance en milieu de culture, soit par inoculation des cellules fusionnées à une souris histocompatible ; dans ce cas, une tumeur se développera avec sécrétion de l'anticorps qui pourra être récolté.

II.4. Les anticorps monoclonaux dirigés contre l'appareil de Golgi

Jusqu'à présent, l'utilisation d'anticorps monoclonaux a abouti à l'identification de quelques constituants de la membrane de l'appareil de Golgi.

En 1982, Daniel LOUVARD (23) a immunisé des lapins avec du Golgi de foie de rat purifié. Le polysérum obtenu est dirigé contre un simple polypeptide de 135 kD, en SDS-PAGE, qui se localise dans la partie centrale du Golgi et de nombreuses vésicules coatées. Ce polypeptide semble avoir un rôle dans le transport de matériel du Golgi à la surface cellulaire. Il serait différent de la Galactosyl transférase de foie de rat (PM 46,5 kD) et de la sulfotransférase (PM 43,5 kD) de rein de rat. Ces poids moléculaires ont été déterminés par chromatographie sur gel. En 1983, TOUGARD et al (21) au moyen de cet anticorps polyclonal repèrent la protéine de 135 kD au niveau des citernes TRANS, des lysosomes et de la membrane plasmique mais pas dans les granules de sécrétion de la membrane.

BURKE et al (19), la même année, ont produit un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de même poids moléculaire (135 kD) de Golgi de foie de rat. Celle-ci semble se localiser au niveau de la membrane, à la lumière des citernes du Golgi et au niveau de 1 ou 2 citernes seulement.

En 1982, LIN et al (20) identifient au moyen d'un anticorps monoclonal une protéine de 110 kD qui coïncide avec la localisation cytochimique de la thiamine pyrophosphate. L'immunofluorescence révèle une structure lamellaire et vacuolaire ainsi qu'une localisation au niveau de la membrane plasmique mais pas à la surface externe de la cellule.

En 1984, CHICHEPORTICHE et al (24), grâce à un anticorps monoclonal dirigé contre le Golgi de cellules myélomateuses, identifient 2 protéines de 54 kD et 84 kD qui ne sont pas des glycoprotéines N liés mais seraient des protéines à oligosaccharides O-liés. Elles sont localisées dans la partie médiane de la pile du Golgi.

En 1984, SMITH et al () constatent que les souris non immunisées produisent des anticorps dirigés contre le Golgi de pancréas de rat et en tirent avantage pour produire deux anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines intégrales de la membrane de Golgi.

L'anticorps 1 se fixe sur deux bandes de 103 - 108 kD et l'anticorps 2 se fixe sur trois bandes 180 - 103 - 108 kD.

III. BUT DU TRAVAIL

Les marqueurs biochimiques les plus utilisés jusqu'à présent sont les enzymes marqueurs diversement localisés dans les citernes du Golgi : Mannosidase, Galactosyl transférase, Sialyltransférase et thiamine pyrophosphatase. Ils ne peuvent être utilisés à des fins cytochimiques, sauf la thiamine pyrophosphate.

Il est donc nécessaire pour résoudre le rôle central du Golgi dans le trafic vésiculaire existant entre les différents compartiments membranaires de faire appel à des anticorps monoclonaux qui répondent à cette définition. Un anticorps monoclonal présente plusieurs avantages par rapport à un polysérum : la nécessité d'éliminer par préabsorption les anticorps indésirables est abolie. Il est parfois très malaisé d'éliminer les anticorps contaminants d'une façon absolue. Un polyclonal sera dirigé contre les protéines majeures de la préparation de Golgi ce qui n'est pas le cas pour un anticorps monoclonal. Enfin, les monoclonaux sont faciles à produire et ceci en grande quantité.

Les problèmes sous jacents qui pourraient être élucidés grâce à de tels marqueurs sont 1) les transports vésiculaires réticulum endoplasmique --- Golgi CIS --- Golgi Médian --- Golgi Trans etc... qui s'effectuent lors de la biogenèse de protéines et glycoprotéines et 2) les recyclages membranaires qui accompagnent l'endocytose. Des anticorps

monoclonaux anti-Golgi permettraient aussi de distinguer jusqu'à quel point une membrane est individualisée : un saccule de Golgi possède-t-il ou non des protéines communes à un autre saccule, au réticulum endoplasmique, à la membrane plasmique ou aux lysosomes. Enfin, si l'on arrive à produire un anticorps dirigé contre une protéine localisée à la face externe du Golgi, celui-ci permettrait de purifier par affinité le Golgi en grande quantité.

L'intérêt des anticorps monoclonaux anti-golgi serait renforcé par l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-lysosomes et anti-membrane plasmique.

C'est pour toutes ces raisons, que nous nous sommes attachés à purifier des membranes de Golgi, à produire des anticorps monoclonaux dirigés contre celui-ci et à essayer de caractériser les antigènes correspondants.

Matériel & Méthodes .

-----1 . Purification de membranes de Golgi de foie de rat .
-----1.1 Principe :

Cette purification est basée sur l'équilibration du Golgi à sa propre densité $\pm 1,10$ dans un gradient de saccharose discontinu . On part de la fraction ML ajustée à la densité de 1,17 au moyen d'une solution de saccharose 1,32 .

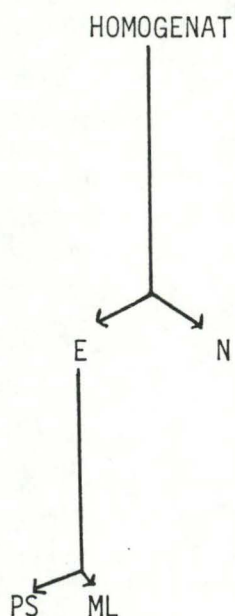
Après centrifugation à 25 000 rpm pendant 2,30 heures , le Golgi se retrouve à l'interface des fractions de densité 1,14 et 1,07 du gradient.

On appelle II cette couche du gradient contenant le Golgi et le reste est rassemblé en fraction I tandis que II est resuspendu dans du saccharose 0,25 M et recentrifugée à 40 000 tours / minute pendant 40 minutes ; ceci pour permettre l'élimination du saccharose et replacer le Golgi dans un milieu isotonique .

On obtient la fraction G et son surnageant S2 . G étant la fraction purifiée en Golgi que l'on pourra utiliser pour l'immunisation (Gi) et pour l'analyse et les dosages (GD) .

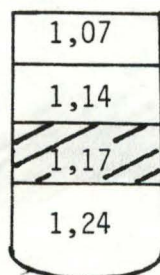
A partir du gradient de saccharose , on obtient donc 4 fractions I, II , S2 et GD/Gi .

Pour obtenir "ML", on part de 5 foies de rat .



Dounce loose 20 fois
 saccharose 0,25 M 10 minutes
 centrifugation à 1700 rpm 0°C
 1500 rpm
 1500 rpm
 rotor 30 à 20 000 rpm ($217W^2t$)
 20 000 rpm
 centrifugeuse Beckman L5 65

DENSITE



gradient de saccharose

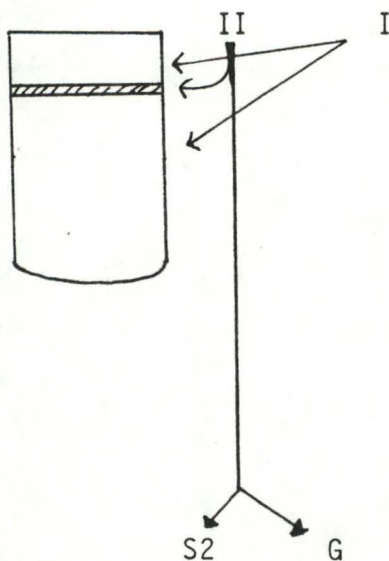
7ml

7ml

14ml

7ml

25 000 rpm 2,5 heures
 rotor SW 28 dans la L2-75
 (centrifugeuse Beckman)



dans du saccharose 0,25 M
 pendant 40 minutes à
 40 000rpm dans le rotor
 60 TI dans la L5 65 .

NB :Les solutions de saccharose ont été décrites par MORRE et al
 elles contiennent du TRIS maléate 37,5mM , pH 6,5 , du dextran
 T 500 1 % , du MgCl₂ 5 mM .

2 EVALUATION DE LA PURIFICATION DU GOLGI .

2.1 Principe .

Pour évaluer le degré de purification du Golgi , il est nécessaire de doser dans les différentes fractions les enzymesmarqueur des différentes membranes .

Pour calculer le rendement du dosage enzymatique , il est nécessaire de calculer la récupération à chaque étape du fractionnement . Pour cela on doit comparer :

$$E + N = N + ML + PS . \quad H = E + N$$

$$ML = I + II .$$

$$II = S2 + G .$$

L'enzyme marqueur du Golgi utilisé est la Galactosyl transférase .

Pour quantifier le degré de contamination de G par d'autres membranes , on a pris la 5'AMPase et la phosphodiesterase alcaline ^{pour la membrane plasmique} et la NADPH cyt C réductase pour le réticulum endoplasmique .

On a ajouté à ces dosages enzymatiques , le dosage des protéines . On peut calculer l'activité spécifique relative qui nous donne une valeur de la purification du Golgi .

$$ASR = \frac{\% \text{ d'activité enzymatique dans la fraction par rapport à H}}{\% \text{ de protéines dans la fraction par rapport à H}} .$$

2.2 MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUE ET DOSAGE DES PROTEINES :

2.1 La Galactosyl transférase :

La Galactosyl transférase , enzyme marqueur du Golgi transfère un groupe GAL . L 'activité enzymatique se dose par la radioactivité comparée lors du transfert d'un groupement Gal marqué au ^{14}C à l'ovalbumine ; celle-ci précipite au TCA (0°C) glacé sur des morceaux de papier Watman .

UDP - Gal ^{14}C	<u>préparation enzymatique</u>	Gal ^{14}C ovalbumine
+ Ovalbumine		cpm mesuré au
(uridine diphosphogalactose	37 °C, 60', pH 6,2	compteur .
^{14}C substrat)	triton X100 0,4%	
	MnCl ₂ 10mM	
	Mercaptoéthanol 30mM	

L'activité enzymatique est mesurée après lyse membranaire au triton X 100 0,4 % .

2.2 Phosphodiesterase alcaline :

La phosphodiesterase alcaline est un enzyme marqueur de la membrane plasmique . En présence du substrat , le thymidine 5' monophosphate paranitrophenyl diester , à 25°C durant 30 minutes , l'enzyme hydrolyse la liaison entre la thymidine 5' monophosphate et le paranitrophenyl et libère le paranitrophénol coloré en jaune en milieu alcalin .

THYMIDINE 5' monophosphate paranitrophényl diester



(substrat 0,75mM)

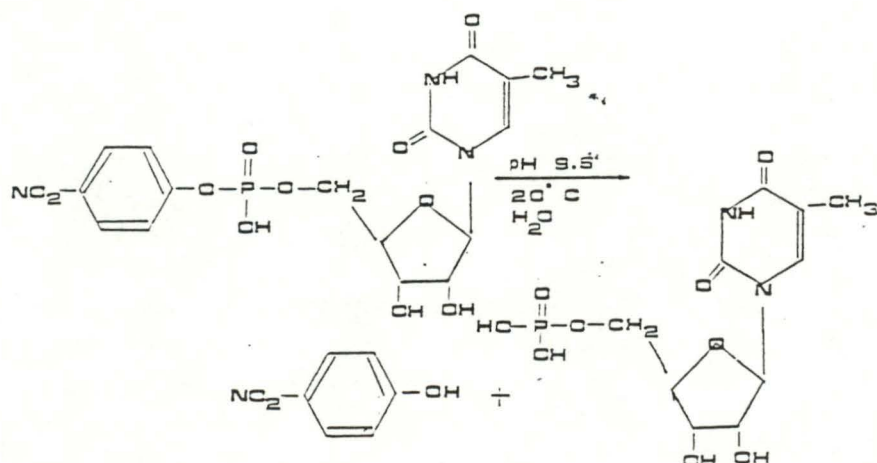
préparation enzymatique à 25°C

pH 9,6 10'

THYMIDINE 5' phosphate



paranitrophenol jaune en milieu alcalin .

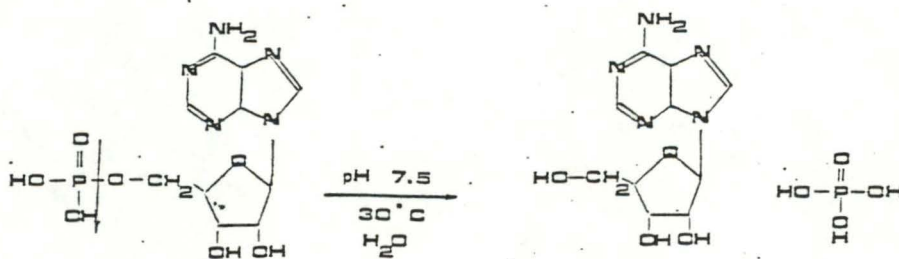


2.3 . 5'AMPase .

La 5'AMPase scinde un phosphate inorganique à partir du 5'amp .

substrat utilisé : 5'AMP pH 7,5

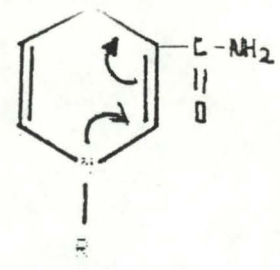
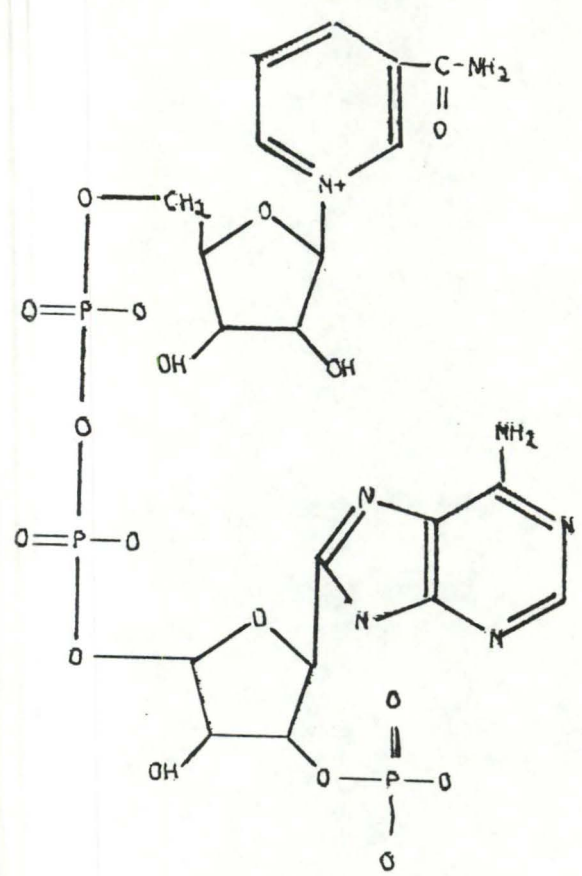
réaction



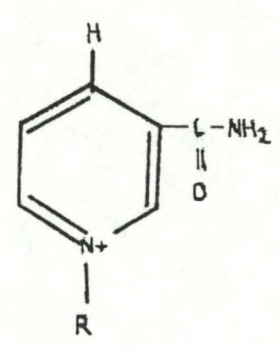
2.4 . La NADPH cyt C reductase .

A l'intervention de l'enzyme , le NADPH sous forme réduite, réduit le cyt C en s'oxydant . Le cytochrome C réduit présente un maximum d'absorption à 550 nm .

+ Cytochrome C oxydé



NADPH + H⁺



+ Cytochrome C réduit

NADP⁺

2,5 . Les protéines .

Dénaturation des protéines par NaOH 0,5 N . Les groupes tyrosines réagissent avec le réactif de Folin en donnant une coloration bleue . (le tryptophane donne aussi cette coloration). Extrêmement sensible . On mesure l'absorbance à 540 nm .

La mesure de l'absorbance en même temps que les échantillons , d'un étalon serum albumine à 400 ug par ml servira à déterminer la concentration en protéines par gramme de foie de chacun des échantillons étudiés .

3.1. PRINCIPE :

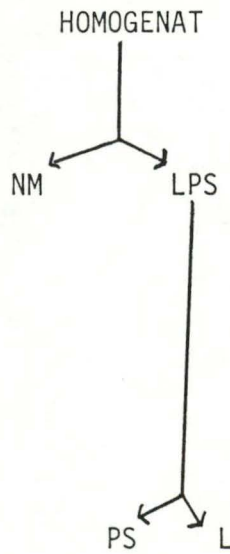
Les lysosomes de foies de rat sont obtenus par centrifugation isopycnique de la fraction mitochondriale légère .

Un gradient isopycnique est un gradient de densité où les particules sont centrifugées jusqu'à ce que leur densité soit égale à celle du milieu , de telle sorte que la vitesse de migration de la particule dans le champ centrifuge tende vers 0 .La densité de la particule varie selon le milieu utilisé .

Ce dernier dans ce cas particulier est le Nycodenz .

Les solutions de Nycodenz et de saccharose à densités égales n'ont pas la même osmolalité .Une solution de Nycodenz est hypotonique par rapport à une solution de saccharose de même densité . Par conséquent les lysosomes et les mitochondries qui possèdent un espace osmotique vont s'équilibrer dans une région de plus faible densité dans un gradient de Nycodenz (comparé à un gradient de saccharose) . Les peroxysomes ne possèdent pas d'espace osmotique : leur densité d'équilibration sera identique dans les deux milieux .De plus , les mitochondries soumises à une forte pression subissent une modification de la perméabilité de la membrane interne , leur densité sera plus élevée . Ceci permet une meilleure purification des lysosomes que dans un gradient de saccharose .

Pour obtenir la fraction mitochondriale légère , il faut passer par différentes étapes générales d'un fractionnement .



potter 2500 rpm , saccharose 0,25M
filtrer 0°C

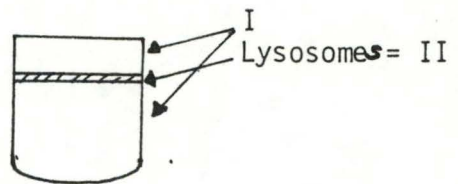
à 12 500 rpm 0,16 w²t rotor 30 0°C
12 500
12 500

20 000 rpm rotor 30 217 W²t
0°C

sur gradient isopycniqne

densité	
1.10	6 ml
1.135	7 ml
1.145	6 ml
1.16	12 ml

2 heures au rotor SW 27
0°C



lysosomes dialysés 1 nuit à 0°C dans
5 Litres de Na HCO₃ 1 mM
milieu hypotonique

S1
↓
S2
↓
S3
↓
S4

C1 + H₂O
↓
C2 + NaCl 0,15 M
↓
C3 + NaCl 1,15 M
↓
C4 + NaCl 0,15 M

MEMBRANES DE LYSOSOMES .

Nous obtenons 11 fractions :

- ° H = cellulès intactes
- ° NM = enrichies en noyaux et mitochondries
- ° L = enrichies en lysosomes , peroxyosomes et mitochondries .
- ° PS = fraction microsomale : membrane plasmique , Gölgi ,vésicules et cytoplasme .
- ° 2 fractions de lysosomes intacts (gradients)
 - I = peroxyosomes + mitochondrie
 - II = fraction lysosomale intacte
- ° 5 fractions lors de la lyse de la membrane lysosomale.
 - 4 surnageants S1 S2 S3 S4
 - .1 culot = la membrane lysosomale

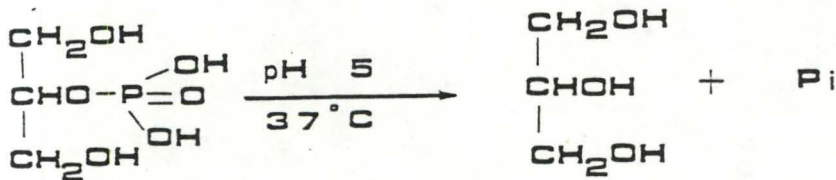
$$N = NM + L + PS$$

$$L = I + II$$

$$II = Mb + S1 + S2 + S3 + S4 .$$

3,2 . MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET DOSAGE DES PROTEINES .

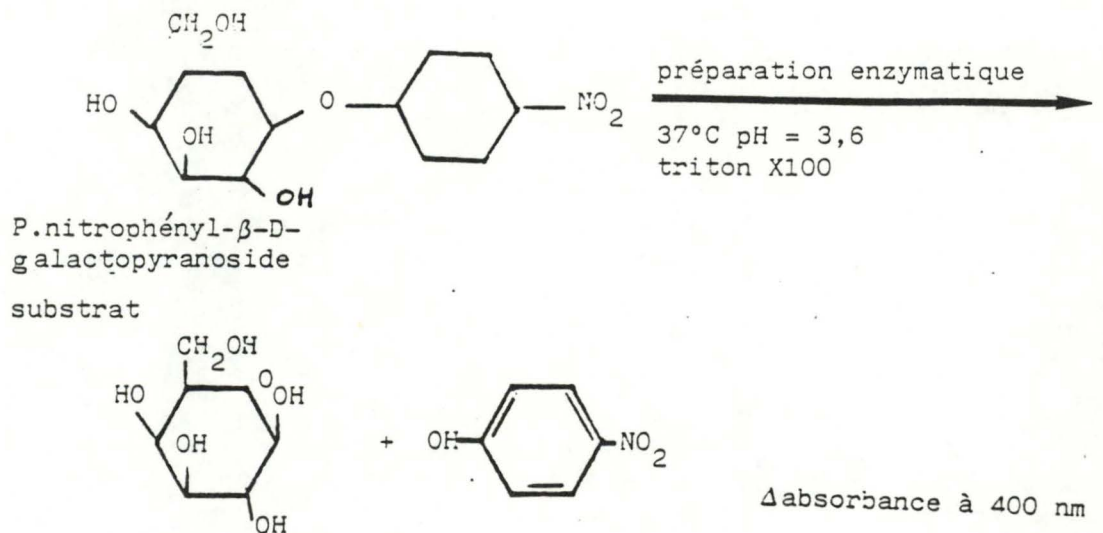
1 . PHOSPHATASE ACIDE .



triton X 100

dosage colorimétrique du
phosphate inorganique .
Absorbance à 650 nm .

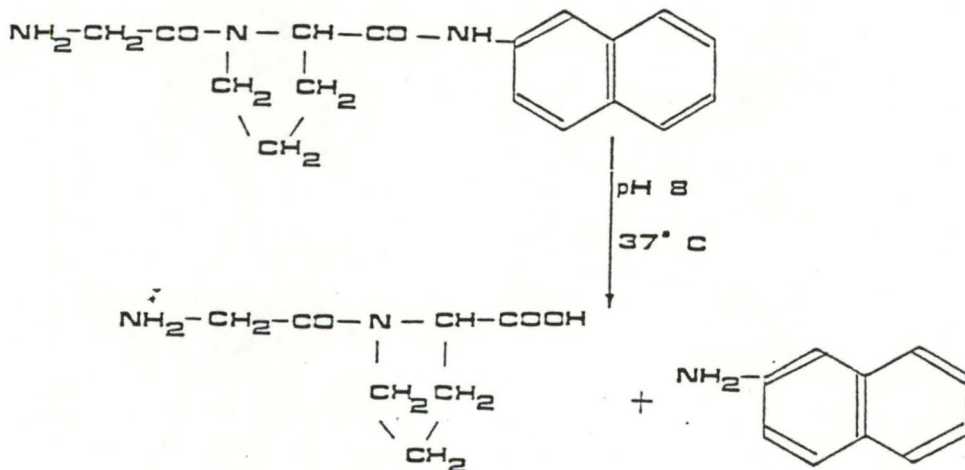
L'activité totale , après lyse membranaire au triton X 100 est calculée, en umole de phosphate inorganique libéré par minute et par gramme de foie .



coloré en jaune en milieu alcalin .

L'activité totale , après lyse membranaire au triton X 100 est calculé en umole de para nitrophenyl B D galactopyranoside hydrolysé par minute et par grammes de foie .

3 . DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV .

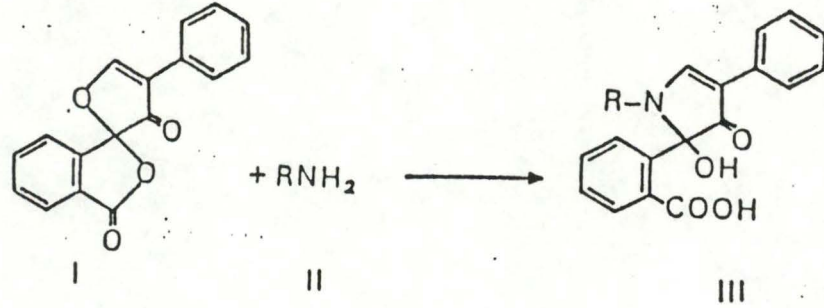


L'enzyme élimine à partir de l'extrémité NH₂ - d'un peptide deux acides aminés en rompant la liaison peptidique . Le substrat utilisé ici libère la naphtylamine fluorescente qui peut aussi être colorée en bleu sous forme de diazoïque .

4. Dosage des protéines .

Due à la présence de NYCODENZ dans les différentes fractions avant dialyse , la methode de dosage des protéines par folin s'avère être inadéquate .

Pour cela on va utiliser la methode à la fluorescamine .
Ce furam est 4 Phenyl spiro (FURAN-2 (3) 1'phthalan 3,3 dione . ce réactif agit premièrement avec les amines primaires et forme une substance intensément fluorescente .



La fluorescence est proportionnelle à la concentration en amine et est stable quelques heures . pH = 9

4. PURIFICATION DE MEMBRANES PLASMIQUES .

1. A partir d'une quantité connue de foie de rat , on prépare un homogénat (H) dans un milieu de TRIS 0,005 M et 0,15 M KCl ,pH 8 à 4°C.

On place le foie dans un petit recipient de 50 ml (SORVALL) avec du milieu dans des proportions 10 grammes de foie dans 30 ml de milieu.

On tourne pendant 7" à pleine vitesse puis on homogénise au DOUNCE loose 25 fois ; on filtre sur deux épaisseurs de gaze .

On obtient H que l'on centrifuge à 5 000 rpm pendant 15 minutes. On décante directement sans lavage . Le culot "C1"est resuspendu au Dounce Loose(10fois) avec du saccharose 1,33 afin d'obtenir la densité de "1,205" .

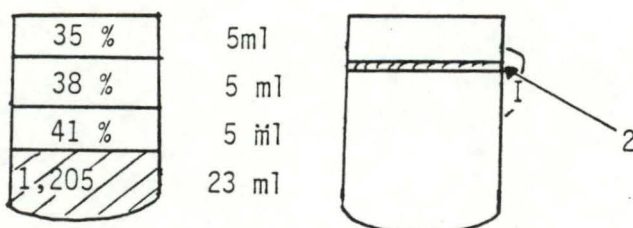
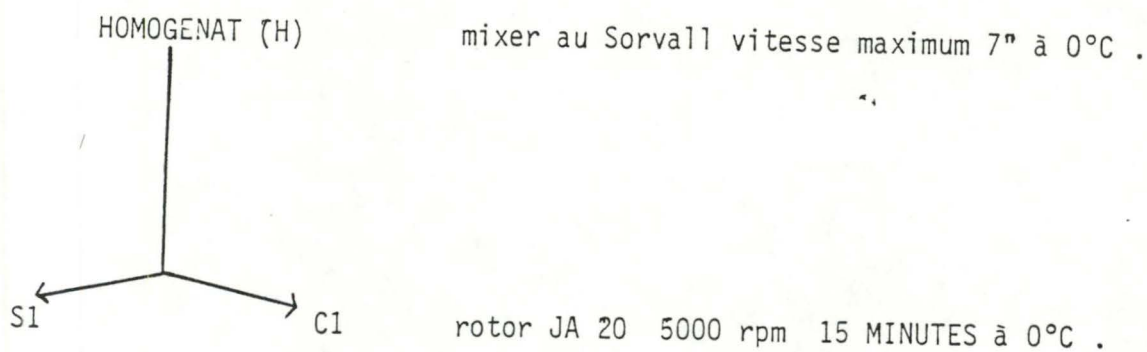
On réalise alors un gradient discontinu avec différents couches de densité décroissante à partir du fond $C_1 = 1,205 ; 1,19 ; 1,18 ; 1,16$. On centrifuge pendant une heure au rotor SW 27 à 27 000 rpm .

La fraction II contenant la membrane plasmique se retrouve à l'interface des couches de densité 1,15 et 1,18 . Le reste du gradient constitue la fraction I . La fraction II est diluée dans HEPES 1mM pH 8 et passée à l'ultraturax 15 " à vitesse forte puis centrifugé à 40 000 rpm au rotor 60 . Le culot C2 est resuspendu dans l'HEPES 1mM PH 8 dil.

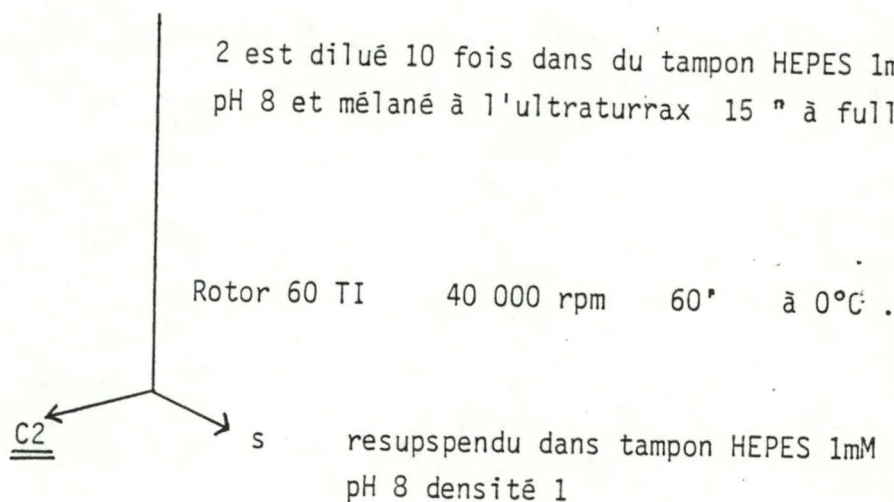
On réalise alors un deuxième gradient discontinu .C2 a une densité de 1 est déposé au dessus du gradient discontinu , les autres densités étant de 1,142 ; 1,155 ; 1,182 . On le fait tourner une nuit à 27 000 rpm dans le rotor SW 27 à 0°C . La membrane plasmique s'équilibre à l'interface des solutions de saccharose 1,142 et 1,155. On dilue la fraction 6 fois avec de l'eau glacée et on la centrifuge à 40 000 rpm pendant 45 minutes .

Les différents culots sont rassemblés et resuspendus dans le même tampon Imidazole à une dilution de 0,04 (c'est à dire les membranes plasmiques correspondant à 1 gramme de foie dans 0,04 ml).

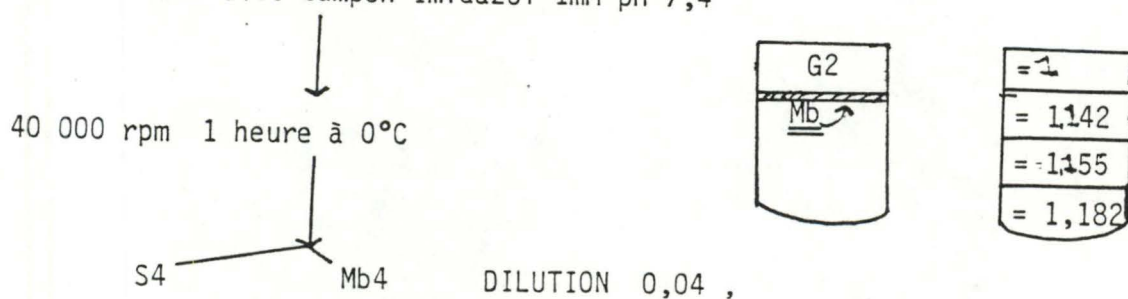
PURIFICATION DES MEMBRANES PLASMIQUES .



2 est dilué 10 fois dans du tampon HEPES 1mM pH 8 et mélangé à l'ultraturrax 15 " à full speed



dilué 6 fois avec tampon Imidazol 1mM pH 7,4



4.2 . EVALUATION DE LA PURIFICATION DE LA MEMBRANE PLASMIQUE .

Pour cela on utilise différents enzymes de référence : la 5' AMPase , la dipeptidylpeptidase IV et la phosphodièstérase alcaline pour la membrane plasmique . La monoamine oxydase comme enzyme marqueur de la membrane externe des mitochondries et la NADPH cyt C réductase comme enzyme marqueur du RER; pour calculer le degré de purification , le rendement en membrane plasmique et la bonne récupération , il faut tenir compte que :

$$H = S + C_1$$

$$C_1 = G1 + Mb_1$$

$$Mb_1 = S2 + C2$$

$$C2 = G2 + Mb2$$

$$Mb2 = S3 + Mb3$$

5 IMMUNISATION DE SOURIS BALB/C PAR UNE PREPARATION DE GOLGI PURIFIEE .

date		A	sérum	B	sérum
15-09-86	immunisation	1 2 3 4 1 2 3 4		1 2 3 4	
1-10-86	rappel			1	
10-10-86	rappel			1 2 3 4	Ia
14-10-86	fusion			1	Ib
21-11-86	rappel			2 3 4	
27-11-86	rappel	1 2 3 4 1 2 3 4			2 3 4 =B
2-12-86			1 2 3 4 1 2 3 4		
			= A		

LEGENDE :

- A : huit souris (4 mâles et 4 femelles) ont été immunisées au moyen d'une émulsion constituée pour moitié d'adjuvant de Freund complet et pour moitié d'une préparation de Golgi purifié (à 1,50 mg de protéines par ml) dans NaCl 9 % . (injection d'environ 5 ul dans les "FOOT PADS" des deux pattes postérieures) .
- Chaque rappel est effectué en injection intramusculaire au moyen d'une émulsion constituée pour moitié d'adjuvant incomplet de FREUND et pour moitié d'une préparation de Golgi à 5 mg de protéines par ml dans NaCl 9 % .
- B : 4 souris (1 2 3 4) ont été immunisées au moyen d'une émulsion constituée pour moitié d'adjuvant de FREUND complet et pour moitié d'une préparation de Golgi à 5 mg de protéines par ml dans NaCl 9 % .
- Chaque rappel est effectué en injection intramusculaire au moyen d'une émulsion constituée pour moitié d'adjuvant de FREUND incomplet et pour moitié d'une préparation de Golgi à 5mg de protéines par ml dans NaCl 9 % .

6 FUSION DES CELLULES MYELOMATEUSES ET DES CELLULES LYMPHOCYTAIRES .

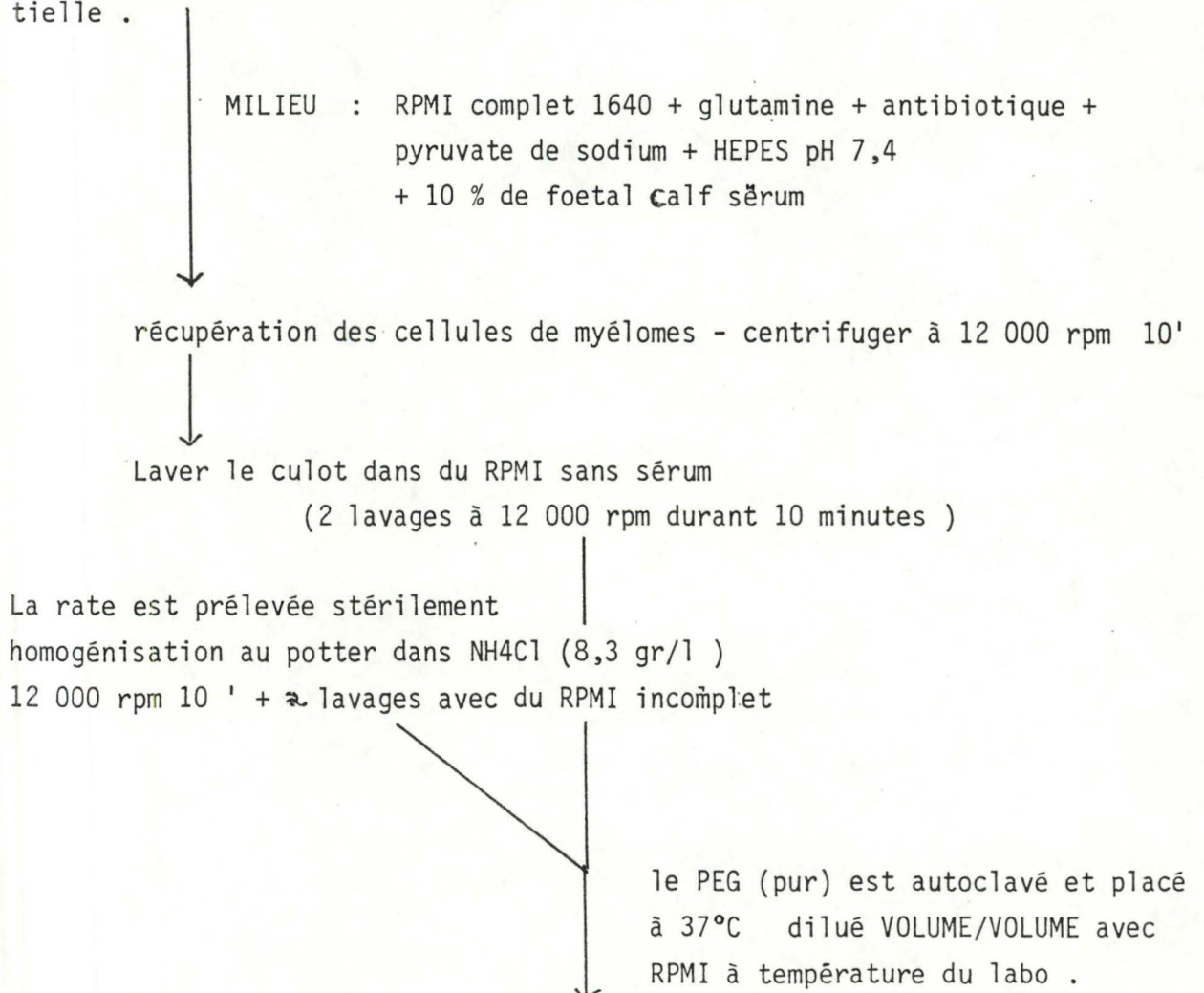
1 Principe de Base :

Le succès d'une fusion réside dans le fait que deux types de cellules (lymphocytaire et myélomateuse) mises ensemble , possèdent un haut taux de parenté entre elles . Par ce fait , la fusion s'effectue à un taux suffisamment rapide en causant des dommages minimum aux cellules .

L'agent fusionnant est le polyéthylène glycol(PEG) . SOUS l'action du PEG et salting out , l'eau qui se trouvait autour des cellules entoure les molécules de PEG et de ce fait les cellules se rapprochent et fusionnent.
NB : Les cellules myélomateuses ne produisent pas d'immunoglobulines .

2.METHODE :

Les myélomes qui vont servir à la fusion sont conservés dans de petits flacons à 37°C et 5 % CO₂ . 5 jours avant la fusion , les myélomes (SP2) sont placés en grande boîte pour leur permettre une croissance exponentielle .



La fusion se fait à partir de lymphocytes B isolés de la rate de souris immunisée .

La fusion se fait en présence de polyéthylène glycol à raison de 1 cellule myélomateuse pour 6 cellules lymphocytaires .



Centrifuger à 1 000 rpm 6 minutes

fusion par remise en suspension des culots

- 1) ajouter goutte à goutte 1 ml de PEG : secouer 90 secondes .
- 2) " " " " 0,5 ml de RPMI " "
- 3) " " " " 1 ml "
- 4) " " " " 2 ml "
- 5) " " " " 4 ml "



Le milieu de fusion est éliminé par centrifugation 6 minutes à 1000 rpm .



Les culots sont remis en suspension dans du milieu complet .



mise en culture
37°C pendant 3 heures .

7 CLONAGE ET MULTIPLICATION DU CLONE :

Approximativement 10 à 20 jours après la fusion, les hybrides grandissent en colonies dans les puits de culture. A ce stade, les cultures sont triées pour la production d'anticorps et les colonies positives sont sélectionnées pour être propagées et clonées. Il est essentiel de cloner aussitôt que possible pour s'assurer qu'une culture donnée contient seulement un seul type de cellules et qu'elle ne produit qu'un seul anticorps spécifique. Le clonage rapide permet d'éviter que des cellules ne fabriquant pas d'antigène ne se développent et prennent le dessus par rapport aux hybrides, le clonage est réalisé par dilution limite.

Cette méthode par dilution successive ne laisse statistiquement qu'une seule cellule viable par puits dans la plaque de culture :

- a) on compte le nombre de cellules dans un ml de culture.
- b) lors de la remise en suspension, on reprend 100 μ l des 1 ml et on complète avec un certain volume de RPMI jusqu'à ce que l'on ait statistiquement 10 cellules par puits ; (100 μ l)
- c) on repart de b) : on reprend 100 μ l + 900 μ l de RPMI jusqu'à ce que l'on ait alors 1 cellule par ml et par puits ;
- d) on reprend 100 μ l de c) que l'on dilue dans 900 μ l : on doit avoir 0,1 cellule par puits ;
Sept jours après le tri initial, les colonies microscopiques peuvent être visibles et on peut doser la quantité d'anticorps présents dans le surnageant.

8 DETERMINATION DU TITRE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL ET DE

L'ANTISERUM

La titration de l'anticorps monoclonal ou de l'antisérum va donner une mesure de la quantité de l'anticorps réagissant avec une quantité d'antigène. Ceci reflétant l'affinité de l'anticorps pour son antigène.

Avant de titrer l'anticorps, il est nécessaire de titrer l'antigène c'est-à-dire de trouver la quantité d'antigène à fixer sur le support pour obtenir une fixation suffisante de l'anticorps et ne pas utiliser trop d'antigène.

Etapes de la mesure du titre :

- 1er jour : on fixe une quantité connue d'antigène dilué dans PBS sur un support solide (plaque Titertek). On les laisse une nuit à 4°C ;
- 2ème jour : on lave l'excès d'antigène grâce à l'utilisation du PBS. On sature la plaque avec du PBS/BSA 3% pendant une nuit à 4°C ;
- 3ème jour : on lave à nouveau la plaque avec du PBS. On incube l'anticorps à la dilution adéquate, avec l'antigène fixé, à 37°C pendant 1 heure. On lave l'excès d'anticorps. On incube avec du Fab peroxydase 1/500 dans du PBS/BSA 3% pendant 1 heure à 37°C. On relave avec du ABTS tampon citrate H2O2 durant 15 minutes à 37°C et on lit à 405 µm. La saturation avec du BSA/PBS 3% évite l'absorption non spécifique de l'anticorps sur la plaque. Ceci en occupant les sites libres laissés par l'antigène.

. Dosage de la quantité de protéines attachées à la plaque

On y parvient par biorad protein assay. Elle nous donne une idée de la quantité d'antigènes restés accrochés après lavage au PBS.

On divise la plaque Titertek en deux ; dans la partie supérieure, on réalise 3 dilutions de l'antigène (1 par ligne) plus 1 avec PBS, dilué avec du PBS. On laisse une nuit à 0°C. On lave avec du PBS. Dans la partie inférieure de la plaque, on place l'antigène dans les mêmes dilutions et selon le même modèle que ci-dessus sans laver et en plaçant du PBS partout dans les 4 lignes supérieures.

On relave avec du Biorad assay dilué 5 fois et on lit la mesure à 595 nm

. Test Elisa

On utilise comme 2ème anticorps un anticorps anti-souris marqué à la peroxydase qui donne une couleur verte qui sera lue à 405 nm.

H₂O₂ + FAb peroxydase + ABTS donne un complexe coloré en vert.

1ère étape



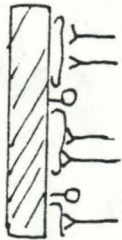
fixation du Golgi dilué dans du PBS
durant une nuit à 0°C

= Antigène

2ème étape

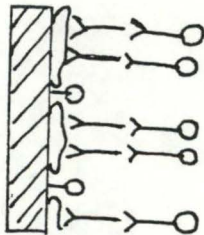
saturation des espaces libres par du
BSA/PBS 3 %

O = BSA


3ème étape

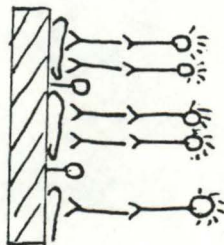
réaction de l'anticorps avec l'anti-
gène

= anticorps monoclonal

4ème étape

fixation du 2ème anticorps

Fab peroxydase dilué 1/500 

5ème étape

+ H₂O₂ (tampon citrate) ABTS

lecture de l'absorbance à 405 nm

9 Electrophorèse sur un gel de polyacrylamide

PRINCIPE :

On fait migrer sur un gel acrylamide - BIS ACRYLAMIDE, les membranes solubilisées contenant protéines à séparer ; l'adjonction de sodium dodecyl sulfate (SDS) au gel, entraîne que les protéines migrent selon leur poids moléculaire plutôt que d'après leur charge ; le SDS déroule la protéine et la charge négativement.

METHODE :

On solubilise les membranes de Golgi avec un tampon de lyse contenant : tampon phosphate 100 mM, iodoacétate 1 mM, aprotinine 0,1 mM, EDTA 5 mM, NP 40 2 %, azide 0,02 % et du PMSF 1 mM, on sonique (3 fois 20 secondes), on solubilise une nuit et le lendemain on centrifuge à 35 000 rpm durant 40 minutes.

Le surnageant est récupéré et dilué, volume à volume avec la mixture électrophorèse (glycérol, SDS, Bleu de Bromo phénol, tris 500 mM, pH 7,5, mercaptoéthanol) après quoi, on fait bouillir 10 minutes au Bain-Marie. Les membranes sont alors prêtes à être placées sur le gel.

le gel de polyacrylamide est constitué d'un mélange d'acrylamides (30 %) ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) et de N - N' méthylène bisacrylamide (8 %) ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$)

La réaction de polymérisation est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres : persulfate (H_2SO_5).

rouge + bleu

7

Le persulfate libère des radicaux d'oxygène par une catalyse basique.

La réticulation du gel dépend du % d'acrylamide - bis utilisé. Il est évident que la mobilité électrophorétique des protéines diminue si la taille des pores diminue. Plus la protéine est grosse, moins elle migrera loin dans le gel. En général, en place 80 μ l de solution contenant 80 μ g de protéines solubilisées.

On peut suivre le front de migration grâce au bleu de bromophénol. Lorsque celui-ci est suffisamment loin, on arrête l'électrophorèse, on colore, décolore et fait sécher le gel.

Lors de chaque électrophorèse, on utilise des étalons de haut poids moléculaire pour pouvoir quantifier le poids moléculaire de ces protéines.

	P M	LOG P M
myosin	200 000	5,301
B galactosidase	116 250	5,065
phosphorylase B	92 500	4,966
BSA	66 200	4,820
ovalbumine	45 000	4,652

ou de bas poids moléculaire

phosphorylase B	92 500	4,966
BSA	66 200	4,820
Ovalbumine	45 000	4,650
Anhydrase carbonique	31 000	4,490
Inhibiteur de la	21 500	4,330
trypsine		
lysosyme	14 400	4,158

10 L'immunoblotting

PRINCIPE

Le blotting est un processus de transfert de macromolécules d'un gel à une matrice immobilisée. La matrice utilisée dans notre expérience est la nitrocellulose (cellulose estérifiée avec de l'acide nitrique). Cette technique de buvardage des protéines permet d'étudier l'expression de déterminants idiotypiques grâce à des anticorps monoclonaux.

METHODE

On utilise la même technique de migration électrophorétique des protéines sur un gel de polyacrylamide SDS. Au lieu de colorer le gel au bleu de Comassie, on transfère les protéines séparées, sur filtre de nitrocellulose. La feuille de nitrocellulose placée du côté de la borne + de la cuve à Blotting ; étant donné que les protéines sont - (négatives). Après une nuit de Blotting à 20 mV et 1/2 à 50 mV, on incube le filtre de nitrocellulose dans un tampon contenant du N P 40 afin de faciliter la renaturation des déterminants idiotypiques.

On sature la feuille de nitrocellulose avec de l'albumine 1 % durant 1 heure à 37°C pour éviter toute activité non spécifique de l'anticorps, puis on lave avec du tampon Tween.

On incube alors avec l'anticorps monoclonal qui ne va reconnaître que son antigène .

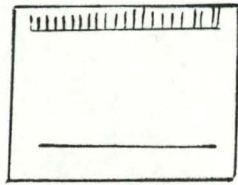
On lave au tampon Tween pour éliminer l'excès d'anticorps.

On incube avec du RAM peroxydase dilué 100 fois dans du PBS-TRIS 0,1 % - ovalbumine 3 %). On lave avec du tampon Tween. On révèle avec Dab - TRIS/ imidazol / H₂O₂.

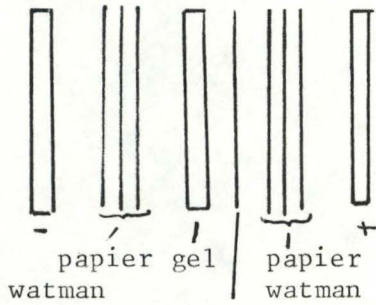
facile à reproduire

Seules apparaîtront les bandes protéiques reconnues par l'anticorps. On arrête la réaction avec H Cl à 0,1 N

1ère étape Electrophorèse

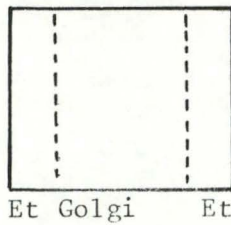


2ème étape (transfert)



chapeau au taxidémol

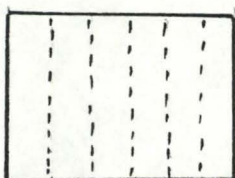
3ème étape feuille nitrocellulose



(renaturalisation des protéines ?)

une demi heure tampon NP 40

Les bandes de migration des protéines peuvent être séparées et incubées avec des anticorps monoclonaux différents.

4ème étape

saturation durant 1 heure à 37°C
ovalbumine 3 %

5ème étape

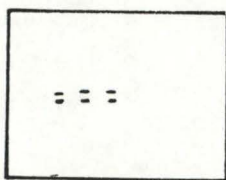
Lavage avec tampon Tween
puis incubation avec l'anticorps monoclonal dilué 10
fois dans Tris, NaCl 0,8 %, ovalbumine 3% .

6ème étape

Lavage avec tampon Tween
puis même incubation avec RAM-peroxydase dilué 100 fois

7ème étape

Lavage + DAB / tampon imidazol / H₂O₂



→ protéines reconnues par l'anticorps.

11 Microscopie en fluorescence .

Principe

un peu bref !

L'immunofluorescence , détection morphologique des antigènes , consiste à fixer sur le premier anticorps (1'anticorps monoclonal) un deuxième anticorps anti-souris fluorescent . La positivité du test est vue en microscopie à fluorescence .

Methode

Le matériel de départ consiste en des tranches de foie congelées et coupées à une épaisseur de 4 um et laissées à température ambiante .

On applique une goutte de surnageant de clones dilué dans PBS contenant 1 % de BSA . (45)

On rince au PBS . On applique le deuxième anticorps dilué 50 fois , durant 1 heure à température ambiante .
On rince au PBS . On monte les lames avec du PBS glycérine (1/9).

Parallèlement à la technique en immunofluorescence décrite ci-dessus, nous avons décelé par immunoperoxydase les antigènes correspondants aux anticorps monoclonaux. La technique est tout à fait semblable à l'exception du 2^{ème} anticorps: la Fab peroxydase (Biosys) diluée 250 fois. La présence de cet enzyme marqueur est ensuite identifiée par la méthode classique à la DAB-H₂O₂.

TABLEAU 1: purification de Golgi de foie de rat .

		E+N	N	ML	PS	Rec.	I	II	Rec.	S2	G _D	REC.
Protéines	1	341.46	31.90	23.91	40.78	96.61	25.47	0.51	108.67	0.079	0.386	90.67
	2	250.75	29.60	37.90	34.23	101.80	29.70	0.90	80.84	0.172	0.610	78.30
	3	265.31	28.64	26.40	34.18	91.00	29.25	0.208	112.00	0.071	0.139	102.00
	4	279.83	45.86	19.14	31.86	98.00	15.05	0.508	81.79	0.401	0.160	93.90
	5	239.83	25.98	31.84	35.52	93.32	31.18	1.066	101.36	0.275	0.376	61.00
	6		51.32	11.52	33.37	96.00	11.23	0.570	102.59	0.245	0.328	99.79
	7	320.98	57.20	8.00	29.20	94.00	7.77	0.300	100.16	0.05	0.128	58.00
	M	278.21	38.64	22.67	34.16	95.81	21.41	<u>0.580</u>	98.20	0.180	<u>0.300</u>	83.38
S	38.85	12.54	10.67	3.56	3.51	9.80	0.300	12.27	0.120	0.170	18.03	
Galactosyl transférase	1	9.04	28.89	53.69	7.77	86.40	22.85	29.20	96.60	10.4	22.39	112.00
	2	11.40	26.19	57.52	8.43	92.31	17.43	32.31	85.70	1.04	33.65	107.00
	3	14.66	31.99	36.60	4.23	72.90	35.31	10.50	125.10	0.00	9.2	87.00
	4	14.40	20.36	59.46	4.96	84.79	15.27	35.06	84.65	3.36	12.59	59.00
	5	10.48	14.48	61.52	11.24	87.00	14.98	44.01	95.89	2.69	30.27	74.83
	6	14.78	36.34	46.75	1.89	84.99	18.30	31.00	105.40	0.00	22.59	73.00
	7	13.19	51.29	34.16	3.85	89.00	9.28	23.22	95.00	0.00	15.23	65.60
	M	12.56	29.93	49.95	6.05	85.34	19.06	<u>29.32</u>	98.33	2.350	<u>22.22</u>	86.57
S	2.27	11.88	11.05	3.21	6.06	8.29	10.42	13.74	4.070	9.09	19.00	
Ampase	1	4.15	62.16	32.33	47.21	99.00	23.39	1.45	76.00	0.00	0.216	14.8
	2	4.27	58.53	22.60	4.08	84.68	36.28	0.83	89.00	0.00	1.50	35.60
	3	2.96	58.98	41.60	6.90	107.57	17.22	5.75	101.60	0.00	0.342	41.00
	4	4.38	47.67	43.56	1.06	98.90	51.98	2.15	124.25	0.00	0.670	31.60
	5	1.255	17.17	89.74	5.21	112.00	86.55	9.45	101.00	0.58	2.44	69.00
	7	4.07	71.36	12.89	7.88	92.00	5.00	3.36	65.00	4.48	1.53	89.98
	M	3.23	52.64	40.45	12.05	95.74	36.73	<u>3.83</u>	92.80	0.84	<u>1.11</u>	46.99
	S	1.33	18.96	26.77	17.38	14.74	29.25	3.63	20.99	1.79	0.95	27.46
Phospho- diestérase alcaline	1	154.95	48.98	54.00	10.20	115.32	44.80	1.28	84.10	0.03	1.16	92.70
	2	65.99	18.07	102.87	12.44	112.97	93.00	7.78	97.00	0.18	7.21	95.00
	3	176.69	39.67	43.09	4.69	87.50	46.49	0.58	109.20	0.00	0.94	93.40
	4	218.72	40.30	558.00	5.11	96.00	39.90	1.00	81.00	0.233	0.65	88.00
	5	144.52	30.23	69.66	8.24	108.00	76.34	1.87	112.00	0.450	2.11	137.00
	6	136.52	55.63	50.00	4.24	109.00	55.63	1.48	114.00	0.058	1.60	111.00
	7	243.18	76.80	15.26	3.57	95.64	16.00	0.316	111.00	0.024	0.346	117.00
	M	166.88	44.24	54.64	6.90	103.50	52.88	<u>2.04</u>	101.18	0.130	<u>2.00</u>	104.87
S	63.66	18.84	26.70	3.4	10.43	25.27	2.58	13.89	0.160	2.37	17.69	
NADPH cyt. C	1	0.515	23.24	27.91	9.79	60.94			162.80	0.0074	0.032	80.00
	2	0.648	54.05	56.42	14.82	121.75	66.145	2.55	121.75	0.174	1.09	49.00
	3	0.919	29.07	43.62	14.43	87.80	63.88	0.457	104.60	0.122	0.213	103.00
	4	0.66	59.06	32.83	2.06	93.95	32.76	1.12	103.24	0.780	0.300	95.00
	5	0.60	20.28	40.90	26.38	87.57	32.58	0.42	84.70	0.390	0.260	164.00
	M	0.67	37.14	40.34	13.50	90.40	48.16	<u>0.92</u>	115.42	0.290	<u>0.38</u>	98.20
S	0.15	18.09	10.96	8.85	21.67	16.26	0.99	29.56	0.30	0.41	42.17	

Légende : - les valeurs de E+N sont des valeurs absolues .Les proteines sont exprimées en mg/gr de foie et les activités enzymatique en umole/min/gr de foie .
- Les pourcentages présents dans chaque fraction et la récupération par rapport à la fraction précédente se trouvent dans les colonnes N ,ML ,PS I , II , S2 et G .

$$H = E + N = ML+N+PS .$$

$$ML = I + II .$$

$$II = S2 + G .$$

M = moyenne

S = écart type

RESULTATS .

1 . PURIFICATION DE MEMBRANES DE FOIE DE RAT .

1.1. PURIFICATION DU GOLGI DE FOIE DE RAT .(tableaux 1 et 1 bis)

La méthode de purification que nous avons adoptée est celle de WIBO et al (51) . Celle-ci diffère des autres techniques décrites en ce sens que les foies proviennent de rats non traités . Dans la méthode d'EHRENREICH (52) ,souvent employée , les rats sont traités à l'éthanol ce qui provoque une surcharge en lipoprotéines . Nous avons voulu éviter précisément cette surcharge puisque nous nous intéressons aux membranes de Golgi et non à leur contenu .

Au point de vue biochimique , les préparations de Golgi sont caractérisées par la présence de Galactosyltransférase . L'activité spécifique de cet enzyme est augmentée d'un facteur 70 dans la fraction G_D par rapport à l'homogénat . Le rendement dans la fraction G_D est de l'ordre de 22 % . Cette fraction est nettement représentative de l'appareil de Golgi dans son ensemble.

En effet une telle fraction G_D examinée au microscope électronique (photos 1 et 2) est constituée de dictyosomes dont l'architecture en saccules est bien conservée . Quoique la Galactosyltransférase soit localisée dans la partie TRANS du Golgi , on peut admettre par conséquent que tous les éléments du Golgi sont présents dans nos préparations . Lors du lavage de la fraction II avec du saccharose 0,25 M , la quantité de protéines passe de 0,58 % à 0,30 % , tandis que l'activité de la Galactosyltransférase passe de 29 à 22 % . Par conséquent les activités spécifiques relatives sont respectivement de $29/0,58=50$ et $22/0,128=73,3$. Il est donc probable que ce lavage a éliminé des contaminants .

Le dosage des enzymes marqueurs des autres membranes subcellulaires devrait nous permettre de déterminer quels sont ces contaminants . La 5' Nucléotidase ou 5'AMPase et la phosphodiésterase alcaline sont des marqueurs ubiquistes de la membrane plasmique du foie de rat c'est à dire présents sur les différents types cellulaires et uniformément répartis sur toute la surface de l'hépatocyte . Ils sont présents à raison de 3,83 % et 1,1 % pour la 5'AMPase et 2,0 et 2,0 pour la phosphodiésterase alcaline dans les fractions II et G_D .

On peut estimer la contamination de nos préparations par les fragments de membrane plasmique sur base d'une activité spécifique relative maximale de la 5'Nucléotidase de 70 (tableau 2) Sachant que 100% de la 5'Nucleotidase représente 1,43 % des protéines totales du foie de rat ou 3,82 mg (voir tableau) on en déduit par conséquent que $3,83 \% - 1,11 \% = 2,71 \%$ de 5'AMPase éliminée équivaut à 0,039 % des protéines de membranes plasmiques éliminées au cours du lavage II - G_D .

TABLEAU 2 :

Fraction subcellulaire	enzyme de référence	ASR maximale	référence	(1)	(2)
membrane plasmique	5'AMPase	70	(40)	1,43	3,82
réticulum endoplasmique	NADPH cyt C réductase	6	(40)	16,70	45,50
membrane mitochondriale externe	monoamine oxydase	125	(41)	0,80	2,20
Golgi	Galactosyl transférase	100	(40)	1,00	2,73
lysosomes	phosphatase acide	80	(41)	1,25	3,41

(1) protéines de foie de rat y associés en % de protéines totales du foie .

(2) Protéines de foie de rat y associés en mg sur base de 273 mg de protéines/gr de foie .

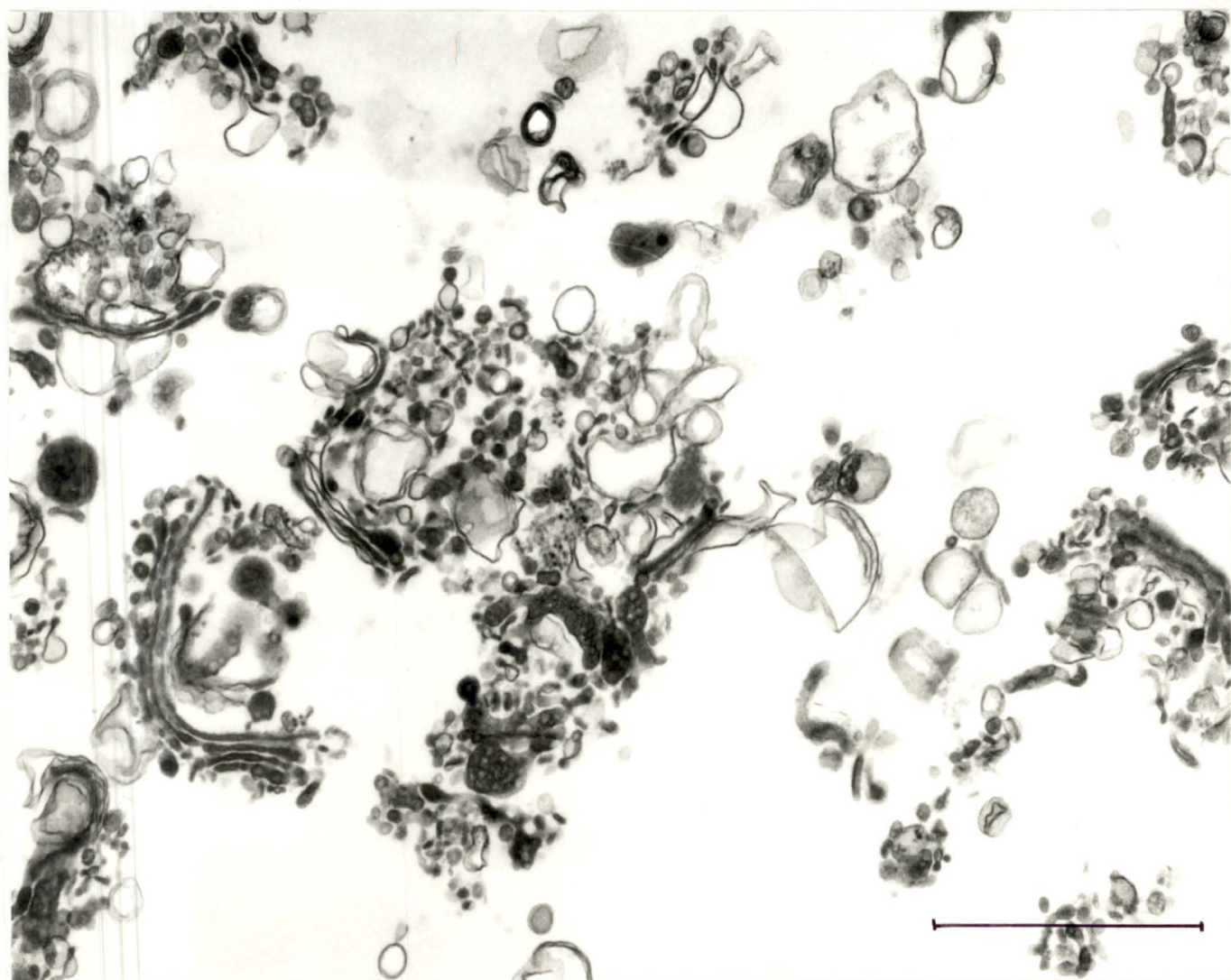
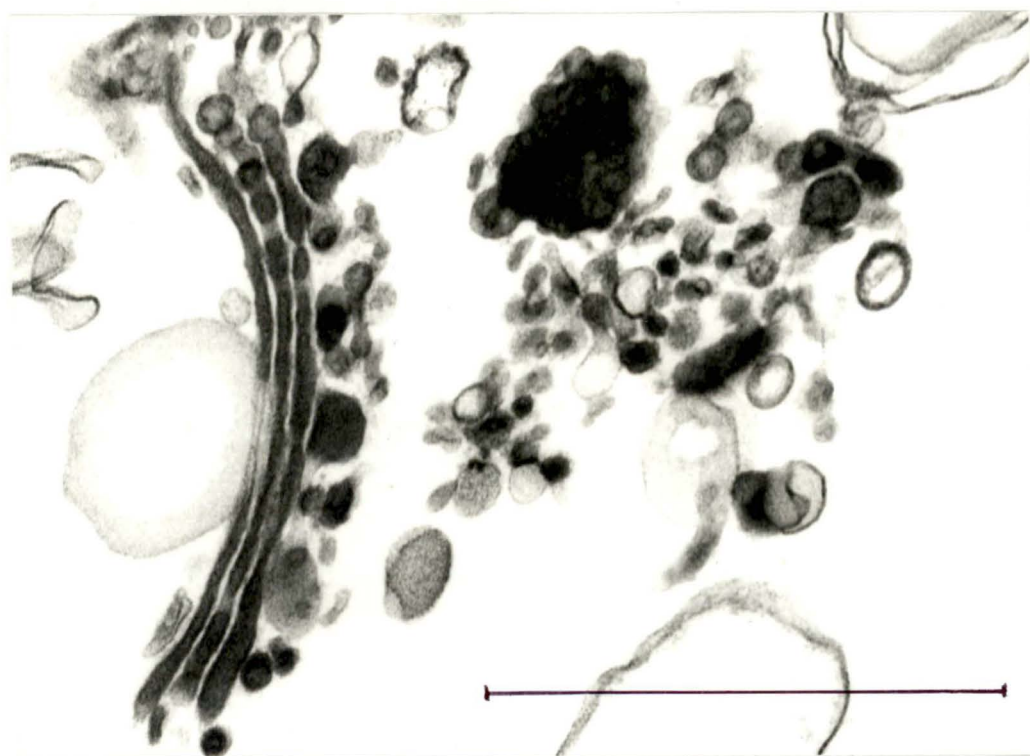
Sur base de la phosphodiesterase alcaline on soustrait 0 % de cet enzyme et donc 0 % de protéines au cours du dernier lavage . En moyenne 0,02% de fragments de protéines de membranes plasmiques ont été éliminés au cours du dernier lavage .

Par contre le contrôle de la NADPH cyt C réductase (réticulum endoplasmique) montre que l'on passe de 0,92 % dans II à 0,38 % dans G_D . Or l'ASR maximale de la NADPH cyt C réductase est d'environ de 6 . En effectuant un calcul semblable à celui qui a été fait pour la 5'Nucléotidase on arrive à la conclusion que 0,09 % de protéines correspondantes ont été éliminées par le lavage . Par conséquent le contaminant majeur éliminé au cours du dernier lavage est le réticulum endoplasmique . Les protéines de Golgi purifiées (fraction G_D : 0,3 %) se répartissent de la façon suivante : 0,022 % sont attribuables à la membrane plasmique , 0,063 % au réticulum endoplasmique et 0,215 % au Golgi . Ayant en vue que ces estimations sont approximatives , on en déduit que 72 % des protéines environ de la préparation appartiennent au Golgi . HOWELL et al a d'autre part suggéré que la 5'Nucléotidase pourrait être un enzyme intégré dans l'appareil de Golgi , les marqueurs enzymatiques n'étant pas des marqueurs absolus . Il n'est donc pas certain que l'activité des marqueurs de la membrane plasmique détectée soit due à des fragments de la membrane plasmique . (47)

Enfin il est à envisager que la fraction G_D soit constituée non seulement de membrane de Golgi mais aussi du contenu de celui-ci . Le rôle principal de l'appareil de Golgi dans le foie au point de vue de l'exportation est de fournir des protéines plasmatiques et des lipoprotéines . Il est probable qu'avec la méthode utilisée (lavage au saccharose 0,25 M) le contenu de sécrétion du Golgi n'ait pas été éliminé . On doit donc s'attendre à y retrouver au point de vue protéique de l'albumine et des apoprotéines appartenant aux VLDL et HDL (48) . Nous y reviendrons plus loin

Il faut noter que c'est une fraction G_i lavée au NaCl isotonique qui a été utilisée pour l'immunisation .(voir matériel et méthodes)

En gros cette fraction correspond à la fraction G_D . On ne peut pas exclure toutefois que le lavage au NaCl 9 % ait désorbé des protéines fixées sur la préparation .



MICROSCOPIE ELECTRONIQUE: GOLGI PURIFIE FRACTION II
photos 1 et 2 . (Le trait représente 1 μ m.)

TABLEAU 3 : Evaluation de la purification de la membrane plasmique .

	H	S1	C1	REC	G1	MB1	REC	S2	C2	REC	G2	MB2	REC	S3	MB3	REC
PROTEINES	240.40	37.81	61.00	98.80	58.33	1.071	97.37	3.82	0.82	113.21	0.39	0.21	73.78	0.072	<u>0.16</u>	74.13
AMPase	2.36	21.84	83.44	105.3	84.74	21.28	127.0	0.69	22.34	108.20	7.46	11.42	84.60	3.060	<u>11.34</u>	102.03
Peptidase IV	/	15.13	95.71	95.72	70.91	34.00	109.6	19.20	17.62	108.40	5.60	11.33	96.20	1.120	<u>9.75</u>	86.00
PHOSPHATASE alcaline	9.85	10.68	106.27	117.0	80.72	17.45	92.38	2.073	16.52	106.55	9.23	7.53	101.52	0.330	<u>6.36</u>	89.00
NADPH cyt C reductase	0.52	52.56	48.52	101.1	48.43	1.45	102.1	0.630	1.23	85.13	0.93	0.37	105.06	0.123	<u>0.27</u>	107.47
monoamine oxydase	/	8.39	107.57	116.6	134.0	0.72	125	/	0.74	102.0	0.43	0.38	109.70	0.08	<u>1.34</u>	66.00

Légende : les valeurs de H sont des valeurs absolues , les protéines sont exprimées en mg/gr de foie et les activités enzymatiques en umole/min/gr de foie .

les pourcentages dans chaque fraction et la récupération par rapport à la fraction précédente se trouve dans la colonne S1 ,C1 , G1, MB1, S2, C2, G2, MB2, S3, MB3 .

$$H=S1+C1 .$$

$$C1=G1 + MB1$$

$$MB1 = S2 + C2 .$$

$$C2 = G2 + MB2 .$$

$$MB2 = S3 + MB3 .$$

1.2. PURIFICATION DE MEMBRANE PLASMIQUE .(tableaux 3 et 3 bis)

Au cours de la caractérisation des anticorps obtenus , nous avons testé ceux-ci vis à vis de membrane plasmique de foie de rat .

En effet la biogenèse des protéines de la membrane plasmique se fait via le Golgi ; c'est là que les unités polysaccharidiques fixées aux polypeptides sont spécifiquement modifiées et celles-ci constituent l'étiquetage des glycoprotéines destinées aux différents compartiments cellulaires .

La méthode utilisée est celle de BROWN et al (1976) . Cette méthode offre l'avantage de permettre l'obtention de membrane plasmique de foie de rat représentée dans son ensemble .

Les enzymes marqueurs qui nous ont permis de suivre la purification des fragments de membrane plasmique sont la 5'Nucléotidase (enzyme ubiquiste) et la phosphatase alcaline présente surtout au pôle biliaire .La sous localisation de la peptidase IV n'est pas connue dans le foie de rat .

Le rendement en membrane plasmique déterminé par la 5'Nucléotidase et la peptidase IV n'est pas élevé:de l'ordre de 10 %;par contre la purification est respectivement de 70 et 60 pour ces enzymes . Ceci correspond aux meilleures purifications décrites par la littérature .D'autre part , le rendement en phosphatase alcaline est nettement moindre de même que la purification de cet enzyme (40) .C'est le résultat auquel on doit s'attendre sachant que la surface membranaire présente au pôle biliaire ne représente que quelques % de la membrane plasmique totale . Les résultats obtenus pour la dipeptidase IV sont analogues à ceux que nous remarquons pour la 5'Nucléotidase . Il est donc probable que cette protéase est uniformément répartie sur la membrane plasmique.

Les contaminants que nous avons détectés en mesurant les enzymes marqueurs sont le réticulum endoplasmique (NADPH cyt C réductase) et la membrane externe des mitochondries (moncamine oxydase) .

Se basant sur la méthode de calcul précédemment expliquée on peut estimer que sur 0,16 % , 0,045 % des protéines de cette fraction appartiennent au réticulum endoplasmique et 0,01 % à la membrane externe des mitochondries .

Il faut noter que ces calculs sont indicatifs , Mais permettent cependant d'estimer que environ 70 % des protéines de la fraction sont propres à la membrane plasmique .

TABLEAU 4 : Evaluation de la purification de la membrane lysosomale

	H	NM	L	PS	REC	1	2	REC	S1	S2	S3	S4	MB	REC
protéines	372.88	40.22	1.59	57.85	99.68	1.38	<u>0.17</u>	97.65	0.052	0.0094	0.0047	0.026	0.031	75.45
PHOSPHATASE acide	/	40.31	42.54	26.96	109.0	25.09	<u>12.97</u>	89.47	4.26	0.6200	0.3300	1.92	0.59	59.58
β GALACTOSIDASE	/	48.64	15.56	7.95	72.15	6.80	<u>5.96</u>	82.00	2.28	1.8400	0.0800	0.0007	0.146	73.00
PEPTIDASE IV	/	28.90	3.53	30.20	62.65	3.14	<u>1.45</u>	109.00	0.69	0.0820	0.0360	0.0450	0.330	82.00
NADPH cyt C reductase	0.54	12.32	2.21	79.24	93.70	1.39	<u>0.09</u>	67.00	0.023	0.0110	0.0160	0.0160	0.022	96.90
GALACTOSYL TRANSFERASE	3.66	4.72	0.21	80.90	85.00	0.00	<u>0.010</u>	/	0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.298	/

Légende : Les valeurs de H sont des valeurs absolues .Les protéines sont exprimées en mg/gr de foie et les activités enzymatiques en umole/min/gr de foie .

le % présent dans chaque fraction et la récupération par rapport à la fraction précédente se trouvent dans les colonnes NM , L ,PS , 1 , 2 , S1 , S2 ,S3 , S4 ,MB .

$$H = NM + L + PS .$$

$$L = 1+2 .$$

$$2 = C1 + S1 .$$

$$C1 = C2 + S2 .$$

$$C2 = C3 + S3 .$$

$$C3 = C4 + S4 .$$

$$C4 = MB .$$

1.3. PURIFICATION DE LA MEMBRANE LYSOSOMALE .(tableaux 4 et 4 bis)

Nous avons voulu étudier aussi la relation éventuelle existant entre les antigènes correspondant aux hybridomes et clones obtenus et les protéines de la membrane lysosomale .

La technique de purification de Lysosomes qui a été suivie est celle de WATTIAUX et al (41) . En effet cette technique permet d'isoler des lysosomes de foie de rat hautement purifiés et ce à partir de foie normal . Ici encore c'est la relation existant , entre l'appareil de Golgi et l'endocytose et la biogenèse des protéines de la membrane lysosomale qui ont dicté cette démarche .

Les résultats que nous obtenons , mettent en évidence un rendement en enzymes lysosomiaux dans la fraction 2 de 13 % pour la phosphatase acide et 6% pour la β Galactosidase .D'autre part la purification ou ASR est de 76 et 35 respectivement pour l'un et l'autre marqueur . Une différence appréciable apparait entre les deux enzymes . Il faut remarquer que WATTIAUX et al décrivent une différence entre ces deux marqueurs mais moindre (les ASR sont de 80 pour la Phosphatase acide et 64 pour la bêta Galactosidase(41) On peut supposer que tous les lysosomes du foie de rat , qu'ils proviennent des hépatocytes , des cellules de Kupffer, des cellules endothéliales ne sont pas équipés de la même manière en hydrolases , et ne sont pas représentés de la même façon dans l'échantillon que nous avons isolé .

La fraction 2 (Lysosomes totaux) a été traitée ensuite par hypotonie et désalage : ceci ressort dans l'analyse de la fraction Mb qui ne contient donc que peu de suc lysosomal (hydrolase acide) et essentiellement les membranes qui en dérivent .

Il n'existe à ce jour aucun marqueur propre à la membrane des lysosomes . Les commentaires ne peuvent donc que se rapporter à la fraction II :lysosomes totaux ; les protéines que l'on trouve dans cette fraction (0,17 %) se répartissent en 0,021 % de la membrane plasmique , 0,015 % de réticulum endoplasmique et 0,00012 % de Golgi ; ce qui donne un bilan de 0,134 % de protéines lysosomales . Environ 80 % des protéines retrouvées dans la fraction II appartiennent aux lysosomes . Il faut remarquer que la mesure de la Galactosyl transférase dans la fraction II est sous estimée : le Nycodenz ,milieu du gradient inhibe l'enzyme .

Activité spécifique relative .

1 . Activité spécifique relative au niveau du Golgi . (tableau 1 bis)

Golgi	Galactosyl transférase	5' AMPase	Phosphatase alcaline	NADPH cyt C réductase
1	58.0	0.56	3.0	0.083
2	55.2	2.45	11.8	1.780
3	66.2	2.46	6.7	1.530
4	78.7	4.18	6.25	1.870
5	80.5	6.48	5.60	0.690
6	68.8	/	4.80	
7	120.8	11.95	2.70	
M	<u>75.46</u>	4.68	5.58	1.19
S	22.12	4.08	3.04	0.77

2 . Activité spécifique relative au niveau de la membrane plasmique .

	ASR (tableau 3 bis)
AMPase	<u>70.87</u>
Peptidase IV	<u>60.93</u>
Phosphatase alcaline	<u>39.75</u>
NADPH cyt C reductase	1.68
Mono amine oxydase	8.37

3 . Activité spécifique relative au niveau des lysosomes . (Tableau 4 bis)

	ASR
Phosphatase acide	<u>76.29</u>
β galactosidase	<u>35.06</u>
PEPTIDASE	8.50
NADPH cyt C reductase	0.53
Galactosyl transférase	0.06

Fig 9 et
tableau 5

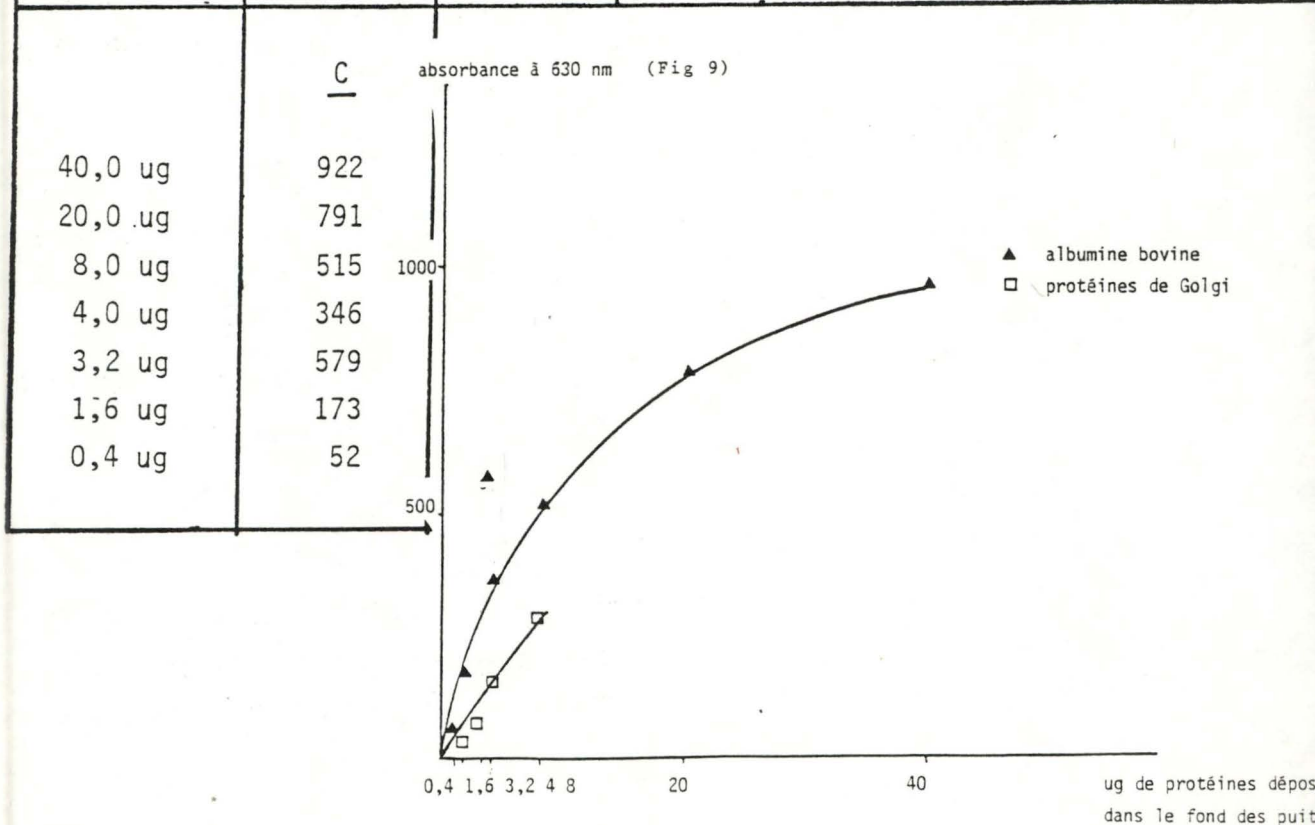
MESURE DE L'ADSORPTION DE PROTEINES PROVENANT DE MEMBRANE DE
GOLGI SUR LE FOND DES PUIXS TITERTK (96 trous) .

0,579

Le dosage est effectué par le BIORAD PROTEIN ASSAY .

En A et B ont été déposés dans le fond des puits 50 ul d'une préparatio
de Golgi à 100 , 50 , 25 , 10 et 0 ug/ml soit respectivement 5 ; 2,50 ;1,25 et
0 ugde protéines de Golgi . Le dosage a été effectué tel quel en A (ni adsorptio
, ni lavage) ;par contre en B l'adsorption des protéines s'est faite pendant une
nuit à 0°C ; les plaques ont été lavées 5 fois au PBS avant de doser les protéin
;en C étalonnage :50 ul d'une solution d'albumine bovine contenant les quantités
marqués ont été déposés dans les puits (ni adsorption , ni lavage).A chaque pui
(A,B,C) ont été ajoutés 20 ul de réactif BIORAD et le volume total à chaque fois
été ajusté à 120 ul avec PBS .

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>%de protéines fixées sur le fond des puits</u>	
5 ug	184	22	11,96%	0.60 ug
2,5 ug	119	22	19,00%	0.47 ug
1,25ug	46	42	91,00%	1.13 ug
0,5 ug	14	15	107,00%	0.5 ug
0,0 ug	0	0	0,00%	



2. OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX .

2.1. IMMUNISATION DE SOURIS BALB/C AU MOYEN DE GOLGI PURIFIE .

Nous avons immunisé 12 souris mâles et femelles BALB/C suivant le plan établi au tableau 6 par voie dermique .

Un certain nombre de souris ont reçu une dose forte (B) de membranes de Golgi émulsionnées avec l'adjuvant de FREUND complet , une deuxième série a reçu une dose plus faible de la même préparation de Golgi conjointement avec de l'adjuvant de FREUND complet (série A) .

Dans la série B , la souris 1 a reçu 2 rappels (adjuvant incomplet) 15 et 25 jours après la première immunisation . Du sérum a été prélevé au 25e et 30e jour . Le 30e jour la rate a été prélevée et les lymphocytes isolés ont servi à la fusion . Les souris 2 , 3 , 4 (série B) ont reçu un rappel (adjuvant incomplet) 25 et 66 jours après la première immunisation , le polysérum est obtenu au 72e jour (appelé B) .

Les souris de la série A ont reçu un rappel 72 jours après l'immunisation primaire et le polysérum est obtenu au 77e jour . (sérum A)

2.2. CONTROLE DES ANTISERUMS .

Dans un premier temps nous avons contrôlé les conditions optimales à observer pour réaliser le test ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay)

- Mesure de la quantité de protéines adsorbées dans le fond des puits des plaques Titertek .

Nous nous sommes en premier lieu assuré que les membranes de Golgi comme telles étaient effectivement susceptibles de s'adsorber sur le plastique PVC constituant les plaques Titertek . Les liaisons qui s'établissent entre le plastique et les protéines sont de types hydrophobe (49) par conséquent elles dépendent de la nature des protéines — Lipides adsorbés .

Après 24 heures , les puits sont lavés au PBS et la mesure colorimétrique des protéines accrochées est réalisée au moyen du réactif coomassie brillant blue G 250 (BIORAD) . (tableau 5 colonne B) . Cette technique de mesure est sensible mais peu précise ; cependant c'est la seule compatible avec une détermination de protéines dans les puits Titertek .

A titre de contrôle , nous avons aussi mesuré l'absorbance due à une quantité identique de membranes de Golgi déposées dans le fond des puits mais sans lavage (tableau 5 colonne A)

Les résultats sont peu précis mais il semble cependant qu'il est inutile de déposer plus de 1,25 à 2,5 ug de protéines de Golgi dans le fond des puits , l'excédent ne s'adsorbe pas . Ceci est en accord avec les valeurs de la littérature (adsorption d'Ig G)

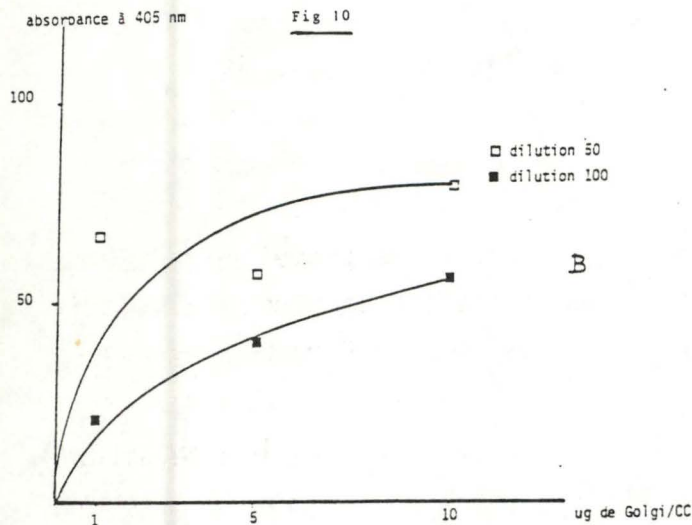
*MM 6
ne l'avis pas
de faire*

Fig 10 Test ELISA sur l'antiserum de souris Ia (voir tableau 5) .

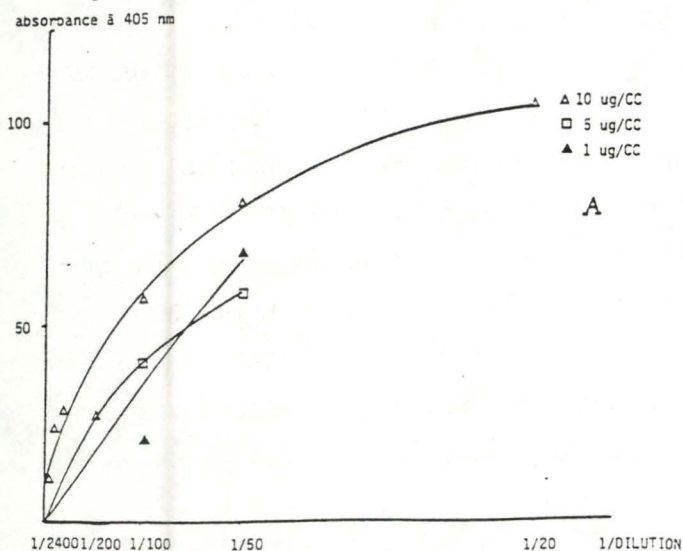
En A : l'absorbance à 405 nm est exprimée en fonction de l'inverse de la dilution de l'antiserum . 50 ul de 3 concentrations différentes de la préparation de Golgi ont été adsorbés sur le fond de plaques Titereck .10 ug/ml , 5 et 1ug/ml .

En B : l'absorbance à 405 nm est exprimée en fonction de la concentration en protéines dans la préparation de Golgi adsorbée sur le fond des puits . L'antiserum est soit à la dilution de 50 soit à la dilution de 100 . (résultat repris de la figure 1A)

Les points représentent la moyenne de 3 mesures . L'antiserum Ia provient d'une seule souris immunisée suivant le protocole du tableau



Pour une quantité de 10 ug/CC			
DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	176	73	103
50	130	51	79
100	103	47	56
200	67	40	27
600	59	31	28
1200	52	28	24
2400	38	29	9



Pour une quantité de 5 ug/CC .			
DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
50	85	28	57
100	68	28	40

Pour une quantité de 1 ug/CC .			
DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
50	96	29	67
100	77	56	21

A titre de référence nous avons effectué la lecture due à des quantités semblables d'albumine bovine déposée (sans lavage) dans le fond des puits . (tableau colonne C) . A quantité égale , l'albumine bovine donne une réponse plus élevée que les protéines de Golgi . Se référant aux données fournies par le fabricant (manuel d'instruction BIORAD page 4) , il ressort que la sérum albumine dans un test de ce genre donne une valeur plus élevée que la moyenne des 23 protéines testées (21,1 : 9,2) . Par contre dans un dosage de protéines par le biuret la moyenne des 23 protéines testées donne 8,8 et la BSA 9,7 ; par Lowry 9,5 et 8,4 (les valeurs d'absorbance sont rapportées à une solution à 10 mg/ml) .

Les absorbances en A et C ne reflètent donc pas en valeur absolue les quantités de protéines présentes .

- Influence sur le test ELISA de la quantité de protéines déposées sur le fond des puits .

Nous avons déposé dans une première expérience (Fig 10) 50 ul de membranes de Golgi à 1 ug/ml , à 5 ug/ml et 10 ug/ml , soit respectivement 0,05 , 0,25 et 0,5 ug de protéines . Pour chaque concentration nous avons établi une courbe de titration (Fig 10) utilisant à cet effet le sérum Ia (tableau 6) ; pour les concentrations les plus faibles de protéines golgiennes seules deux dilutions ont été évaluées . On constate que la réponse de l'activité peroxydasique du deuxième anticorps augmente de 1 à 10 ug/CC .(Fig 10)

Dans une deuxième expérience, nous avons tenté d'étendre ces premiers résultats en augmentant la concentration en protéines de la préparation de Golgi déposée dans le fond des puits . Nous avons déposé 50 ul de préparation de Golgi à 1 , 5 , 10 , 50 ,100 et 200 ug de protéines par ml soit 0,05, 0,025 , 0,5 , 2,5 ,5 et 10 ug de protéines (Fig 11 et Fig 12) . En examinant les graphiques représentés en fig 11 A et fig 12 A on constate que la réponse , traduite par l'oxydation du ABTS, augmente en fonction de la quantité de protéines préadsorbées . Il ressort d'autre part que le point de saturation de l'antigène en anticorps augmente en fonction de la quantité de protéines préadsorbées . (En effet alors que l'absorbance pour 1 ug/ml à 10 ug/ml est maximale à une dilution de 50 ,elle ne l'est probablement pas pour 50 ug/ml et 100 ug/ml et certainement pas pour 200 ug/ml). Il faut en conclure que les résultats obtenus par le dosage de protéines est tout à fait approximatif et ne traduit pas la réalité .

absorbance à 405 nm

Figure 11 :

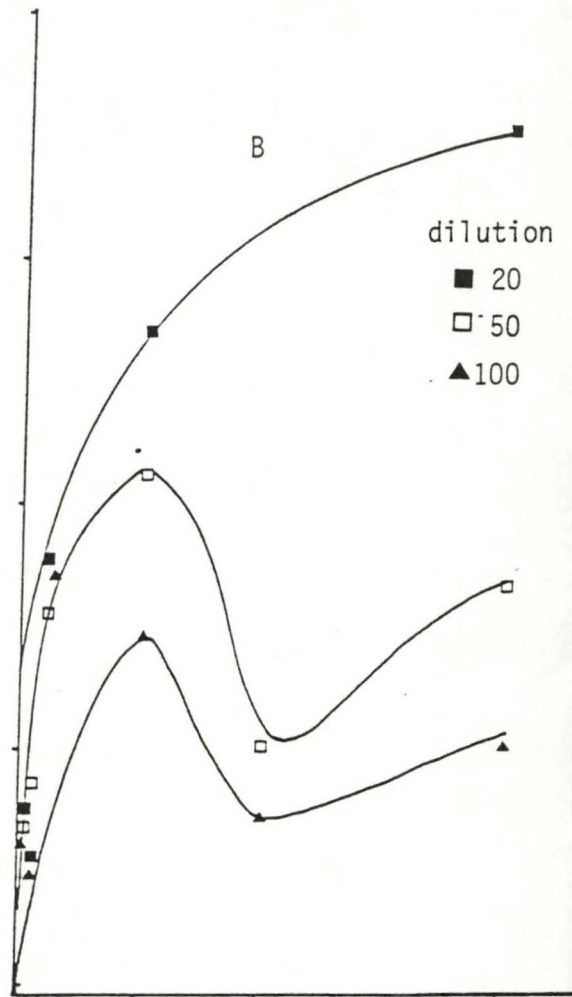
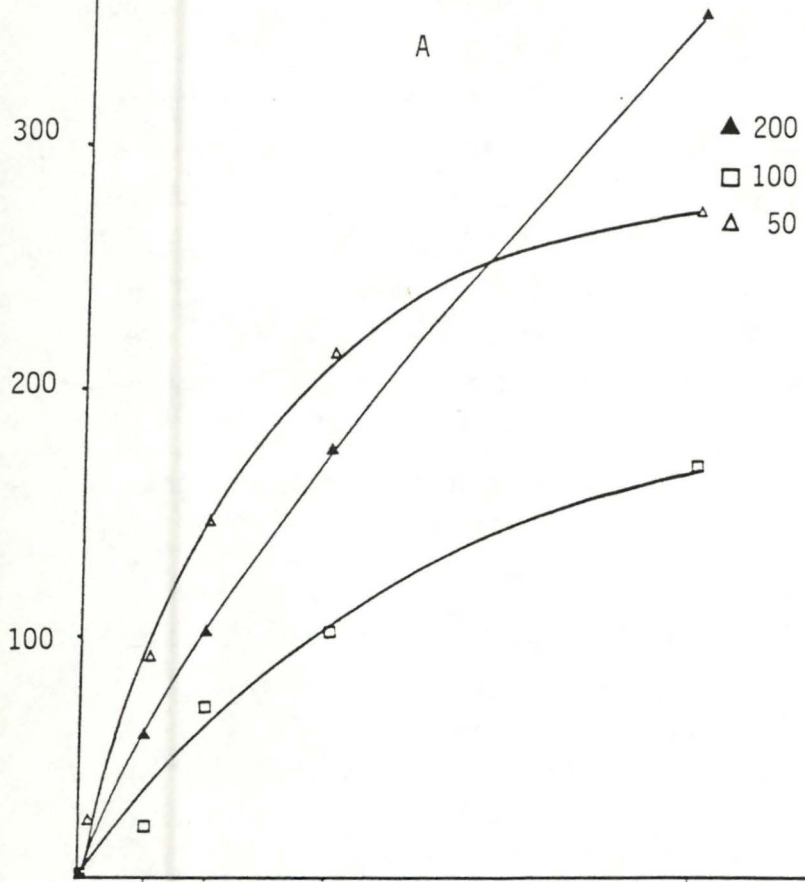
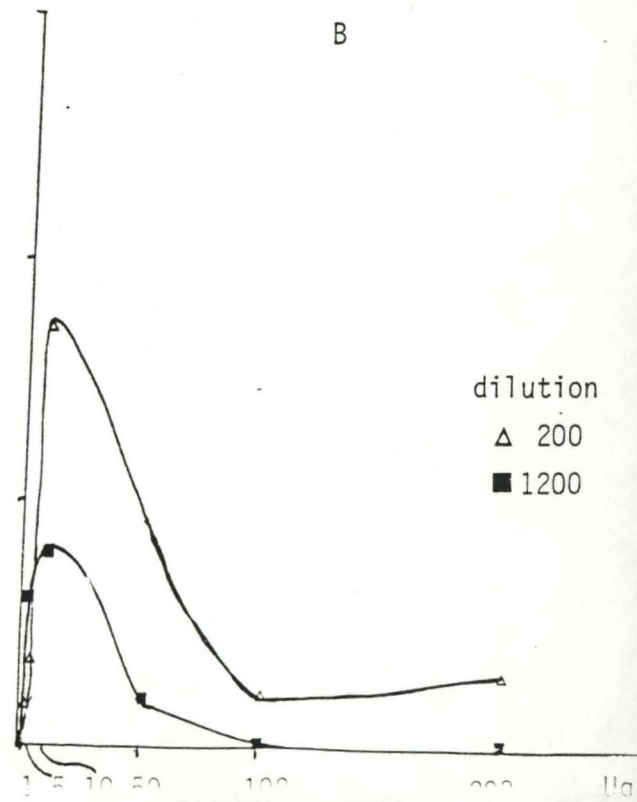
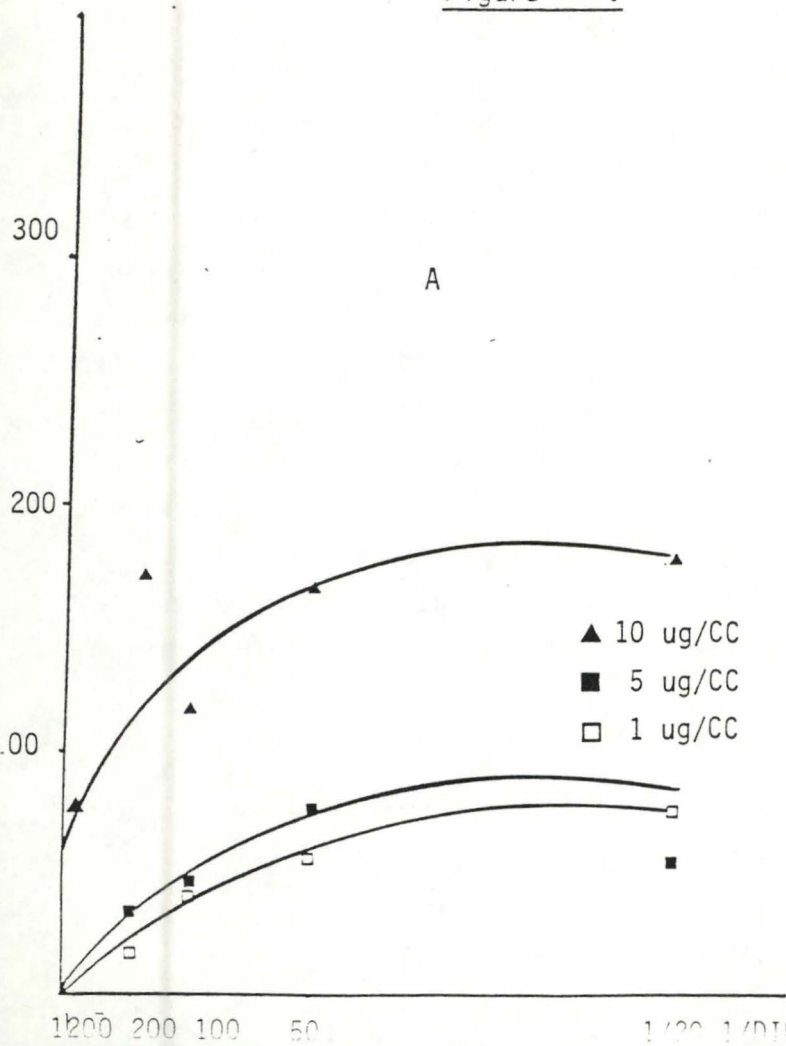


Figure 12 :



En A : l'absorbance à 405 nm est exprimée en fonction de l'inverse de la dilution de l'antiserum . 50 ul de 3 concentrations différentes de la préparation de Golgi ont été adsorbés sur le fond de plaques TITERTK .200 ug/ml, 100ug/ml et 50 ug/ml

En B : l'absorbance à 405 nm est exprimée en fonction de la concentration en protéines dans la préparation de Golgi adsorbées sur le fond des puits . L'antiserum est soit à la dilution de 20 , soit à la dilution de 50 ou à la dilution de 100 .

Les points représentent la moyenne de 3 mesures .

Fig 12

Pour une quantité de 10 ug/CC .

DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	345	166	179
50	349	184	165
100	280	161	119
200	337	164	173
1200	280	201	79

Pour une quantité de 5 ug/CC .

DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	253	198	55
50	239	164	76
100	194	146	48
200	190	155	35
1200	150	150	0

Pour une quantité de 1ug/CC .

DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	Absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	142	65	77
50	158	91	67
100	171	111	60
200	148	129	19
1200	146	146	0

Fig 11

Pour une quantité de 200 ug/CC .

DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	504	152	352
50	345	179	166
100	305	204	101
200	249	218	31
1200	187	187	0

Pour une quantité de 100 ug/CC .

DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	373	201	172
50	293	191	102
100	242	171	71
200	195	173	22
1200	171	171	0

Pour une quantité de 50 ug/CC .

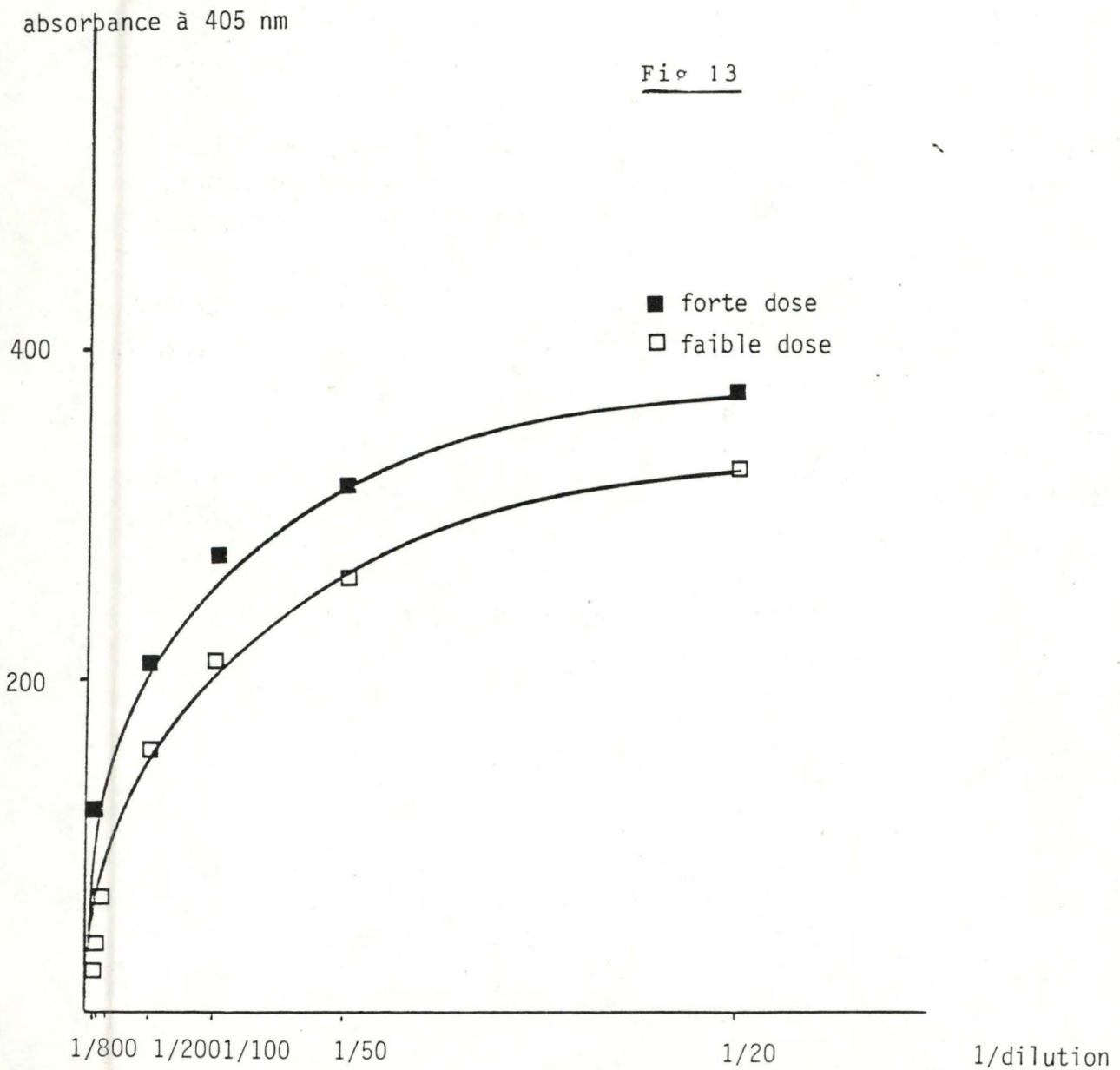
DILUTION	absorbance à 405 de l'antiserum	absorbance à 405 du serum normal	variation d'absorbance
20	491	221	270
50	425	213	212
100	368	222	146
200	310	220	91
1200	271	251	19

Fig13 Test ELISA sur les antiserums de souris A et B

L'absorbance à 405 nm est exprimée en fonction de l'inverse de la dilution du serum .

50 ug de Golgi ont été adsorbé sur le fond des puits de la plaque Tite
Entre parenthèse la différence Sérum A ou sérum B - sérum normal

DILUTION	Absorbance � 405 nm de sérum A		Absorbance � 405 nm sérum de sérum B		sérum normal
20	375	(327)	415	(367)	48
50	313	259	272	318	54
100	263	210	316	263	53
200	219	159	265	205	61
800	127	73	164	110	54
1200	94	50	104	60	44
2400	115	30	112	28	85



Si d'autre part on examine les courbes 11B et 12B pour les dilutions de polysérum 1200, 200, 100, 50 il existe un optimum. Cet optimum est de 50 ug/ml de protéines de Golgi adsorbées pour les dilutions de sérum 50 et 100 et de 10 ug/ml pour les dilutions 200 et 1200. Il semble que pour la dilution 20 on n'atteigne pas l'optimum avec les quantités de protéines de Golgi utilisées.

Il est certain que la quantité d'anticorps qui se fixe sur l'antigène préadsorbé sur le plastique dépend de la concentration de celui-ci.

A trop haute concentration de la protéine fixée sur le PVC, dans ce cas ci l'antigène, on suspecte une désorption ou la formation d'aggrégats qui eux ne sont pas fixés. (pour éviter ceci il est souhaitable d'établir des ponts covalents entre le plastique et l'antigène). Ceci explique qu'il existe un optimum de concentration de l'antigène préadsorbé et par conséquent de la quantité d'anticorps lié. Il est donc préférable d'utiliser des concentrations d'antigènes faibles. (50)

Il est d'autre part à remarquer que la quantité d'antigène qui se fixe sur le plastique ne dépend pas tellement du pH. Cette fixation est effectuée en général à pH physiologique, par contre le blocage des sites non spécifiques se fait plus efficacement par le BSA à pH 9, enfin les liaisons antigène - anticorps se font à pH physiologique. La quantité d'antigène adsorbé sur les plaques de PVC dépend de la force ionique (50).

Vu les résultats de ces mises au point nous avons choisi de travailler dorénavant en adsorbant 50 ul d'une préparation de membrane de Golgi à une concentration en protéines de 50ug/ml.

A la figure 13 sont représentées les courbes de titrations effectuées sur le polysérum recueilli à partir de souris immunisées à forte dose (B) et faible dose (A).

Le titre des deux antisérums diffère peu. Il semble donc que la différence de protocole d'immunisation forte dose - faible dose ait peu d'effet. Par contre le sérum de fusion, qui résulte d'un rappel supplémentaire, semble moins riche en anticorps.

BLK	111	144	114	135	133	095	102	118	155	<u>136</u>	162
084	071	101	093	103	080	089	085	085	121	117	151
093	056	060	070	085	069	072	068	079	093	104	137
112	119	084	082	076	085	080	077	092	098	095	<u>155</u>
082	075	075	080	076	083	077	099	083	076	113	148
101	060	063	073	085	107	086	083	074	089	110	104
069	098	106	104	125	103	115	127	125	131	100	<u>156</u>
088	108	127	122	164	142	159	<u>186</u>	151	<u>125</u>	139	166

BLK	084	075	077	063	067	065	101	111	108	102	145	A
045	075	082	069	059	067	063	079	078	099	104	122	B
060	024	<u>225</u>	052	058	049	047	066	057	060	094	101	C
061	024	057	060	069	068	111	076	075	087	103	106	D
063	055	055	058	050	060	061	060	066	075	092	091	E
052	068	051	044	044	084	046	063	067	072	094	093	F
059	066	059	058	072	068	070	073	086	095	084	095	G
064	054	083	126	072	092	086	085	087	087	114	084	H

TABLEAU 6 b

BLK	095	087	071	099	088	101	098	129	132	143	149
042	042	087	080	094	084	100	075	095	115	127	087
123	040	049	054	064	070	087	081	091	098	119	112
066	056	073	080	084	078	088	089	097	117	119	111
073	064	061	064	078	064	076	089	085	094	112	110
067	045	074	092	078	074	100	098	101	067	<u>214</u>	099
092	088	<u>252</u>	105	135	124	112	093	107	111	110	095
119	<u>176</u>	125	134	141	<u>140</u>	087	099	114	105	088	087

BLK	130	114	109	096	125	125	<u>200</u>	119	125	<u>156</u>	176	A
112	101	100	102	099	104	100	121	101	102	128	211	B
079	104	086	090	094	088	088	082	089	097	123	145	C
104	112	096	103	097	107	104	095	096	104	200	<u>155</u>	D
124	097	101	114	106	101	<u>220</u>	198	115	106	129	136	E
129	110	101	096	113	119	151	<u>115</u>	100	100	120	144	F
134	123	120	109	133	147	127	125	118	129	202	148	G
145	140	136	141	<u>152</u>	162	145	150	120	141	152	<u>254</u>	H

BLK	137	161	160	176	178	174	193	205	194	207	221
141	128	114	158	143	156	144	<u>175</u>	<u>170</u>	<u>176</u>	<u>178</u>	208
101	113	131	132	146	149	134	147	158	160	<u>157</u>	<u>190</u>
124	133	125	134	144	152	144	<u>152</u>	<u>156</u>	<u>154</u>	<u>134</u>	<u>198</u>
131	138	114	115	137	142	147	146	150	<u>157</u>	<u>183</u>	<u>172</u>
144	105	126	123	128	142	224	<u>150</u>	<u>171</u>	<u>167</u>	<u>217</u>	<u>221</u>
128	<u>156</u>	<u>142</u>	124	130	<u>161</u>	<u>154</u>	<u>165</u>	<u>162</u>	<u>168</u>	<u>219</u>	<u>202</u>
167	<u>247</u>	<u>173</u>	<u>193</u>	<u>183</u>	141	157	167	<u>159</u>	<u>168</u>	<u>166</u>	185

BLK	118	142	104	086	101	076	090	101	107	107	152	A
089	099	104	082	092	090	093	086	083	106	094	127	B
114	080	071	077	074	069	076	071	088	098	128	114	C
106	077	098	100	082	061	064	069	076	082	081	111	D
131	106	096	099	098	107	098	088	096	079	098	130	E
150	111	098	112	100	097	086	093	086	073	093	112	F
118	124	146	113	108	094	098	090	097	110	101	119	G
<u>211</u>	<u>156</u>	139	124	146	125	090	119	114	128	133	134	H

TABLEAU 6 b

8

BLK	070	063	050	048	064	038	033	055	067	045	106
054	054	064	054	058	061	077	068	034	038	096	118
056	045	044	046	061	021	045	074	081	069	106	121
056	051	053	051	100	043	073	037	073	090	046	041
061	050	047	089	056	018	070	056	073	045	066	097
058	052	016	042	050	048	020	062	040	057	076	093
089	061	110	065	054	079	080	224	112	081	056	113
112	115	103	087	075	100	085	110	073	076	076	090

BLK	106	100	097	088	095	103	116	118	109	089	120	A
073	097	072	093	080	082	151	082	083	076	081	095	B
051	062	062	048	<u>197</u>	072	067	066	070	069	073	075	C
046	075	081	061	063	061	086	065	070	063	093	105	D
075	058	085	055	050	060	073	079	083	116	086	103	E
070	091	064	062	049	061	066	<u>075</u>	078	076	095	<u>069</u>	F
072	075	113	070	093	100	078	087	096	095	<u>343</u>	102	G
115	115	109	097	109	124	047	105	097	102	117	085	H

BLK	062	106	076	086	054	081	050	034	081	118	040
088	034	056	028	027	041	047	041	072	089	086	109
075	079	039	036	029	024	044	027	059	064	060	099
072	055	065	029	080	024	092	074	041	023	076	117
071	053	058	040	061	060	080	083	080	093	095	110
075	077	033	068	048	065	079	087	078	099	104	090
055	052	056	059	074	081	094	088	091	106	098	087
103	114	094	132	116	138	100	112	122	120	075	063

BLK	096	115	082	053	087	088	097	119	101	093	059	I
075	032	033	094	092	101	095	090	113	108	133	169	E
075	032	027	064	083	074	074	104	092	073	082	133	C
097	088	063	113	080	081	112	109	091	127	125	138	L
141	101	097	102	104	118	113	113	101	088	121	179	E
084	093	095	086	068	097	097	098	098	115	121	150	F
124	111	148	133	125	106	105	104	095	135	130	115	C
139	124	138	117	130	133	145	128	129	117	118	120	T

TABLEAU 6b

BLK	059	086	060	100	091	063	088	090	078	083	096
048	055	066	150	062	067	079	095	079	071	087	074
046	070	056	023	083	059	090	074	071	057	067	046
034	038	071	041	082	084	087	075	069	049	071	068
070	052	084	032	070	069	067	079	088	064	077	051
027	063	079	024	045	056	072	027	083	069	058	063
070	079	031	033	064	062	077	092	085	079	043	060
041	076	092	046	080	095	090	101	110	095	075	048

													A
													E
													C
													L
													E
													F
													C
													T

TABLEAU 7 RECHERCHE D'HYBRIDOMES .

Après fusion au PEG , comptage cellulaire et dilution , les hybridomes ont été cultivés dans des boîtes à 96 micropuits . Seuls les hybridomes ayant survécu , les surnageants prélevés 15 jours après fusion mettent en évidence la présence de cellules productrices d' anti-Golgi .

Après mise in culture en macropuits des hybridomes positifs au premier test ont été prélevés 12 jours plus tard (macro 1) . Une deuxième mise en culture en macropuits a été faite à partir de clones congelés (macro 2) . Lors de cette troisième mise en culture , les contrôles sont : 7C7 et 1C8 , surnageants de clones anticlasse II bovin et anti-immunoglobuline bovine , l'antiserum B (dilué 50 fois) testé en même temps que le serum normal de souris .

Les tests ELISA ont été réalisés avec 50 uI de GOLGI à 50 ug/CC par puits . Les surnageants ont été utilisés non dilués .

Les valeurs reprises en macro B sont les valeurs de B dont l'absorbance de 7C7 a été soustraite .

NOM de l'hybridome	absorbance			nom de l'hybridome	absorbance				
	micro	macro			micro	macro			
		A	B	B		A	B	B	
1A11	136	137	175	28	5E11	183	163		
1D12	155	158			5E12	173	148		
1G12	155	136			5F8	150	140		
1H8	186	205			5F9	171	160		
1H9	151	130	172	25	5F10	167	156		
1H10	125				5F11	217	172		
2C3	225	153	202	55	5F12	221	142		
3F11	214	180	149	2	5G2	156	171		
3G3	252	210			5G3	142	195	47	
3H2	176	178	261	114	5G6	161	142		
3H6	140		107	0	5G7	154	155		
4A8	200	169			5G8	165	155		
4A11	155	197			5G9	162	188		
4D12	155	171			5G10	168	135	163	16
4E7	220	214			5G11	219	163		
4F8	115	144			5G12	202	131	205	58
4H5	152	165			5H2	247	156	156	9
4H12	254	196			5H3	173	147	207	60
5B8	175	119	122	0	5H4	193	171		
5B9	170	134	183	36	5H5	183	126	127	0
5B10	176	195			5H9	159	188		
5B11	178	155			5H10	168	153		
5C11	157	175			5H11	166	161	258	111
5C12	190				6H1	211	168		
5D8	153	121	191	44	6H2	156	112	186	39
5D9	156	141	161	14	8C5	197	159	301	154
5D10	154	126	218	71	8F8	075	209	62	
5D11	134	113			8F12	69	371	224	
5D12	198		193	46	8G11	343	343	164	
5E10	157	158			SERUM NORMAL	105			
					ANTISERUM	703			
					Temoin 1C8	223			
					7C7	147			

2.3. RECHERCHE D'HYBRIDOMES PRODUCTEURS D'ANTICORPS .

Après la fusion , les différents types cellulaires hybridomes , cellule myélomateuses et lymphocytes , ont été mis en culture en milieu HAT en micropuits durant 10 jours environ .(11 boîtes de 96 puits) A ce moment seuls survivent les hybridomes .

Du surnageant de culture a été prélevé et un test ELISA effectué sur chaque surnageant . Ces résultats sont repris dans les tableaux 6 et 7 . Les valeurs des blancs sont estimées dans chaque plaque séparément à partir des valeurs minimales observées (les lectures ont été faites contre PBS). Par exemple dans la boîte 1 le blanc vaut environ 60-70 ; dans la boîte 2 , il est de 25-45 ; dans la boîte 3 , il est de 45-60 ; dans la boîte 4 il est de 88 environ . Ont été soulignés les micropuits dont les hybridomes ont été cultivés en macropuits ultérieurement (voir tableau 7 recherche d'hybridomes) . Ont été encadrés les micropuits présentant les valeurs les plus élevées et qui serviront plus tard au clonage (voir tableau 7) .

Les clones visibles en micropuits et dont le surnageant donne une lecture supérieure à 100 ont été cultivés ensuite en macropuits durant 15 jours . Les surnageants prélevés après 12 jours en macropuits , ont été mesurés par test ELISA (macro A) . A ce niveau nous avons à titre de contrôle *négatif* utilisé des clones 7C7 anticlasse II bovin et 1C8 antiimmunoglobuline bovine ; à titre de contrôle *positif* l'antisérum B. Les hybridomes 1H8 , 3G3 et 4E7 ont été retenus pour le clonage parce qu'il correspondait à la valeur la plus élevée de la série: supérieure à 200 .

Dans le même tableau récapitulatif sont représentés en macro B les résultats d'une remise en culture des hybridomes après congélation dans l'azote liquide; en effet nous avons recherché plus tard si d'autres hybridomes ne pouvaient pas être intéressants . on sait que durant les screening initiaux pour la sélection d'hybridomes positifs destinés au clonage , il est nécessaire de répéter les tests : en effet un clone positif peut être supplanté par un clone négatif ou différents hybrides peuvent croître en même temps et à des vitesses différentes .(50) -

En macro B sont reprises les valeurs de B dont 147 (valeur du 7C7: témoin) a été soustraite . A ce stade 3H2 , 5H11 , 8C5 , 8F12 et 8G11 semblent être intéressants .

TABLEAU 8

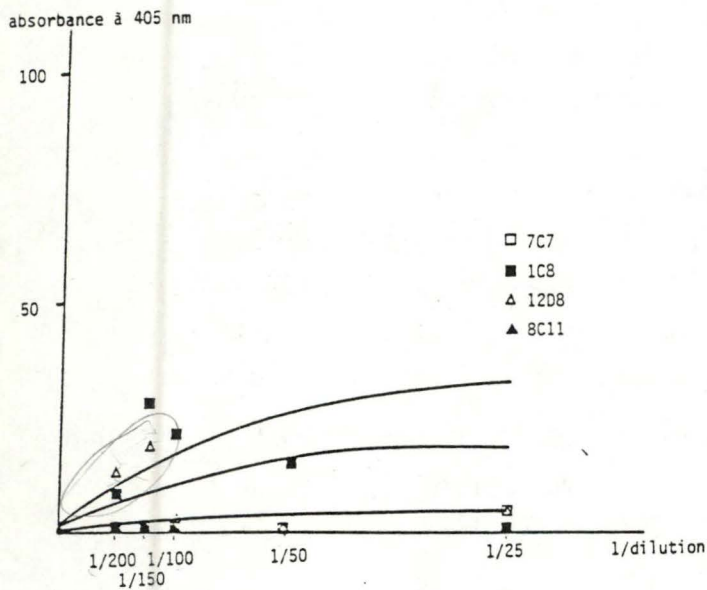
Clones producteurs d'anticorps anti Golgi .

1 . Test ELISA réalisé sur les anticorps monoclonaux 4E7E9 , 1H8D6 , 3G3E3 et 3G3D10 .et témoins 7C7 et 1C8 .

	absorbance à 405 nm	-7C7	-1C8
3G3D10	288	141	65
3G3E3	317	170	94
4E7E9	232	85	9
1H8D6	186	39	0
7C7	147		
1C8	223		

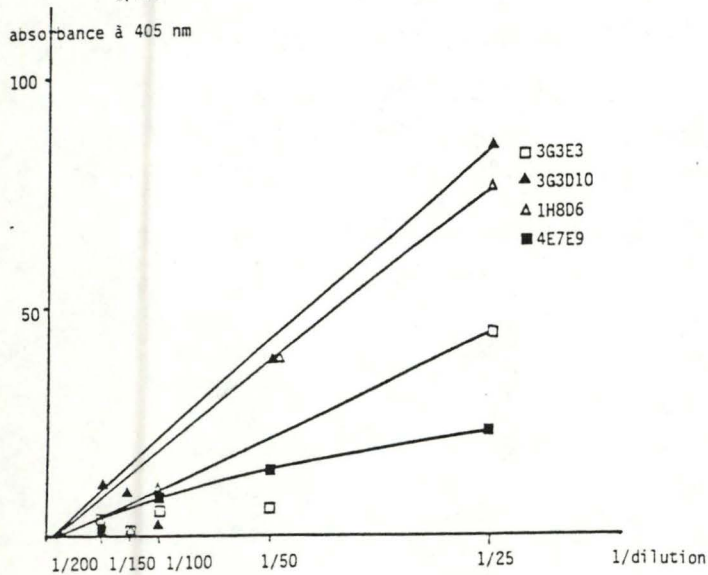
2 . Test ELISA réalisé sur les anticorps monoclonaux 4E7E9 , 1H8D6 , 3G3E3 et 3G3D10 et témoins 7C7 , 1C8 ,12D8 et 8C11 .

Fig 14



DILUTION	3G3E3	3G3D10	4E7E9	1H8D6
25	45	85	24	76
50	6	38	15	39
100	6	3	9	10
150	0	8	0	0
200	5	10	1	5

DILUTION	7C7	1C8	12D8	8C11
25	5	0	5	0
50	0	17	6	0
100	0	22	0	0
150	19	28	0	0
200	14	8	0	0



2.4. DETECTION DES CLONES APRES DILUTION LIMITE ET RECHERCHE D'ANTICORPS MONOCLONAUX .

Les hybridomes 3G3 , 4E7 et 1H8 cultivés en macropuits ont produit respectivement

1H8	14.10 ⁶ cellules/ml
4E7	8.10 ⁶ cellules/ml
3G3	0,6.10 ⁶ cellules/ml

Pour chaque hybridome , on dilue le contenu de macropuits de telle sorte que en déposant 100 ul de dilution dans un puits de boite de culture celui-ci contienne soit 0,1 cellule par puits (4 x12 puits) , 1 cellule par puits (2 x12 puits) , 10 cellules par puits (12 puits) .

Dans certains puits ayant reçu la dilution à 0,1 cellule par 100 ul , on voit apparaitre une colonie provenant nécessairement d'une cellule , c' est un clone .

1H8 a donné 2 clones 1H8D6 et 1H8G11

4E7 1 clone 4E7E9 .

3G3 5 clones 3G3E3 ,3G3D10 ,3G3E6 ,3G3E7 et 3G3E9 .

Les surnageants de ces clones ont été testés . Certains sont producteurs d'anticorps antigolgi .(voir tableau 8 et Fig 14 et 14bbis) Il est certain que le titre en anticorps est peu élevé . D'autre part certains surnageants de clones utilisés comme témoins ne semblent pas négatifs.

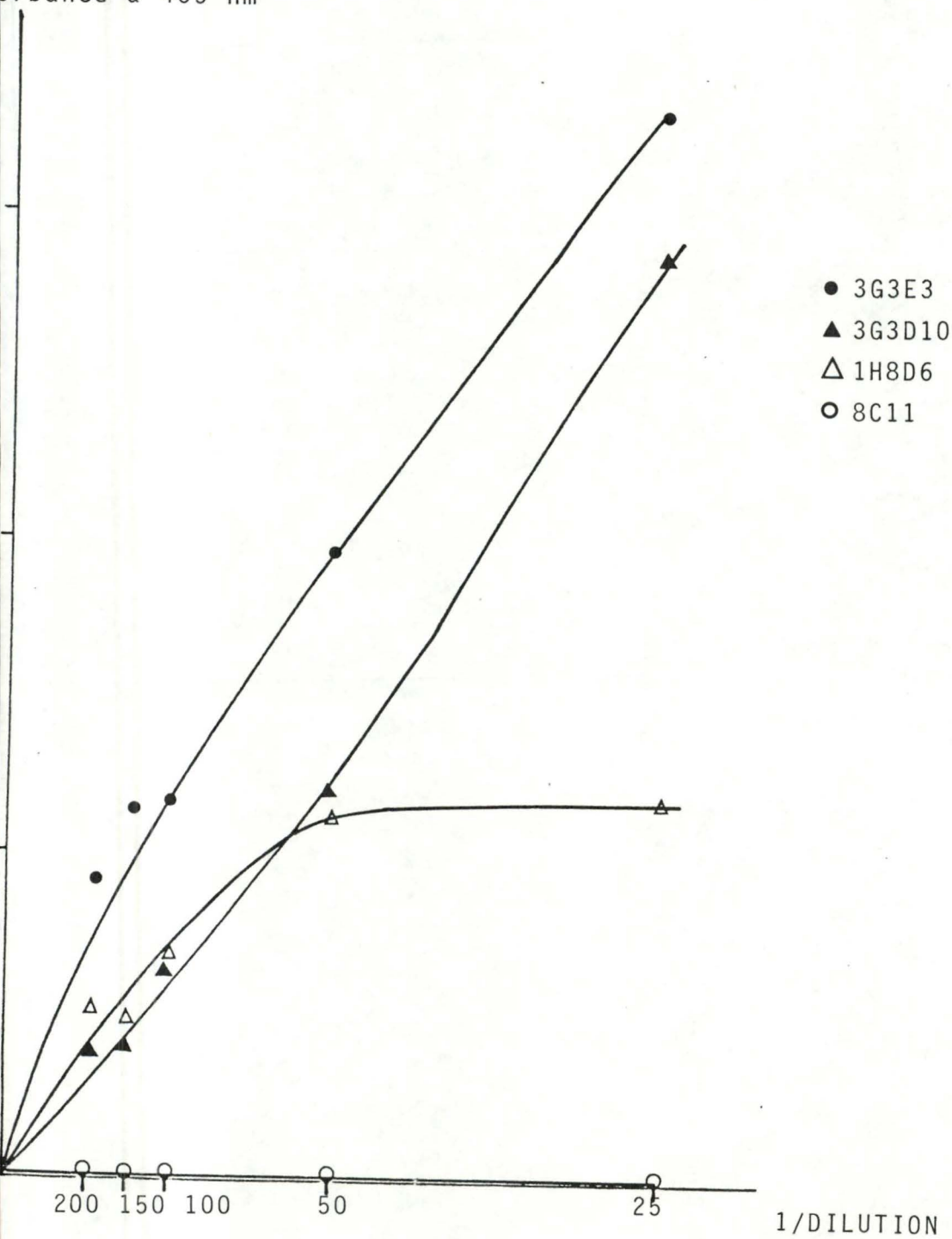
Ces clones sont produits au laboratoire d'immunologie du Professeur A. Depelchin et nous ont été fournis par le Docteur JJ LETESSON . 8C11 et 12D8 sont dans notre cas des contrôles négatifs adéquats . Les antigènes correspondant aux surnageants de clones témoins ont été caractérisés de la façon suivante . 8C11 et 12D8 sont des clones producteurs d'anticorps anti-lymphocytes T bovins. Les poids moléculaires des antigènes correspondant ne sont pas connus.

7C7 est un antigène d'histocompatibilité de classe II bovin. En conditions réductrices le P.M. des peptides reconnus sont de 28,33 et accessoirement de 30 Kd. Les deux premiers sont exprimés à la surface cellulaire.

1C8 est un clone sécrétant des anticorps anti-Immunoglobuline IgG1 bovine Le P.M en conditions réductrices du peptide reconnu est de 55Kd (Chaîne lourde) de 150 Kd en conditions non réductrices.

Fig 14 bis TITRATION DE SURNAGEANTS DE CLONES PRODUCTEURS D'ANTICORPS
MONOCLONAUX 3G3E3 3G3D10 1H8D6 et TEMOIN 8C11 .

orbance à 405 nm



1/100

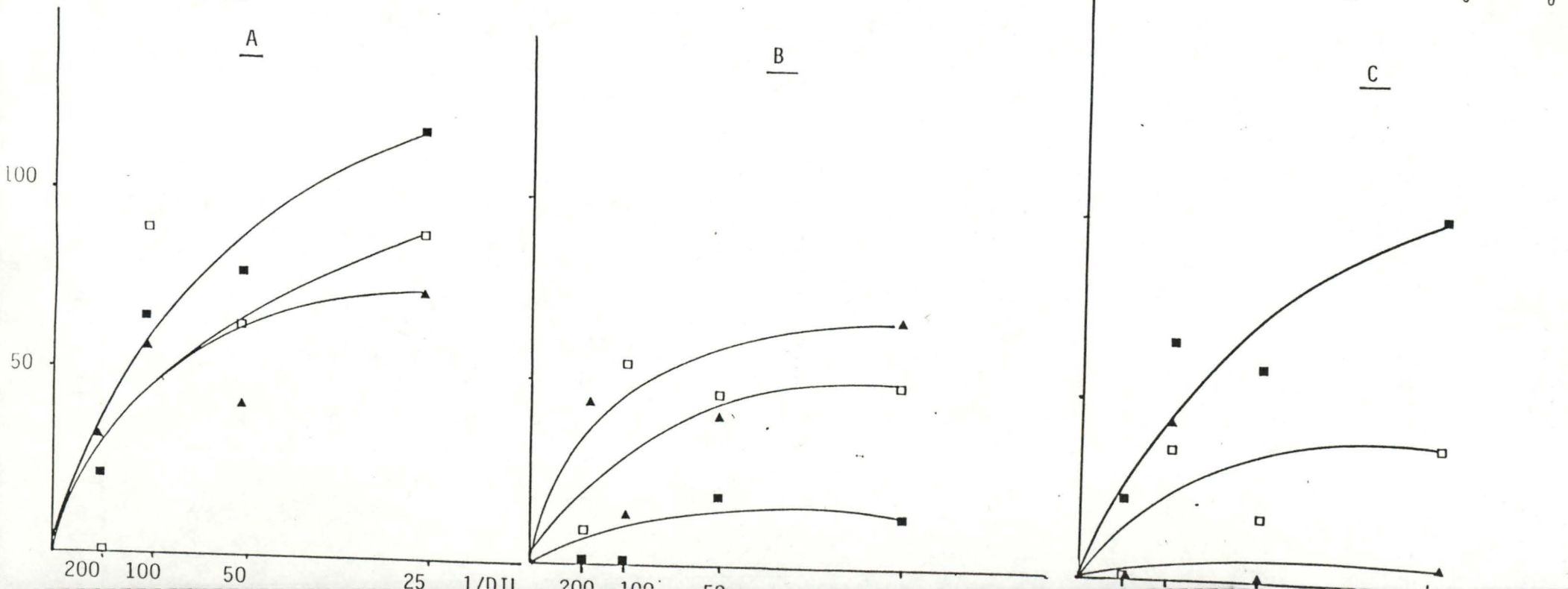
Fig 15

Test ELISA effectués en présence de NP40 à différentes concentrations .

Sur les anticorps monoclonaux 4E7E9 (en A) , les blancs ont été réalisés en préincubant les anticorps monoclonaux (50 ul) avec 10 ul de protéines de Golgi solubilisés au préalable (voir texte) . Les concentrations finales de NP40 sont de 0 , 0,16 , 0,33 % . (en B) . La différence est représentée en C .

DIL	NP40			DIL	NP40			DIL	NP40		
	0.33%	0.16%	0%		0.33%	0.16%	0%		0.33%	0.16%	0%
25	119	90	74	25	15	51	69	25	104	39	5
50	79	65	42	50	20	48	42	50	59	17	0
100	66	91	57	100	0	56	14	100	66	35	43
200	22	0	33	200	0	10	45	200	22	0	0

absorbance à 405 nm



Les 4 antigènes pourraient être des glycoprotéines : 7C7 est un antigène de surface, les anti lymphocytes T bovins sont aussi des antigènes de surface, 1C8 est une immunoglobuline. Un croisement avec des antigènes de Golgi vraisemblablement glycosylés est à envisager.

Il est à craindre que les faibles valeurs que nous mesurons puissent être dues à des adsorptions non spécifiques. Ce que nous avons essayé de vérifier de différentes manières.

Le deuxième anticorps Rabbit antiMouse dilution 500 (RAM) a été adsorbé sur le fond des puits recouverts de Golgi sans ajouter au préalable d'anticorps antigolgi. Les valeurs obtenues sont comparés à celles données par la solution d'ABTS seule (moyenne de 4 valeurs mesurées chaque fois).

	1	2	3	4
ABTS	100	134	95	143
RAM-ABTS	115	145	81	115

*c'est fait
deve.*

Le RAM ne se fixe donc pas de façon non spécifique dans nos conditions de mesure. Un deuxième contrôle est le suivant : (Fig 15)

nous avons préincubé l'anticorps en présence de membranes de Golgi solubilisées durant 22 heures à 0°C en présence ou en l'absence de détergent NONIDET p 40 (NP40). L'anticorps est effectivement neutralisé par une préincubation de 22 heures en présence de protéines de Golgi à condition que celle-ci soient extraites de la membrane (en C courbe 0,33 % de NP40). La concentration de protéines Golgiennes est de 3 mg/ml d'anticorps. On sait que l'addition de détergents tels que TWEEN 20 et TRITON X 100 n'interfère pas avec le test ELISA mais empêche l'adsorption non spécifique de l'anticorps sur phase solide sans interférer cependant avec les interactions hydrophobes préexistantes (plastique - antigène).

Nous croyons donc que le clone 4E7E9 est réellement producteur d'anticorps antigolgi de même que 1H8D6, 3G3E3 et 3G3D10.

Nous avons recherché l'isotypie des immunoglobulines produites. Pour ce, nous avons été contraint de concentrer les surnageants de culture contenant les anticorps. Après précipitation au $(NH_4)_2SO_4$, remise en solution et désalage sur SEPHADEX G 25 à raison d'un volume 5 fois moindre, nous avons obtenu les anticorps monoclonaux 5 fois concentrés. L'isotypie a été déterminé par ELISA sandwich. Sur le fond de boîtes TITERTEK, du Rabbit antimouse adsorbé durant une nuit à 4°C a fixé les anticorps monoclonaux concentrés. Après lavage ceux-ci ont été reconnu par des anticorps -anti Ig G1, Ig G2a, Ig G2b et Ig M.

*pp.
magnif
mémoire*

Fig 16

absorbance à 405 nm

A

B

3G3E3

3G3D10

1H8D6

4E7E9

Fig 16. TESTS ELISA SUR SURNAGEANTS DE CLONES
3G3E3 3G3D10 1H8D6 ET 4E7E9 .

Les surnageants ont été précipités au sulfate ammonique remis en suspension dans un volume 5 fois moindre de PBS , et désalés sur colonne de SEPHADEX G 25 .

En A 10 ug de protéines de Golgi ont été adsorbées sur le fond des puits .

○ En Ig : le deuxième anticorps est la Fab peroxydase 1/500 1 heures à 37°C .

△ En Ig M : le deuxième anticorps est l'anti Ig M-biotinylée 1/1000 1 heure à 37°C suivie de streptavidine - peroxydase 1/1500 30 minutes 37°C

En B : 50 ug de protéines de Golgi ont été adsorbés sur le fond des puits .

○ En Ig : Le deuxième anticorps est la Fab peroxydase 1/500 une heure à 37°C .

△ En Ig M : Le deuxième anticorps est l'anti Ig M -biotinylée 1/300 1 heure à 37°C suivie de streptavidine - peroxydase 1/450 30 minutes à 37°C .

Les blancs soustraits sont dans tous les cas des puits contenant Golgi - Milieu de culture - 2e anticorps - ABTS .

Ils sont en moyenne de 25 pour Ig M et 101 (A) 128 (B) pour Ig G .

1H8D6 , 3G3E3 , 3G3D10 sont producteurs d'anticorps anti-Golgi de classe M . La classe de 4E7E9 n'a pu être fixée .

Sur les mêmes préparations d'anticorps monoclonaux anti-Golgi précipités et concentrés nous avons refait une titration dans différentes conditions . Soit le Golgi préadsorbé est à 10 ug/CC soit à 50 ug/CC . Le deuxième anticorps est soit la Fab-peroxydase anti IgG(H+L) soit anti Ig M BIOTINYLEE-avidine peroxydase . Nous avons aussi utilisé ce deuxième détecteur à deux concentrations différentes . (Fig 16)

Les résultats montrent que la dilution optimale est de 5 pour 3G3E3 , 2 pour 3G3D10 , 1 pour 1H8D6 . Par contre , après précipitation au sulfate ammonique 4E7E9 est nul .

TABLEAU 9 .

ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN GRADIENT 5 - 20 % .

Electrophorèse sur gel d'acrylamide en gradient 5-20 % (en présence de SDS) de membranes de Golgi purifiées (ASR de la galactosyl transférase =55 ,2) et de la membrane plasmique purifiée (5'AMPase ASR = 61,82) G1 = 50 ug/CC ; G2 = 100 ug/CC ; M1 = 50 ug/CC ; M2 = 100 ug

Les étalons sont respectivement

Phosphorylase B	92,5 kD
BSA	66,2 kD
Ovalbumine	45,0 kD
Anhydrase carbonique	31,0 kD
Inhibiteur de la trypsine	21,5 kD
Lysosyme	14,4 kD

Les différents poids moléculaires des protéines :

		du Golgi	de la membrane plasmique
à	11 mm	109 640	109 640
	14	102 300	102 300
	16	/	100 000
	17	91 200	91 200
	19	83 000	83 000
	22	75 800	75 800
	23	74 100	74 100
	26	67 000	67 000
	27	66 000	/
	30	60 250	60 250
	32	57 500	57 500
	34	52 480	52 480
	36	48 900	48 900
	38	44 600	/
	45	36 300	36 300
	47	34 600	/
	52	/	30 200
	54	27 500	27 500
	59	22 900	22 900
	61	21 300	21 300
	65	19 000	19 000
	72	15 800	/

3 . CARACTERISATION DES ANTIGENES CORRESPONDANT AUX CLONES: POIDS MOLECULAIRE .

Après avoir produit des anticorps monoclonaux 3G3E3 , 3G3D10 , 1H8D6 et 4E7E9 , la première démarche que nous avons poursuivie est de caractériser les antigènes Golgiens correspondants sur base de leurs poids moléculaires .

A cet effet nous avons tout d'abord établi la liste des protéines présentes dans les préparations de Golgi de foie de rat purifiées (GD) .

3.1. Inventaire des protéines présentes dans la préparation de Golgi purifiée GD et de membrane plasmique purifiée .

- Electrophorèse sur gel plat d'acrylamide en gradient 5-20 % .

Une préparation dont l'ASR en Galactosyltransférase est de 55,2 a été déposée sur les puits du gradient à raison de 50 et 100 ug/piste . Comme nous suspectons un nombre élevé de bandes cela correspond plus au moins à 1 à 5ug de protéines par bande , quantité détectable au bleu de Coomassie . En examinant l'electrophorèse , on constate qu'il est préférable d'utiliser 50 ug/piste pour éviter toute surcharge . 20 bandes ont été détectées dont les poids moléculaires ont été calculés par rapport à des substances étalon de poids moléculaire connu qui ont migré sur le même gel . La droite d'étalonnage (fig 18) reprend des protéines étalon de faible poids moléculaire (BIORAD) . La distance de migration des protéines évolue linéairement en fonction du logarithme du poids moléculaire .

Nous avons réparti sur cette droite la distance de migration de toutes les bandes décelables et calculé les poids moléculaires correspondants qui sont repris dans le tableau 9 .

Afin de préciser les protéines de haut poids moléculaire nous avons effectué de plus une électrophorèse sur gel d'acrylamide à 12 % , les étalons sont dans ce cas de haut poids moléculaire .

La droite d'étalonnage est linéaire entre un logarithme de poids moléculaire de 5,301 et 4,802 (poids moléculaire 200 000 et 66 200) . Les poids moléculaires des protéines de Golgi sont repris au tableau 10 .

L'ensemble des poids moléculaires déterminés en électrophorèse sur gel d'acrylamide 5-20 % et 12 % sont repris au tableau 11 .

Sur le gel d'acrylamide en gradient 5-20 % , deux puits ont reçu 50 et 100 ug d'une préparation de membrane plasmique purifiée (ASR de la 5' Nucléotidase = 61,8) . Les poids moléculaires des protéines de la membrane plasmique sont repris au tableau 9 . Afin de pouvoir discuter des résultats obtenus , nous avons repris au tableau 12 les valeurs de poids moléculaire de protéines de Golgi repertoriées dans la littérature .

TABLEAU 10 .
 ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE à 12 % .

Electrophorèse sur gel d'acrylamide à 12 % en présence de SDS .

Une préparation de Golgi purifiée (galactosyl transférase ASR =)
 a été déposée à raison de (à droite) , 83 , 63 , 42 et 21 ug par puits .

les étalons sont respectivement

la myosine	: 200 000 daltons .
β Galactosidase	: 116 250 daltons .
phosphorylase B	: 92 500 daltons .
BSA	: 66 200 daltons .
Ovalbumine	: 45 000 daltons .

Les différentes bandes protéiques du Golgi sont de :

tableau 10

	PM
2 mm	263 000
3 mm	251 000
5 mm	240 000
6 mm	199 500
8 mm	177 800
10mm	162 100
13mm	128 800
18mm	100 000
28mm	60 250
34mm	53 700
36mm	51 250
43mm	46 700
52mm	39 800
69mm	28 800
73mm	26 300
78mm	23 900
83mm	22 380

ON constate que au nombre des protéines du Golgi on retrouve une bande de 66 000 correspondant à la sérum albumine, protéine contenue dans le Golgi . Nous avons signalé que le lavage des membranes de Golgi à la suite du gradient était sans doute insuffisant pour vider celles-ci de leur contenu. Or un des rôles principaux de l'hépatocyte est de synthétiser et exporter l'albumine dont le trajet emprunte la voie du Golgi . Notons que cette bande est absente dans les préparations de membranes plasmiques . Nous nous sommes attaché à examiner de plus près si d'autres protéines pouvaient être des contenus de Golgi : Effectivement 44 600 est le poids moléculaire de APO A IV (HDL) , 34 600 le poids moléculaire de APO E . Ces deux protéines ne se retrouvent pas dans la membrane plasmique (Ce qui confirme leur identité) , 27 500 serait l'APO A I ; cependant une protéine de même poids moléculaire se retrouve sur la membrane plasmique .

APO A IV est une protéine de lipoprotéine HDL (présente aussi dans les LDL) de poids moléculaire 44 600 , APO E de poids moléculaire de 34 600 est présente dans toutes les classes de lipoprotéines de rat , Apo A I est la protéine majeure des HDL et LDL . HOWELL et PALADE , décrivent en outre trois peptides de poids moléculaire compris entre 11 000 et 7 000 (triplêt)et présent dans toutes les classes de lipoprotéines .

Les protéines associées à la membrane de Golgi que nous retrouvons dans les électrophorèses (110 , 75 ; 67 , 47 ,46 Kd)et dont on connaît le rôle sont la mannosidase II de 110 kD (produit de dégradation à activité enzymatique d'un composé de 124 kD) , la Mannosidase I de poids moléculaire 75 kD , la Galactosyl transférase de poids moléculaire de 67 kD , la Sialyl transférase de 47 kD et la N acetyl glucosaminyl transférase de poids moléculaire 46 kD . Les poids moléculaires de 110 , 75 et 67 kD se retrouvent aussi dans la membrane plasmique .

Ce relevé d'inventaires des protéines Golgiennes devrait nous permettre d'identifier éventuellement les antigènes correspondant aux anticorps monoclonaux que nous avons produit .

TABLEAU 12 POIDS MOLECULAIRES DE PROTEINES DE GOLGI RELEVES DANS LA LITTERATURE (foie de rat) .

1. MEMBRANE					
	référence	poids moléculaire en kD		pI	remarques
		SDS-PAGE	sephadex		
α Mannosidase	(38)	75 - 80 145 - 150	295	5,8	glycoprotéine tétramère
Galactosyl transférase	(53) (53)	67	46,5	9 ^{ts}	localisation*
N Acetyl glucosaminyltransférase I doublet	(35)	58-46			foie de lapin
Mannosidase II	(54)	124-(110)			
Sialyl transférase	(28)	47 (41)			
?	(22)	135 - 110			
2. CONTENU					
albumine	(48)	66			HDL toutes les lipoprotéines HDL - LDL
APO A IV	(48)	44,6			
APO E	(48)	34,6			
APO A I	(48)	27,7			

() sont les produits de dégradation .

* CIS et MEDIAN pour les substrats endogènes

TRANS pour les substrats exogènes

TABLEAU 11 : Synthèse des poids moléculaires de protéines de Golgi
présentes dans une préparation purifiée .

<u>GEL à 12 %</u>	<u>GEL en gradient 5 - 20 %</u>
263.0	
251.0	
240.0	
199.5	
177.8	
162.1	
128.8	
	*109.6
	<u>102.3</u>
100	
	91.2
	83.0
	*75.8
	<u>74.1</u>
	*67.0
	<u>66.2</u>
60.2	<u>60.2</u>
53.7	
	52.5
51.3	
	48.9
<u>46.7</u>	
	<u>44.6</u>
39.8	
	36.3
	<u>34.6</u>
28.8	
	* <u>27.5</u>
26.3	
23.9	
	22.9
22.4	
	21.3
	19.0
	15.8

La préparation utilisée présente une ASR de la galactosyl transférase de 55.2 et 68.8 . La colonne de droite reprend les résultats de l'electrophorèse sur gel d'acrylamide en gradient 5-20 % et la colonne de gauche les résultats d'electrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % .

Sont soulignéS les poids moléculaires dont on a identifié la fonction *l'astérisque marque les poids moléculaires retrouvés simultanément dans la membrane de Golgi et la membrane plasmique .(electrophorèse 5 - 20 %) .

3.2. Poids moléculaires des antigènes correspondant à 3G3E3 , 3G3D10 , 1H8D6 et 4E7E9 .

? cond. r^eductive

Les poids moléculaires des antigènes reconnus par 3G3E3 , 3G3D10 1H8D6 et 4E7E9 ont été déterminés par immunoblotting après western blot .

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide a été faite sur gel 12 % . 2 puits contiennent des protéines étalon , les autres puits un échantillon de Golgi (G) , de membrane plasmique (M) et de membrane de lysosome (L) . Cette triade est répétée autant de fois que le gel le permet . Après migration le contenu de ce gel a été transféré sur feuille de nitrocellulose et cette feuille découpée de la façon suivante : les pistes étalon et un certain nombre de triades GML . Les languettes étalon sont colorées à l'amido black, les triades GML sont incubées en présence d'un surnageant de clone différent dilué dans TRIS NaCl Ovalbumine 3 % (dilution 1/10) durant 3/4 heure .

Après lavage le deuxième anticorps (Rabbit antimouse couplé à la peroxydase) est lui-même adsorbé durant 3/4 heure . Après de nouveaux lavages la présence de la peroxydase est révélée au moyen de substrats de l'enzyme : H₂O₂ et diaminobenzidine . 5 séries différentes d'électrophorèse ont été réalisées .

- Electrophorèse et immublotting N°1 . (tableau 13)

Dans la première série nous avons utilisé comme contrôle négatif le surnageant de clone 1C8 (anti Ig G bovine) . Ce contrôle négatif ne laisse pas (très peu) apparaître de marquage ni pour la membrane de Golgi , ni pour la membrane plasmique , ni pour les lysosomes . 3 surnageants de clones antigéniques ont été testés 3G3D10 , 3G3E3 et 1H8D6 . Tous trois sont positifs vis à vis du Golgi , de la membrane plasmique et de la membrane lysosomale . Tous trois se fixent sur un doublet de protéines de Golgi , les poids moléculaires se situent aux alentours de 46 000 et 60 000 ceci pour 3G3E3 , 3G3D10 et 1H8D6 . 1H8D6 se fixe en plus sur un polypeptide de poids moléculaire de 71 000 daltons . Tous trois se fixent sur la membrane plasmique . Cependant les réponses ne sont pas semblables . En effet 3G3D10 et 3G3E3 reconnaissent outre les polypeptides de poids moléculaire (PM) 46 et 60 kD une bande supplémentaire de 95,5 kD . 1H8D6 se fixe uniquement sur les bandes de 46 kD et 60 kD ce qui est donc la même situation que dans le cas du Golgi .

Tableau 13. Résumé des poids moléculaires des peptides détectés sur immunotransfert après SDS-PAGE. (immunoblottings n°1,2,3,4 et 5) (en kD)

<u>Immunoblotting</u>	<u>Anticorps monoclonal</u>	<u>Golgi</u>	<u>membrane plasmique</u>	<u>membrane lysosomiale</u>
1	<u>1C8</u>	aucun	aucun	aucun
	3G3D10	46-60	46-60-95	46-60-95-170
	3G3E3	46-60	46-60-95	46-60-83-95-166
	1H8D6	46-60-71	46-60	46-60-83-95-123-166
2	<u>7C7</u>	aucun	2 bandes	aucun
	3G3E3	2 bandes	2 bandes	4 bandes
	3G3D10	2 bandes	2 bandes	4 bandes
	1H8D6	2 bandes	2 bandes	6 bandes
3	<u>3G3E3+Golgi</u>	aucun	-	-
	3G3E3	50-61	50-61-129	50-61-229
4	3G3E3	47-59	-	-
	3G3D10	47-59	-	-
	1H8D6	47-59-64	-	-
5	4E7E9	36-51	-	-

Remarque : les anticorps soulignés servent de référence (voir texte)

3G3E3 , 3G3D10 et 1H8D6 reconnaissent tous trois des peptides présents dans la membrane lysosomale .Ce sont ici encore les unités de 46 et 60 kD avec pour chacun d'eux une particularité : deux bandes supplémentaires sont visibles sur le transfert incubé en présence de 3G3D10 , trois bandes supplémentaires si le blotting est incubé avec 3G3E3 et 4 bandes supplémentaires si la reconnaissance est due à 1H8D6 .

Les PM des peptides appartenant à la membrane lysosomale sur lesquels se fixent les surnageants de 3G3 sont dans l'ordre croissant 46 , 60 , 95,5 , 169,8 kD .

3G3E3 est un surnageant de clone ayant une certaine affinité pour les unités de PM 46 kD , 60 kD , 83,1 kD , 95,5 kD et 165,9 kD .

1H8D6 est un clone producteur d'anticorps dirigés contre 6 peptides de la membrane lysosomale 46 , 60 , 83,1 , 95,5 , 123 et 165,9 kD .

Discussion : Nous avons utilisé des gels d'acrylamide à 12 % ceci pour couvrir la gamme de PM la plus étendue possible sachant bien que pour les peptides de faible poids moléculaire la précision est meilleure dans un gel d'acrylamide en gradient 5 - 20 % .

cependant nous référant au tableau 12 , tableau qui reprend les Pm des protéines dont la fonction dans l'appareil de Golgi est connue , nous essaierons d'identifier les antigènes correspondant aux clones testés .

Un doublet . 46 et 60 kD présent sur les trois types de membranes Golgi , membrane plasmique et lysosomale correspond au PM (46 et 58 kD) de la N Acetyl Glucosaminyl transférase purifiée à partir de foie de rat . Cet enzyme accroche un group^e. Glc N Acetyl après l'action de la mannosidase II . 7 activités différentes de cet enzyme ont été identifiées jusqu'à présent dans différents tissus (35) .

C'est le seul doublet décrit parmi les enzymes du Golgi . Il est à remarquer toutefois que les poids moléculaires que nous avons déterminés sont sans doute imprécis . Dans le répertoire que nous avons établi (tableau 13) à partir des différentes électrophorèses que nous avons faites dans les mêmes conditions , Ce doublet se retrouve à chaque fois et les poids moléculaires sont approximativement les mêmes . La référence que nous utilisons provient de foie de lapin et non de rat : le PM d'un même enzyme varie suivant l'espèce dont il provient . Le PM de la Galctosyl transférase varie de 45 à 68 kD(avec une dizaine de variantes intermédiaires) suivant que l'enzyme provienne du sérum de rat ou de foie de poulet : ce sont des restrictions à apporter à cette identification .

Signalons que nous n'avons pas ajouté dans nos expériences d'inhibiteurs de protéases lors de l'isolement des différents types de membranes et que lors de la découpe et du réassemblage des pistes de nitrocellulose des erreurs sont inévitables.

Toutes ces réserves étant faites, l'antigène le plus probable est la N Acetyl Glucosaminyl transférase I parce que c'est le seul sous forme doublet et que les poids moléculaires correspondent bien.

Que signifient les poids moléculaires additionnels retrouvés dans la membrane plasmique ? 95,5 kD : ce pourrait être un dimère de 46 kD, ceci étant évidemment une pure spéculation : en effet en SDS-PAGE et après 100°C normalement on ne doit pas observer de dimère. Notons que la Galactosyl transférase a été localisée sur la membrane plasmique (53).

Quel sens attribuer aux peptides supplémentaires identifiables dans la membrane des lysosomes ? On sait que le transfert d'enzymes lysosomiaux à partir du lieu de synthèse et glycosylation (réticulum endoplasmique et Golgi) se fait par transport vésiculaire vers les lysosomes. Il ne serait pas étonnant dès lors de retrouver des protéines de Golgi dans la membrane lysosomale.

(remarque ! un anticorps anti-membrane lysosomale 12D2 (55) est dirigé contre des peptides de PM 166 kD / 66 à 77 kD. Seul le peptide antigénique 66 - 77 kD est reconnu dans la membrane plasmique et de Golgi.

ELECTROPHORESE et IMMUNOBLOTTING N°2.

Dans ce deuxième test, un autre contrôle négatif a été utilisé, c'est le surnageant du clone 7C7 (anti classe II bovine). Ce contrôle négatif, ne distingue pas de peptides dans la piste Golgi ni dans la piste lysosome. Par contre il marque une double bande sur la piste membrane plasmique. Les antigènes bovins du complexe majeur d'histocompatibilité classe II sont glycosylés, se trouvent sur la membrane plasmique : deux points communs avec les protéines de la membrane plasmique de foie de rat.

Les mêmes trois anticorps antigolgi déjà étudiés précédemment ont été testés ici : 3G3E3, 3G3D10 et 1H8D6. Incubés en présence de protéines golgiennes fixées sur nitrocellulose, tous trois se fixent sur un doublet dont les poids moléculaires (PM) sont semblables à ce que nous avons décrit précédemment. Il est donc à noter qu'ici encore il s'agit d'un doublet mais que les PM donnés sont déterminés avec trop peu de précision sur l'immunoblotting et sont peut être sujets à une hydrolyse protéolytique au cours de la purification des membranes. En ce qui touche la membrane plasmique, nous n'avons pas détecté ici de peptides supplémentaires. Ceci est peut être dû à un manque de sensibilité.

La membrane lysosomale est ici encore la plus riche en polypeptides correspondant aux trois surnageants de clones testés . 3G3D10 fournit un anticorps dirigés contre 4 protéines de la membrane lysosomale approximativement; 3G3E3 correspond à 4 antigènes de la membrane lysosomale . Enfin l'anticorps fourni par le clone 1H8D6 est ici aussi de même que dans l'immunoblotting précédent fixé sur 6 peptides .

- Electrophorèse et immunoblotting N°3 .

Nous avons remarqué précédemment qu'un surnageant de clone utilisé comme contrôle négatif ne l'est pas nécessairement (7C7) tandis que un autre (1C8) ne se fixe ni sur les protéines de la membrane de Golgi , ni de la membrane plasmique , ni de la membrane lysosomale .

Les contrôles négatifs sont très importants . Aussi nous avons tenté dans cette troisième expérience de neutraliser le surnageant (3G3E3) par une préparation de Golgi avant de l'appliquer sur la feuille de nitrocellulose comportant les peptides golgiens

pistes C D E F G H

En C l'anticorps 3G3E3 a été appliqué tel quel sur la membrane de Golgi , plasmique et de lysosomes . Les poids moléculaires détectés sont de 50 et 61 kD (doublet présent sur les 3 pistes) et une bande supplémentaire pour la membrane plasmique (128,8kD) de même que la membrane des lysosomes (229 kD) .

Lorsqu'on préincube l'anticorps 3G3E3 en présence de quantités croissantes de membranes de Golgi on constate une disparition à partir de la dose 1260 ug du doublet normalement détecté (2,5 mg de protéines de Golgi/ ml d'anticorps)

Il est donc à exclure que le deuxième anticorps RAM soit lui même fixé sur les doublets du Golgi (contrôle direct que nous n'avons pas fait) et il ressort d'autre part que cette inhibition traduit une spécificité pour les protéines du Golgi .

Sur le même immunoblotting en A et C sont repris des résultats obtenus avec des surnageants d'hybridomes avant dilution limite . Nous y reviendrons plus loin .

Vu la disparité des PM déterminés dans les immunoblotting 1 2 3 nous avons refait encore une fois la même expérience en utilisant cette fois uniquement des membranes de Golgi .

Ici encore les 3 anticorps testés 3G3E3 , 3G3D10 et 1H8D6 se fixent sur un doublet de 47 et 59 kD ; 1H8D6 se fixe de plus sur un peptide de PM ~ 64 kD .

- Electrophorèse et immunoblotting N°5 .

Nous avons testés un 4e anticorps monoclonal antigolgi à savoir le 4E7E9 . Le clone produisant cet anticorps semble peu stable : en effet les surnageants produits sont loin de fournir des réponses semblables en ELISA. (résultats non montré) . Le poids moléculaire des peptides reconnus serait peut être de 36 et 51 kD . Ici encore il s'agit d'un doublet . S'agit-il de la sialyl transférase ?(tableau 12) . Cet enzyme de foie de rat après purification et électrophorèse en SDS-PAGE a été caractérisé par un poids moléculaire de 47 kD (bande faible) et 41 kD (bande principale mais qui résulterait de la dégradation de la première) . Tenant compte des réserves émises précédemment , l'hypothèse Sialyl transférase serait à envisager mais on ne peut pas exclure que le doublet soit celui de la N Acetyl Glucosaminyl transférase I . Les poids moléculaires sont à vérifier puisqu'ils n'ont de toute façon pas été confirmés .

Nous avons repris dans le tableau la synthèse des différents poids moléculaires correspondant aux anticorps 3G3E3 , 3G3D10 ; 1H8D6 et 4E7E9 . Nous supposons que 3G3D10 , 3G3E3 , 4E7E9 et 1H8D6 sont susceptibles de se fixer sur les mêmes polypeptides de la membrane de Golgi . Ce doublet de polypeptides pourrait être , sous toutes réserves , la N Acetyl glucosaminyl transférase , réserves qui sont dus à l'imprécision des résultats . En effet nous avons exposé les raisons de cette imprécision précédemment .

Nous supposons que le 4E7E9 pourrait produire un anticorps anti Sialyl transférase .

Quoi qu'il en soit ces commentaires incitent à des expériences complémentaires : les anticorps inhibent - ils les 2 enzymes candidats ? Leur fixation est elle elle-même inhibée par les substrats de l'enzyme auquel cas ces anticorps seraient dirigés contre le site actif .

TABLEAU 14 .

SYNTHÈSE DES RESULTATS (ELISA ET IMMUNOBLOTTING) OBTENUS SUR LES SURNAGEANTS DE CULTURE D'HYBRIDOMES EN MACROPUITS (avant dilution limite) .

NOM de l'hybridome	ELISA		immunoblotting sur Gølgi(G)	immunoblotting		
	absorbance à 405 nm			G	M	L
1A11	175	28	+ (2)	+	+	+ (7)
1H9	172	25	- (3)			
2C3	202	55	- (3)			
3F11	149	2	- (1)			
3H2	261	114	+ (2)	+	+	+ (6)
3H6	107	0	- (3)			
5B8	120	0	- (2)			
5B8	52	0	- (2)			
5B9	183	36	+ (2)	+	+	+ (6)
5D8	191	44	- (3)			
5D9	161	14	- (3)			
5G3	195	47	- (3)			
5D10	218	71	+ (1)	+	+	+ (8)
5D12	193	46	+ (2)	+	+	+ (5)
5G10	163	16	+ (3)	+	+	+ (6)
6H2	186	39	- (1)			
5H2	156	9	+ (1)	+	+	+ (5)
5H3	207	60	- (2)			
8C5	301	154	- (1)			
5H11	258	111	- (2)			
8F12	371	224	- (2)			
8G11	343	164	+ (1)	+	+	+ (7)
7C7	146		- (4)			
1C8	223		- (4)			

Les tests ELISA ont été effectués conformément à matériel et méthodes. Les immunoblotting ont été effectués après transfert de 8 électrophorèse sur Gel d'acrylamide en présence de SDS numérotés de (1) à (8) .

Les poids moléculaires sont déterminés à partir d'un étalon par gel .

Pour (1) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi sont de 39 800 et 52 480 .

(2) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi sont de 50 000 et 61 000 .

- (3) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi sont de
84 900 et 45 000 .
- (4) , aucun antigène du Golgi n'est mis en évidence .
- (5) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi (G) sont
pour le 5D12 51 200 et 36 300 .
5H2 51 200 et 36 300 .
de la membrane plasmique
(M) sont pour 5D12 72 000 , 51 200 et 36 300 .
5H2 51 200 et 36 300 .
de la membrane lysosomale
(L) sont pour 5D12 51 200 et 36 300 .
5H2 158 000 , 120 000 , 97 000 ,
72 000 , 51 200 et 36 300 .
- (6) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi (G) sont de
pour le 5B9 44 660 et 59 000 .
3H2 89 000 , 44 660 et 59 000 .
5G10 134 890 , 125 000 , 44 660 et 59 000 .
de la membrane plasmique
(M) sont pour 5B9 44 660 et 59 000 .
3H2 44 660 , 59 000 et 72 000 .
5G10 44 660 , 59 000 et 134 000 .
de la membrane lysosomale
(L) sont pour 5B9 44 660 et 59 000 .
3H2 44 660 , 59 000
5G10 44 660 , 59 000 et 134 000 .
- (7) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi (G) , de la membrane
plasmique (M) et de la membrane des lysosomes n'ont pu être
déterminés . Par contre on peut dire que ce sont les mêmes
antigènes qui sont reconnus pour les trois types de membrane .
- (8) , les poids moléculaires des antigènes du Golgi (G) sont de
50 000 et 61 000 .
de la membrane plasmique(M)
sont de 50 000 et 61 000
de la membrane des
lysosomes (L) sont de 186 200 , 61 000 et 50 000 .

TABLEAU 15- SYNTHÈSE DES POIDS MOLECULAIRES DES ANTIGENES CORRESPONDANT AUX HYBRIDOMES .

	GOLGI	MEMBRANE PLASMIQUE	MEMBRANE LYSOSOMALE
5D10	39 52 50 74	52 74	52 74
5H2	36 39 <u>52</u>	36 52	36 52 72 97 120 158
8G11	39 52		
1A11	50 61		
3H2	45 <u>59</u> 67 89	45 59 72	45 59
5B9	45 <u>59</u> 67 89	45 59	45 59
5D12	36 <u>59</u> 67	36 52 72	36 52
5G10	<u>45</u> <u>59</u> 85 125 134	45 59 134	45 59 134

Sont soulignés les poids moléculaires qui se retrouvent sur deux immunoblots différents .

Il serait sans doute utile et nécessaire de déterminer les poids moléculaires des antigènes par immunoprécipitation de protéines de foie de rat ou d'hépatocytes isolés marqués au préalable à la méthionine S35, à la leucine tritiée in vivo ou à l'iode 125 in vitro? Et en utilisant une électrophorèse sur gel d'acrylamide en gradient 5 - 20%. L'immunoprécipitation permet d'autre part de détecter des épitopes conformationnels et séquentiels, l'immunoblotting uniquement des épitopes séquentiels.

3.3. Recherche d'hybridomes produisant des anticorps dirigés contre d'autres protéines du Golgi.

Nous avons constaté que parmi les 4 clones étudiés³ d'entre eux quoique n'étant sans doute pas identiques quant aux épitopes reconnus étaient cependant vraisemblablement dirigés contre les mêmes protéines.

Nous avons repris un certain nombre d'hybridomes qui avaient été congelés, nous les avons retestés après re-culture en macropuits (tableau 7 et 1) et appliqué ces surnageants sur des transferts d'électrophorèse sur nitro-cellulose.

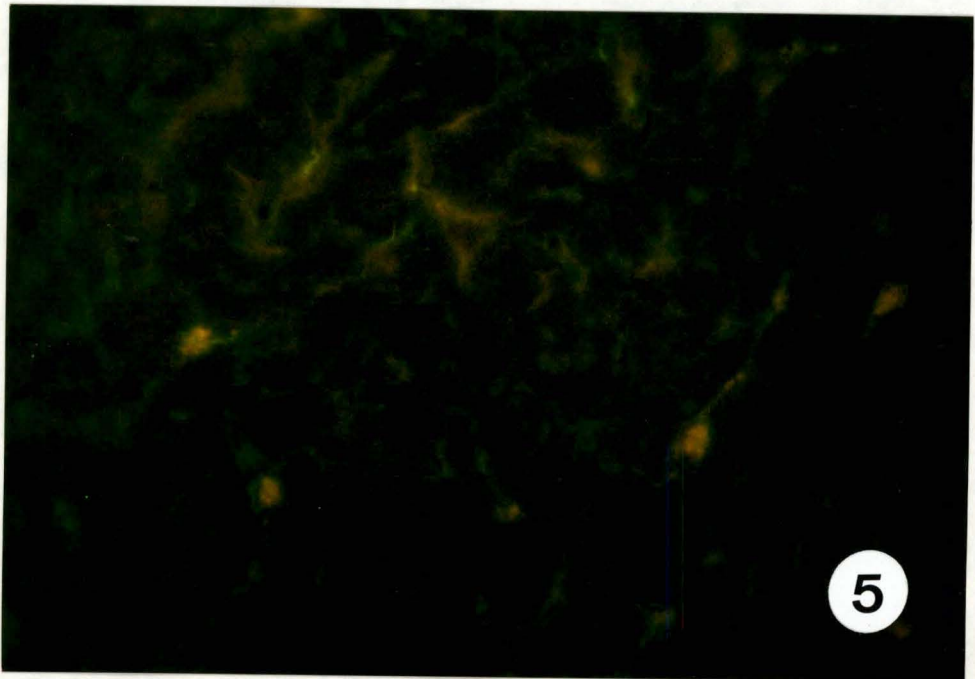
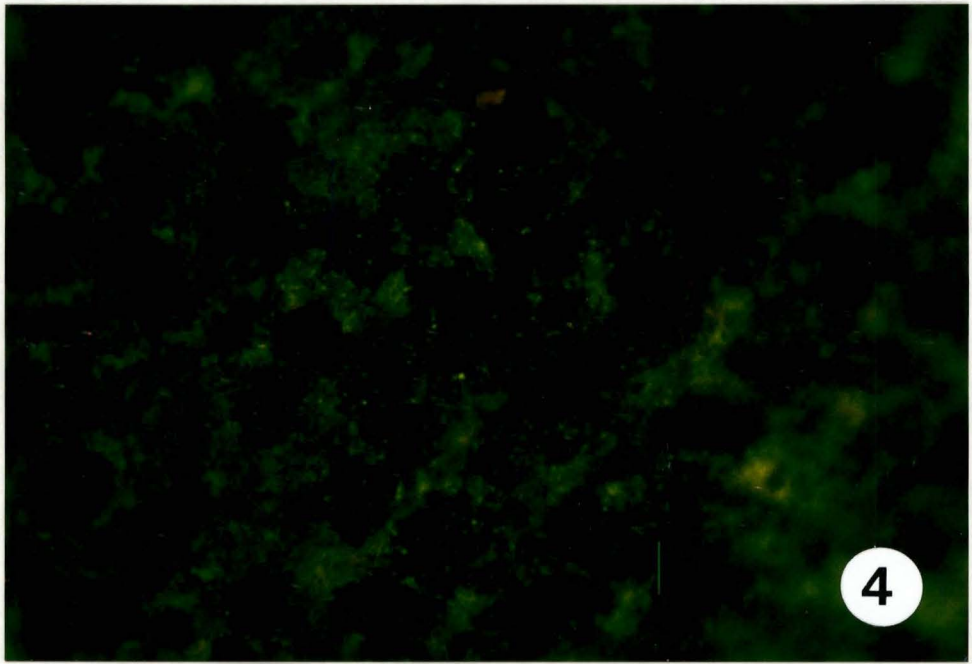
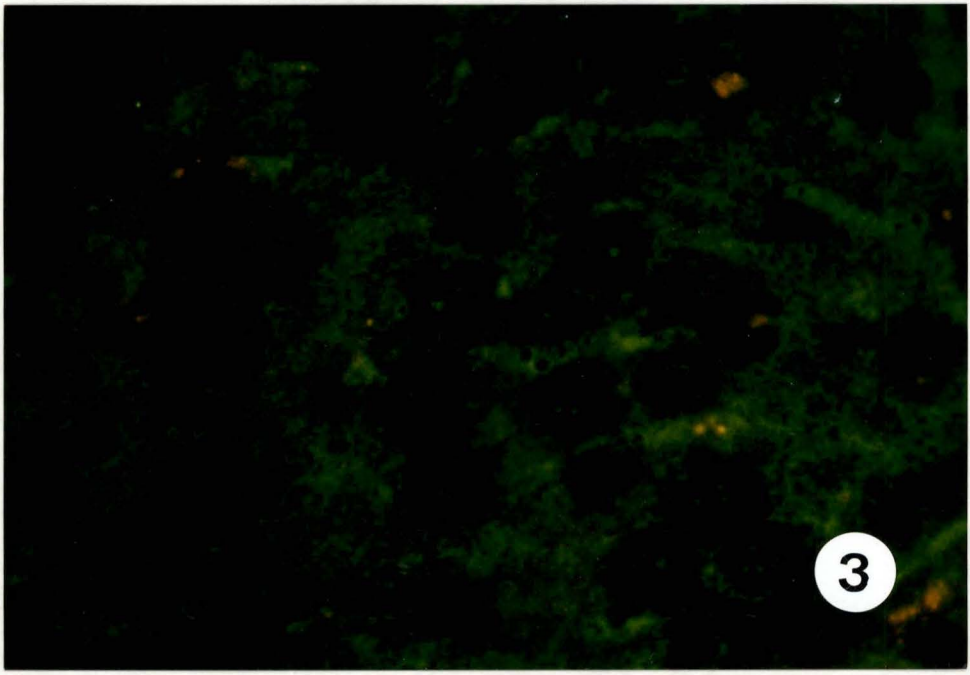
Les résultats sont repris sur le tableau 15.

Ces résultats préliminaires nous permettent d'espérer que 3 antigènes différents se retrouvent dans cet inventaire. Leurs poids moléculaires principaux seraient peut être 45, 52 et 59 kD.

45 serait peut être la sialyl transférase. Nous excluons APO A IV puisque nous retrouvons cet antigène⁴⁵ dans la membrane des lysosomes et plasmique et que APO A IV appartient au contenu sécrétoire du Golgi.

52 reste à notre connaissance indéterminé.

59 correspond peut être à la N Acetyl Glucosaminyltransférase. Ici encore il est évident que ces résultats préliminaires ne peuvent que nous engager à effectuer des contrôles supplémentaires connus, nous l'avons envisagé plus haut.



4. Caractérisation des antigènes correspondant aux clones immunocytochimie (photos 3 à 7)

Nous avons tenté de localiser les antigènes correspondant aux anticorps monoclonaux 3G3E3 3G3D10 1H8D6 et 8C11 par immunofluorescence sur coupes à congélation (4 um) . L'anticorps fluorescent est défini par le fabricant: anti-Ig de souris - FITC .

La technique décrite par ORCI (45) permet d'affirmer que dans les conditions que nous avons utilisées (pas de fixation aux aldéhydes - fixation à l'acétone -perméabilisation par séchage de coupe) 1H8D6 est positif (photo 3) . Nous ne sommes pas en mesure de définir les structures reconnues : Il semble que le Golgi soit marqué ainsi que la membrane plasmique .

3G3D10 (photo 4) semble provoquer le même type de marquage avec en outre un pointillé fin mais nettement marqué .

3G3E3 (photo 5) est négatif de même 8C11(photo 6)(anti-corps monoclonal de contrôle)

A titre de contrôle positif le polysérum (photo 7) est à même de provoquer une fluorescence intense couvrant la majeure partie de l'hépatocyte sauf peut-être là où seraient localisés les noyaux .

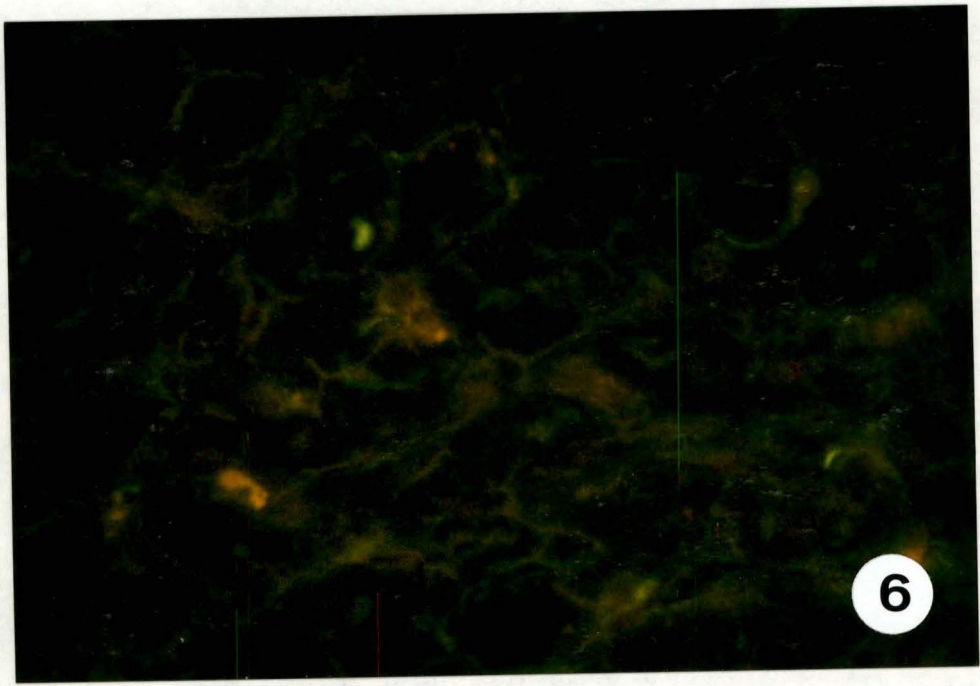
Nous avons tenté de reproduire ces résultats préliminaires par immunofluorescence . La réponse n'est pas identique .

ceci serait dû à une différence de dilution du 1er anticorps .(1/1 au lieu de 1/2)

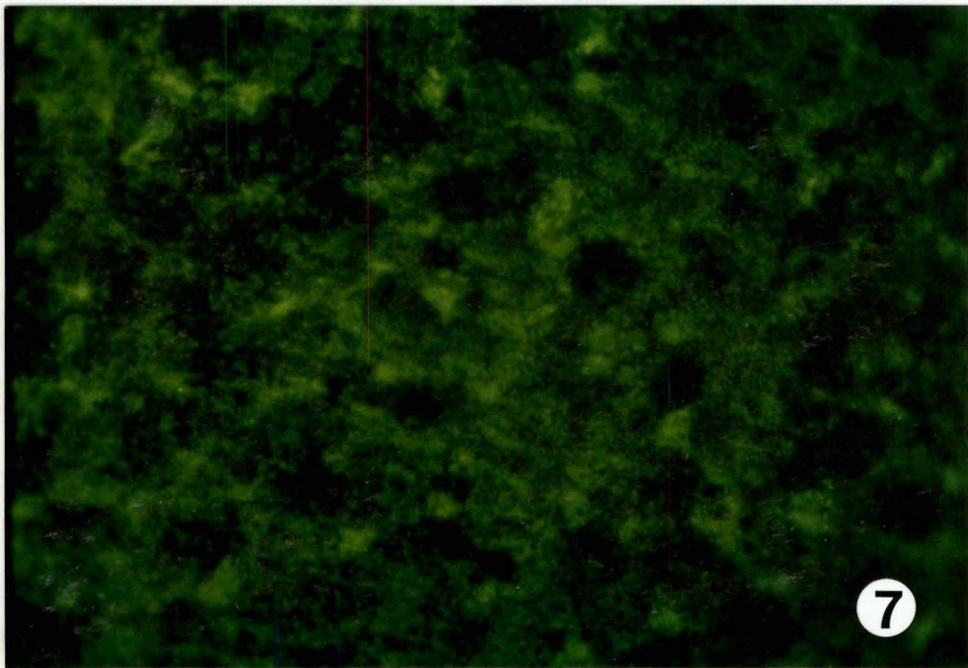
Ces résultats tout à fait préliminaires nous permettent d'espérer que 1H8D6 et 3G3D10 seraient des marqueurs morphologiques, malheureusement peu spécifiques . C'est à quoi il fallait s'attendre vu les résultats d'immunoblotting .

Il est possible toutefois que dans d'autres conditions de fixation (glutaraldéhyde formaldéhyde) des épitopes antigéniques soient altérés de façon différente suivant leur localisation intracellulaire et que de ce fait ces marqueurs anti-Golgi soient plus spécifiques . .

Le volet positif de cette réaction étendue au Golgi, aux membranes plasmiques, membranes de lysosomes est qu'une relation interorganites est établie pour un antigène donné . Il est donc nécessaire d'étendre cette étude morphologique en variant la fixation , l'enrobage , le deuxième anticorps .

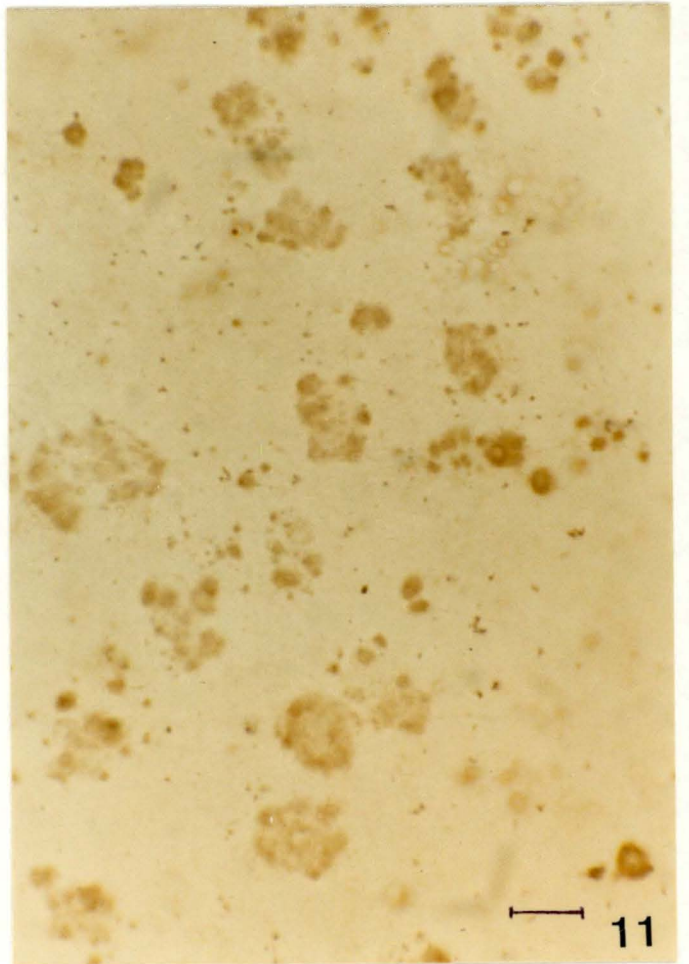
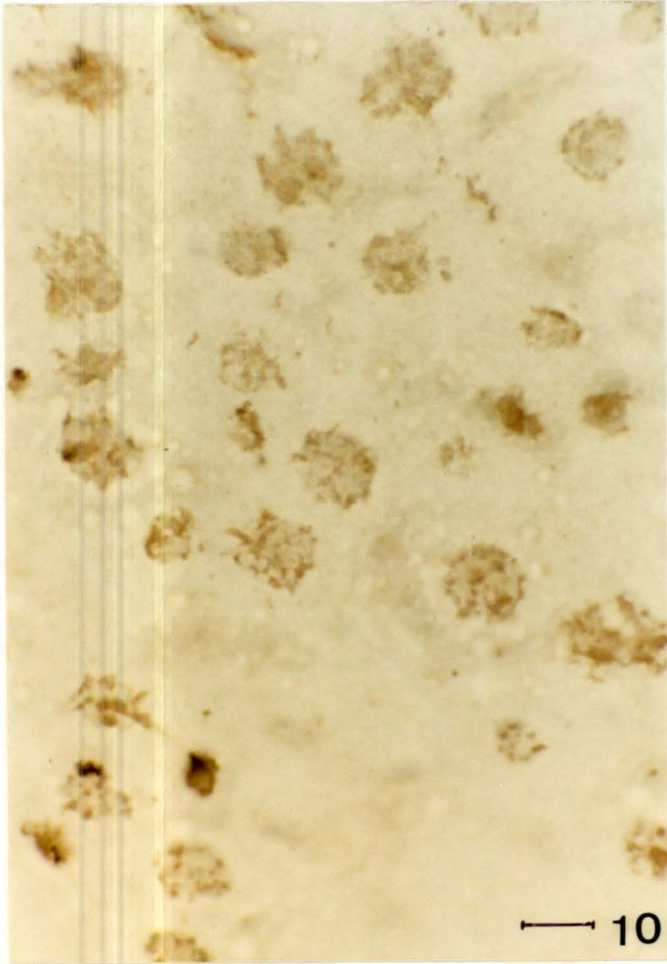
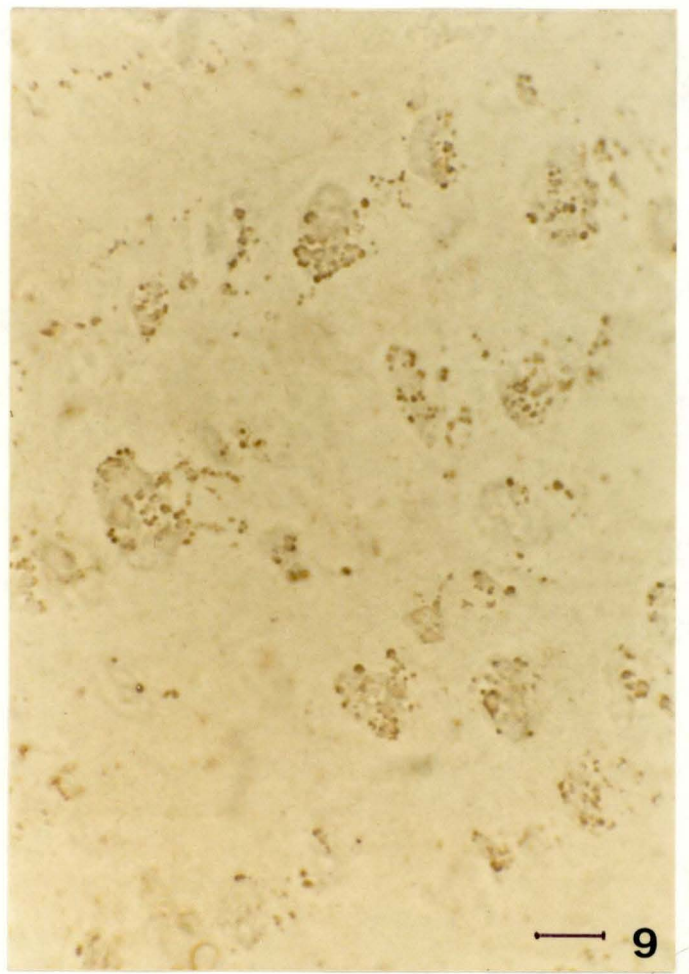
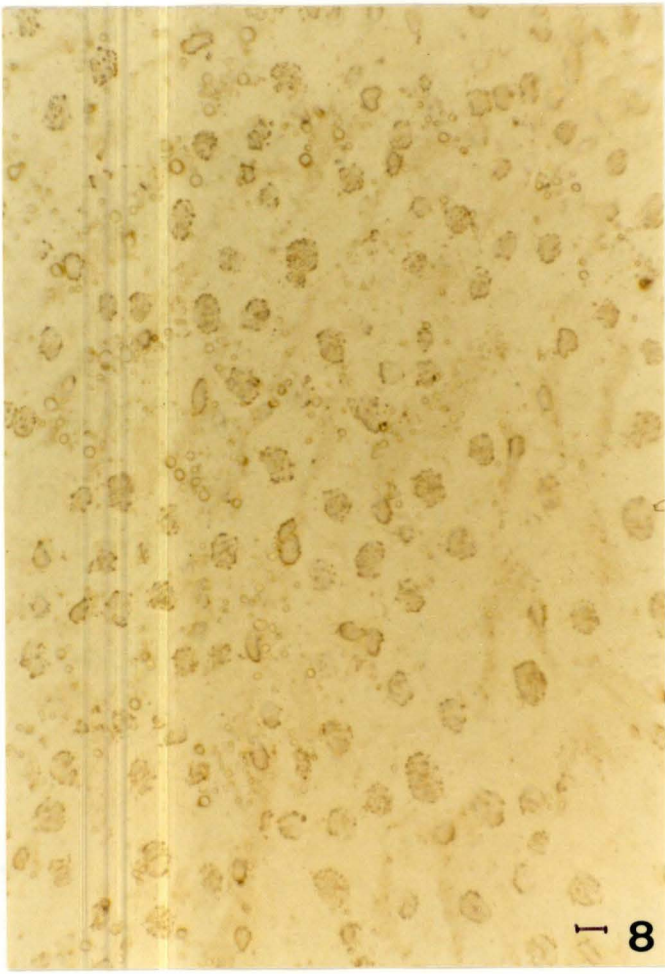


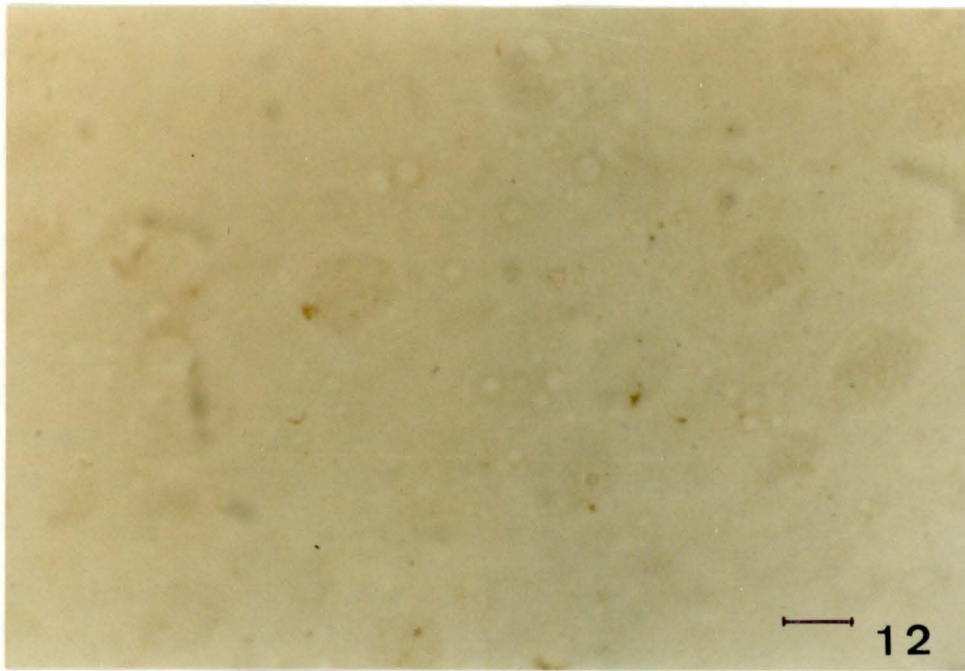
I



I

Immunofluorescence : Le trait représente 50 um.





Immunoperoxydase: le trait représente 50 um

Ces résultats en immunoperoxydase confirment ceux que nous avons établi en immunofluorescence: 1H8D6 est positif et marque ce qui semble être la membrane de petites vésicules qui appartiendraient à l'appareil de Golgi (photo 9) et la membrane de vésicules de taille beaucoup plus importante (photo 8). 3G3D10 (photo 10) de même que l'antisérum de fusion (photo 11) marque le contenu d'un ensemble qui serait aussi l'appareil de Golgi. 4E7D6 et 3G3E3 sont légèrement marqueurs des mêmes structures en immunoperoxydase (non montré). Le contrôle 8C11 (photo 12) et le sérum de fusion sont négatifs.

? *Adney* + *Pyrosoma*
+ *m. planicoma*

?

VI CONCLUSIONS GENERALES .

Nous avons obtenu en utilisant la méthode de WIBO et al (51) une fraction Golgi de foie de rat hautement purifié . Nous avons établi l'inventaire des protéines et peptides qui y sont représentés (par SDS-PAGE). Les préparations nous ont servi à immuniser des souris BALB/C .

Parallèlement nous avons purifié la membrane plasmique de foie de rat suivant la méthode de BROWN et al (40) et décrit le repertoire des protéines présentes . Nous avons aussi isolé à partir de foie de rat des membranes de lysosomes . (41)

L'immunisation de souris BALB/C par du Golgi de foie de rat a donné une réponse immunitaire . Nous avons testé les sérums produits par ELISA nous assurant auparavant que les conditions de dosage sont optimales . Après avoir procédé à la fusion de lymphocytes de rate de souris immunisées avec des cellules myélomateuses SP2 nous avons recherché la présence d'hybridomes positifs par ELISA . 3 hybridomes donnant une réponse élevée ont été clonés 4 clones ont été obtenus 3G3E3 3G3D10 1H8D6 et 4E7E9 . Ces clones donnent une réponse positives en ELISA , en utilisant la Fab peroxydase-Anti Ig G de souris. La réponse est relativement faible , cependant des contrôles (clones négatifs , omission du premier anticorps , neutralisation d'un monoclonal par une préincubation avec des membranes de Golgi) ont mis en évidence que ces clones sont réellement producteurs d'anticorps anti Golgi .

3G3E3 3G3D10 et 1H8D6 sont des immunoglobulines de type Ig M . (les tests ELISA ont été confirmés en utilisant comme deuxième anticorps l'anti ^{Ig M} biotine - avidine peroxydase)

Après transfert sur feuille de nitrocellulose après SDS-PAGE , incubation avec les différents anticorps monoclonaux et détection de ceux-ci au moyen d'immunoglobulines anti-souris couplées à la peroxydase , Nous avons déterminé le poids moléculaire des peptides antigéniques .

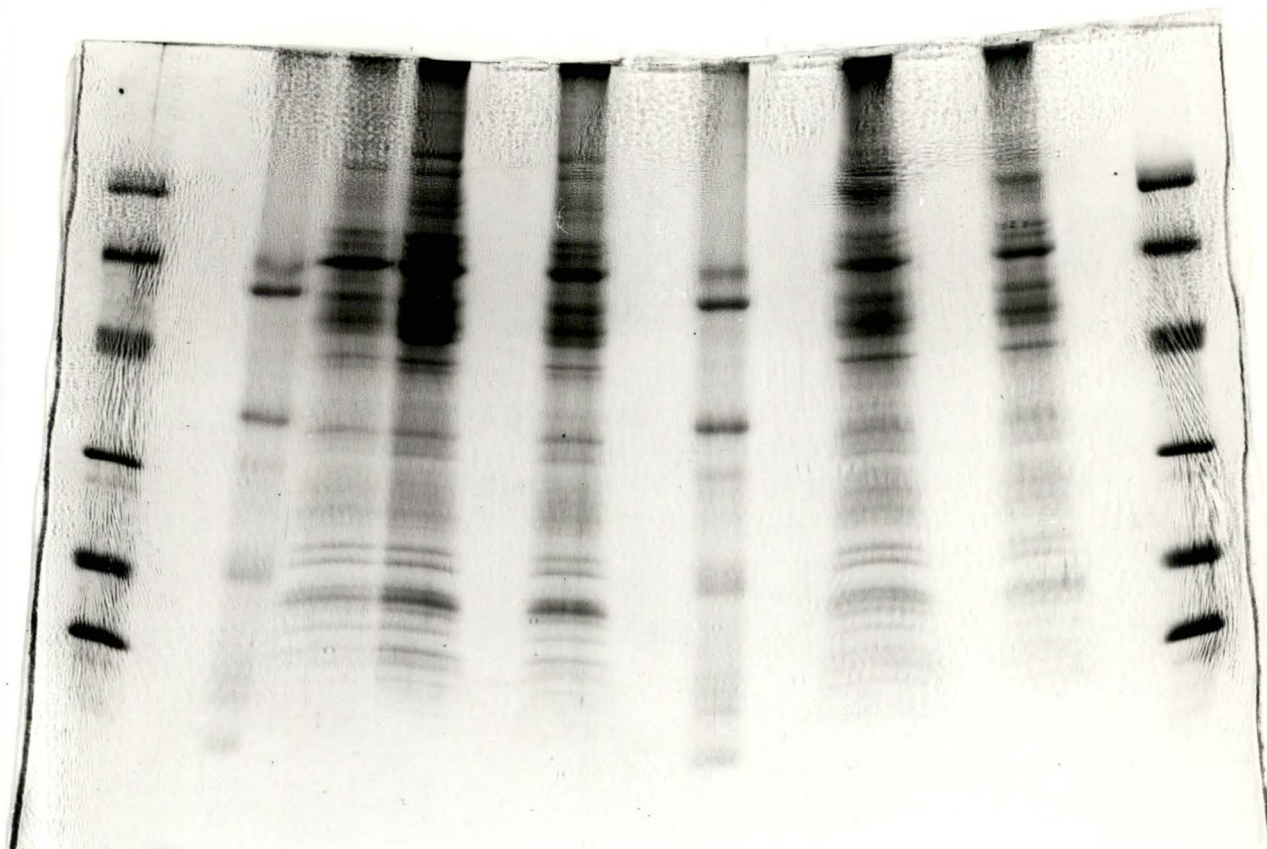
1H8D6 3G3E3 3G3D10 se fixent sur des peptides de poids moléculaires 47 et 60 kD environ . Les poids moléculaires-doublet sont proches de ceux de la N Acetyl glucosaminyl transférase I. Les anticorps monoclonaux se fixent sur les ^{mêmes} bandes présentes dans les membranes plasmiques et lysosomales; des bandes supplémentaires sont antigéniques dans les deux types de membranes .

4E7E9 se fixe sur des bandes de poids moléculaires plus faible , qui si cela se vérifiait, correspondraient à la sialyl transférase .

L'immunocytochimie par fluorescence permet d'espérer que ces anticorps seront utiles en morphologie .

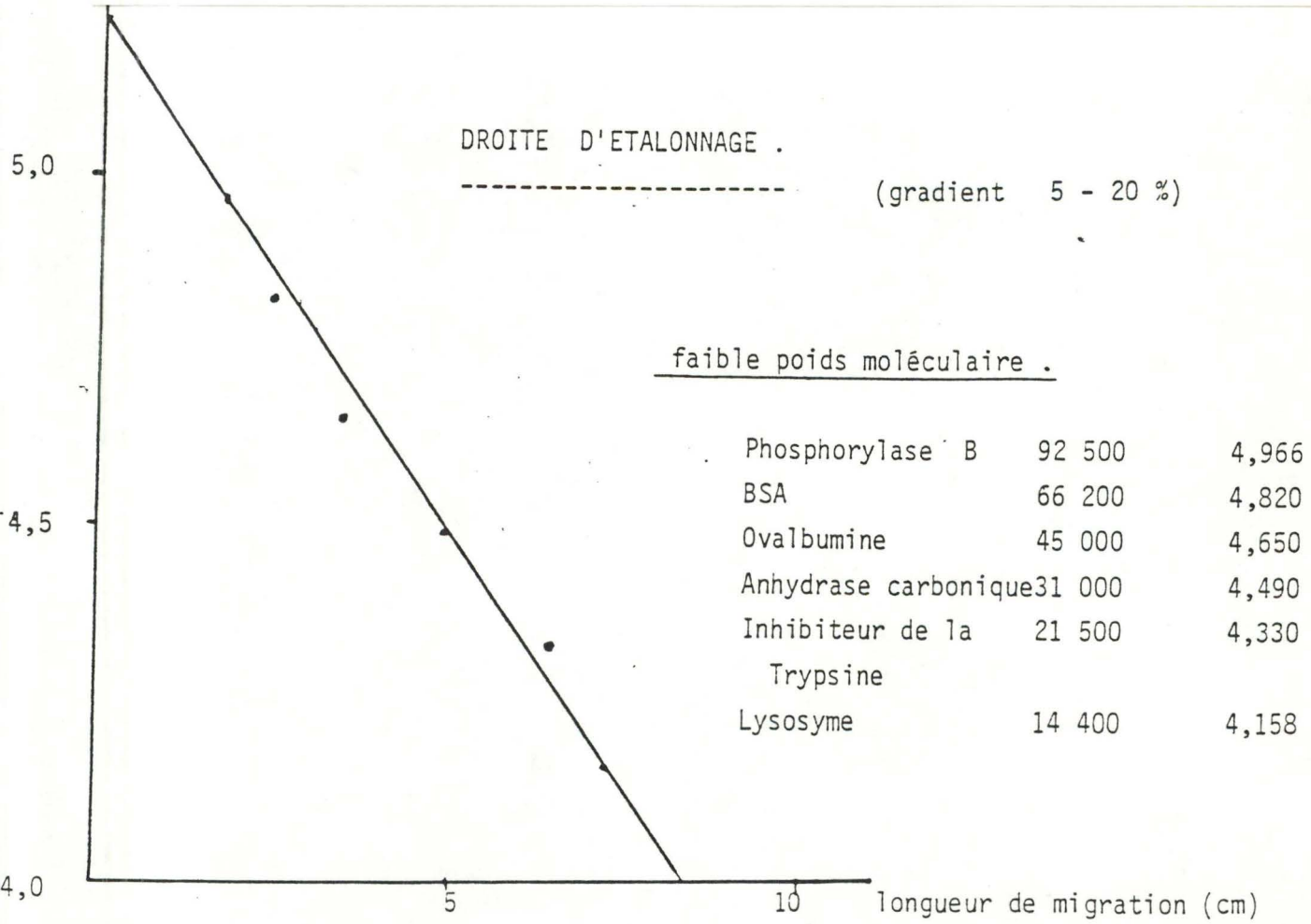
En conclusion ; nous avons pu produire des anticorps monoclonaux anti-Golgi ; ces anticorps mettent en évidence que le Golgi , la membrane plasmique et la membrane lysosomale sont toutes trois des membranes - hôtes communes pour l'antigène 47 - 60 kD . Si cet antigène était réellement la N Acetyl glucosaminyl transférase I cela signifierait que le remaniement de la glycosylation ne s'arrete pas au Golgi .

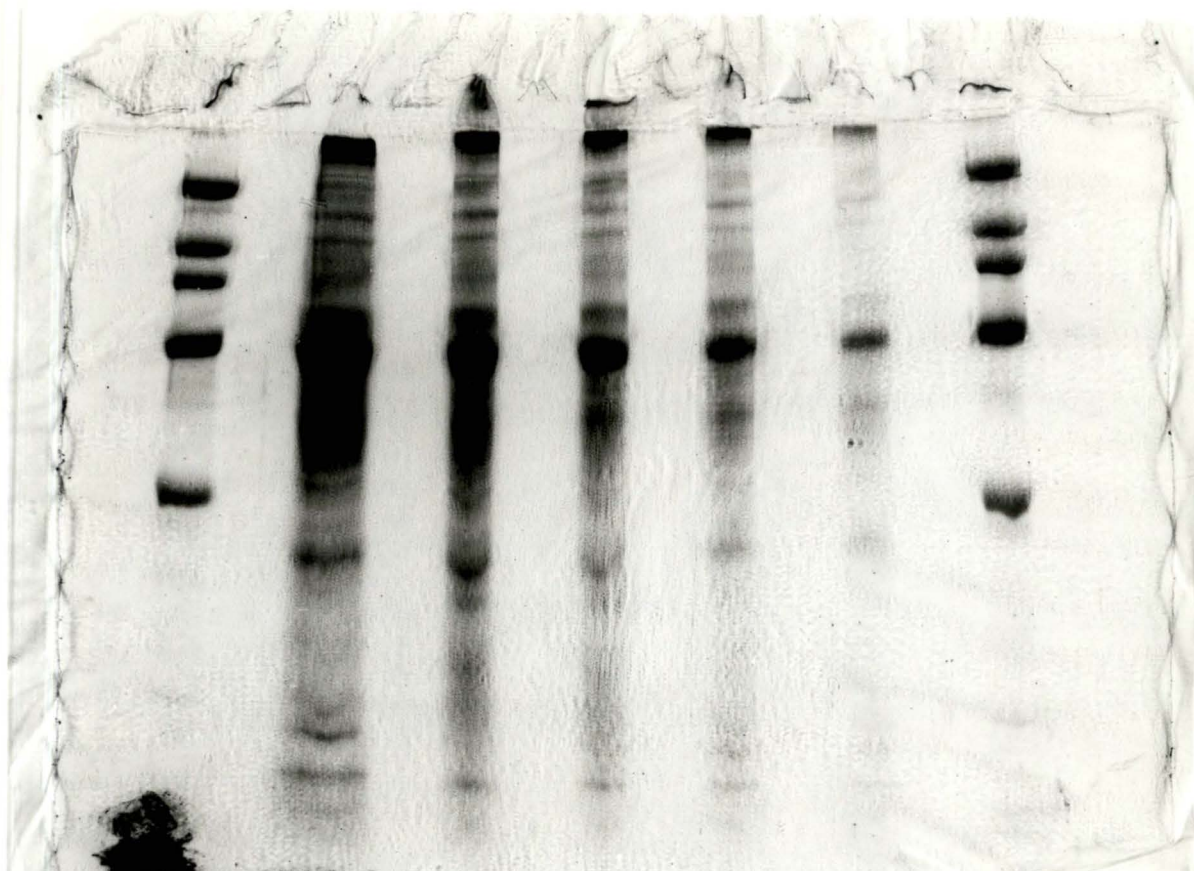
9



log I

5,3





log P

5,3

5,0

4,5

,0

DROITE D'ETALONAGE .

gel d'acrylamide à 12 % .

HAUT POIDS MOLECULAIRE .

	PM	log PM
MYOSIN	200 000	5,301
GALACTOSIDASE	116 250	5,065
PHOSPHORYLASE B	92 500	4,966
BSA	66 200	4,802
OVALBUMINE	45 000	4,652

5

10

longueur de migration (cm)

N°1 IMMUNOBLOTTING .(WESTERN Blot)

1 . Electrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % de membrane purifiée de Golgi (Galactosyl transférase ASR : 80.5)

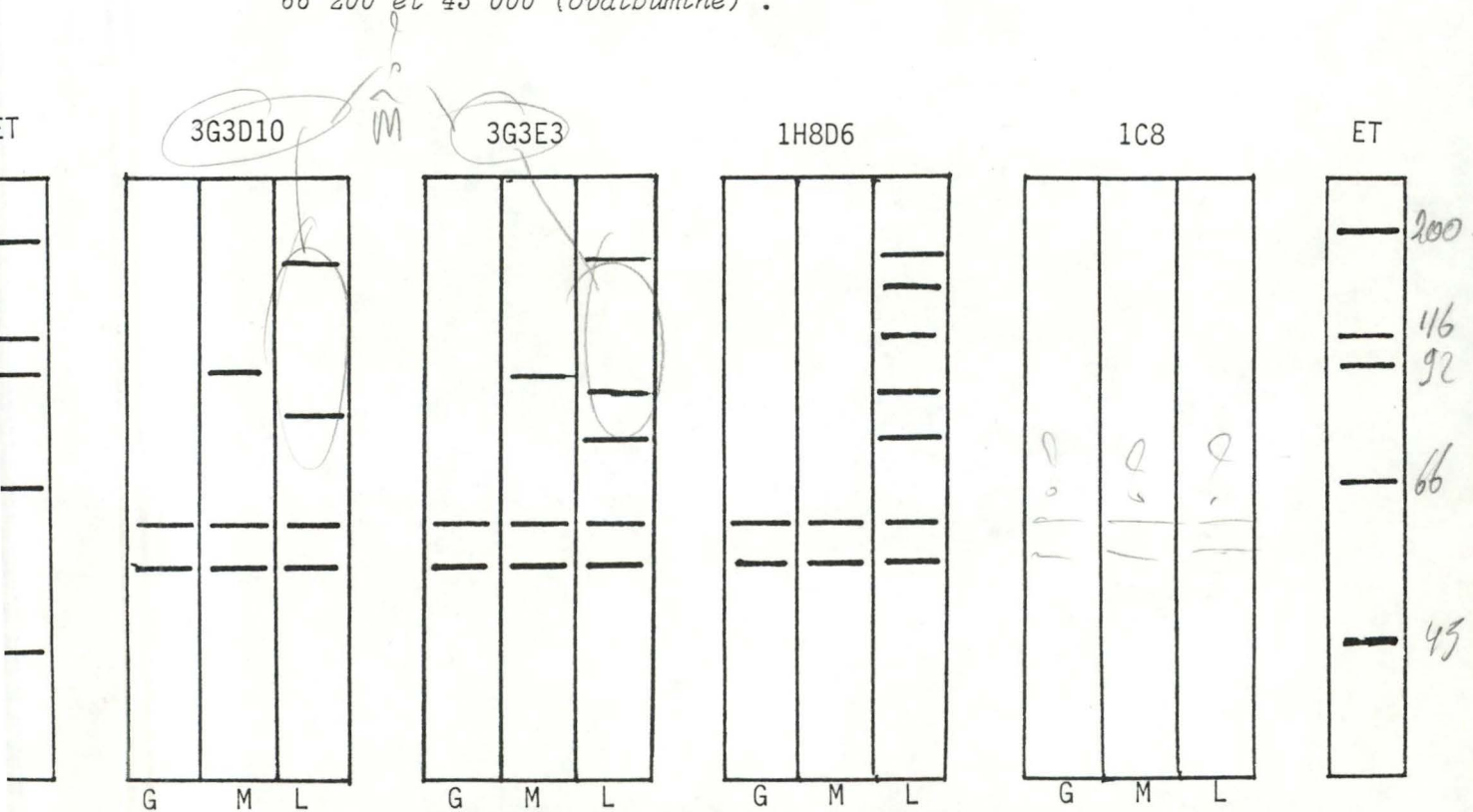
1er puits contient 80 ug de protéines (membrane de Golgi) .

2e puits contient 80 ug de protéines (membrane plasmique) .

3e puits contient 81 ug de protéines (membrane de lysosomes) .

2 . Les bandes de nitrocellulose après trasfert sont incubées avec les anticorps monoclonaux 3G3D10 , 3G3E3 , 1H8D6 et 1C8 .

Les poids moléculaires des étalons sont de 200 000, 116 250 , 92 500 66 200 et 45 000 (ovalbumine) .



N°2 IMMUNOBLOTTING .(WESTERN Blot)

1 . Electrophorèse sur gel d'acrylamide 12 % de membrane purifiée de Golgi (Galactosyl transférase ASR : 80.5)

1er puits contient 80 ug de protéines (membrane de Golgi) .

2e puits contient 80 ug de protéines (membrane plasmique) .

3e puits contient 81 ug de protéines (membrane de lysosomes) .

2 . Les bandes de nitrocellulose après transfert sont incubées avec les anticorps monoclonaux 3G3D10 , 3G3E3 , 1H8D6 et 7C7

Les poids moléculaires des étalons sont de 200 000, 116 250 , 92 500 , 66 200 et 45 000 (ovalbumine) .

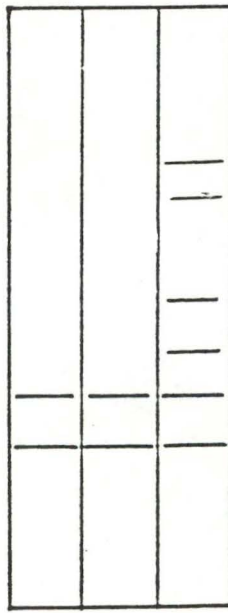
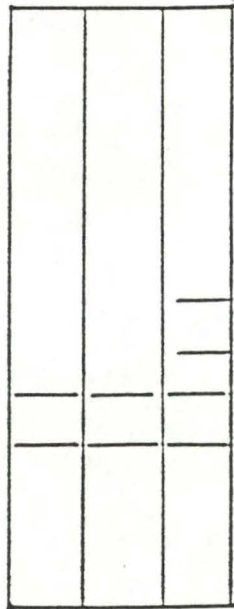
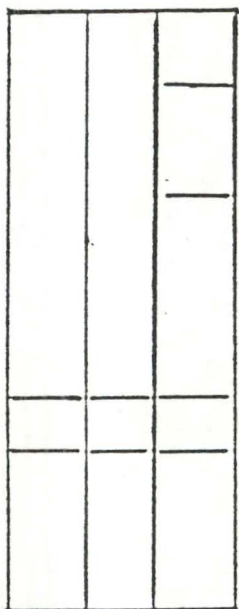
ET

3G3D10

3G3E3

1H8D6

7C7



200 000

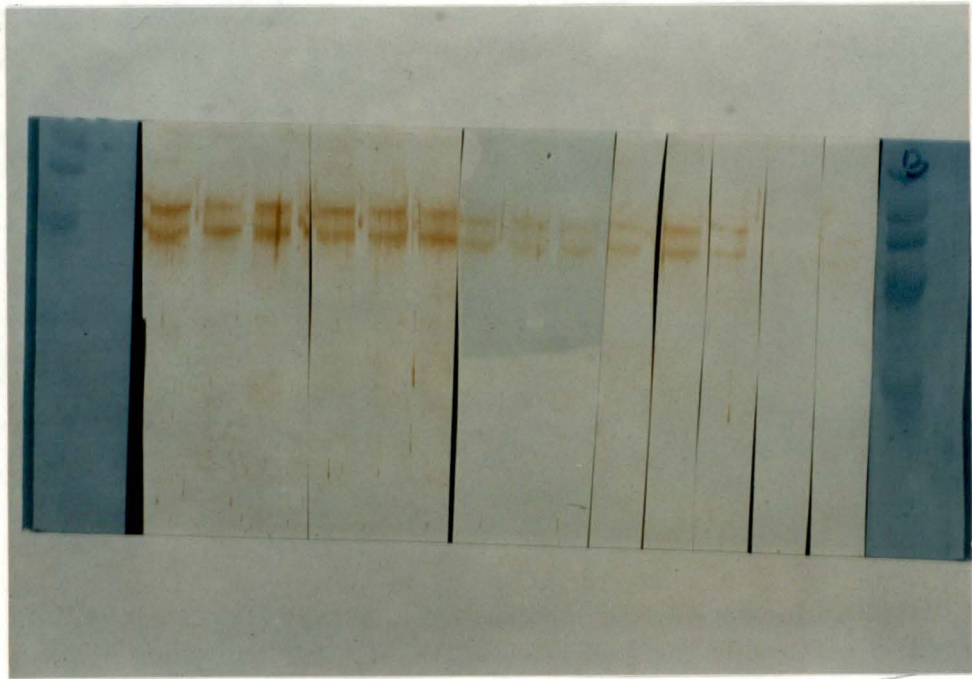
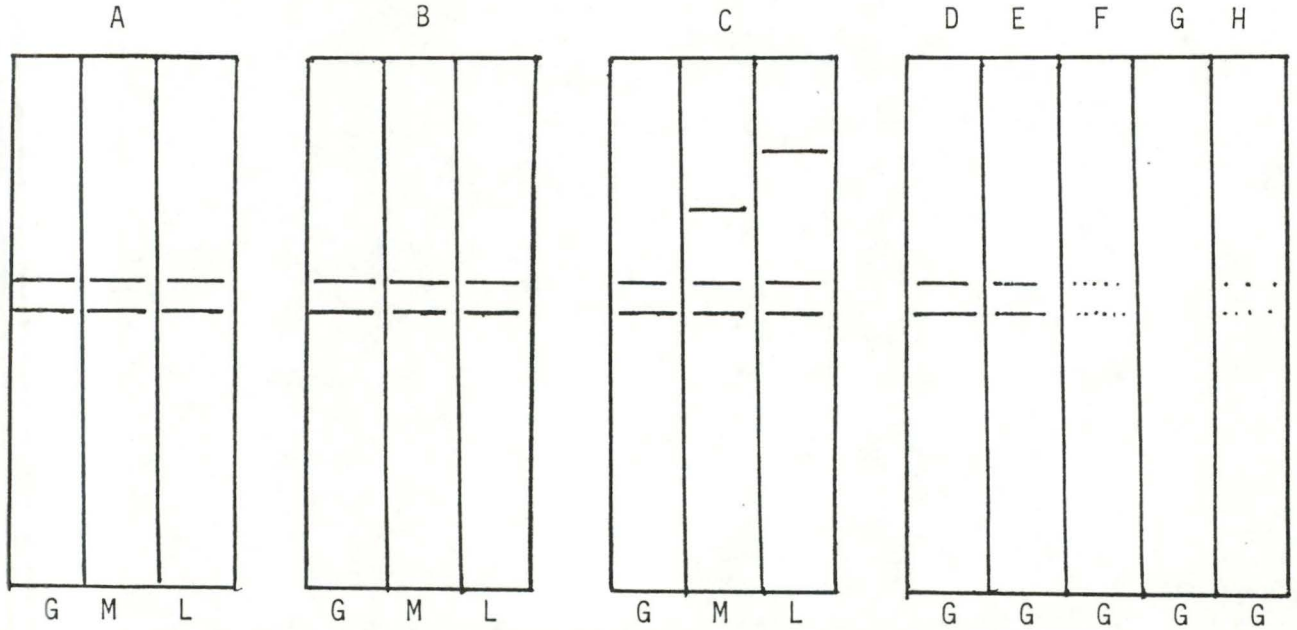
116 000

92 500

66

45

N°3 IMMUNOBLOTTING sur 3G3E3 seul et 3G3E3 préincubé avec la membrane de Golgi .

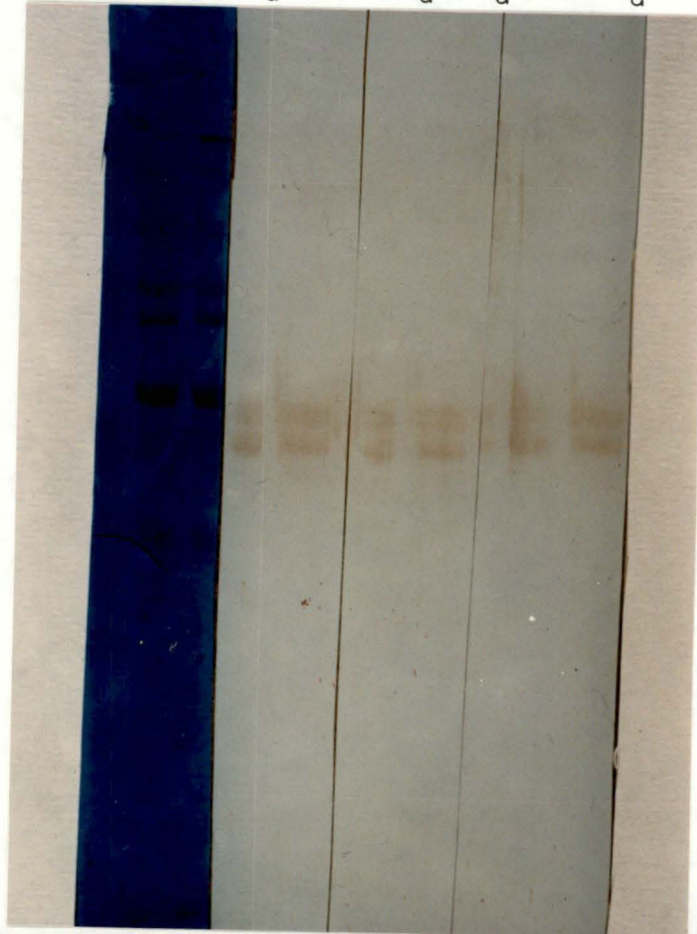
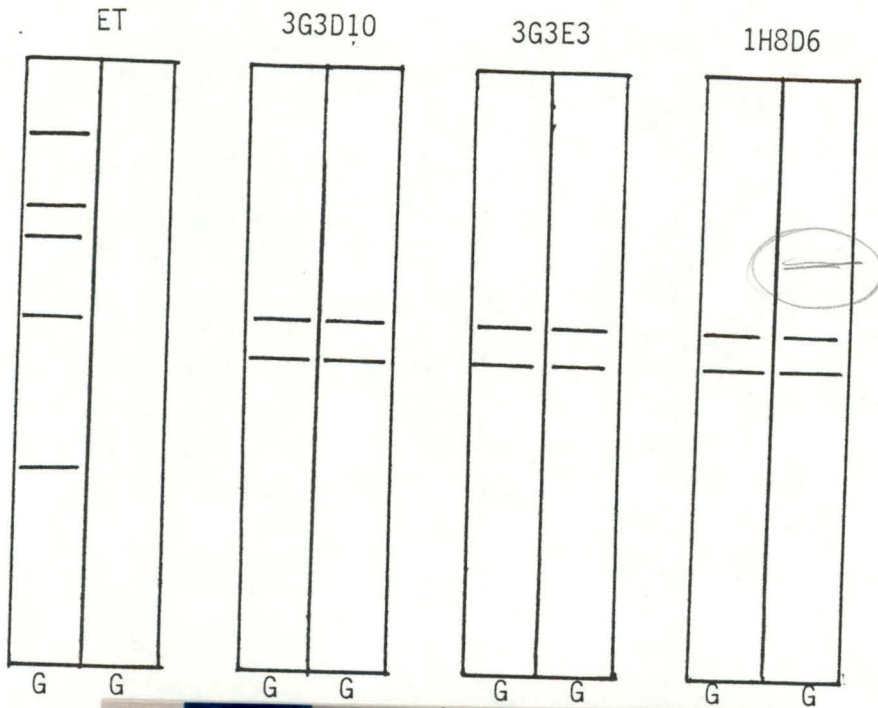


A : anticorps avant dilution limite 5D10 .
 B : anticorps avant dilution limite 1A11 .
 C : anticorps monoclonal 3G3E3 sur la membrane de Golgi, plasmique, lysosomale.
 D, E, F, G, H : l'anticorps monoclonal 3G3E3 (500ul) a été préincubé avec les membranes de Golgi purifiées à raison de 320 , 640, 960, 1280 et 1600 ug de protéines durant une heure à température normale .
 Cette mixture a été ensuite diluée 10 fois dans TRIS NaCl Ovalbumine 3% avant d'être appliquée sur les bandes de nitrocellulose .
 A B C sont testés respectivement sur le Golgi (80 ug) , la membrane plasmique (80 ug) et la membrane lysosomale (81 ug) .

Immunoblot de postcard

? en C . 3G3E3 avec de la 10*

- 1 . L'electrophorèse sur gel d'acrylamide 12% .Le premier puits d'electrophorèse contient 60 ug de membrane de Golgi purifiée.
- 2 . Les bandes de nitrocellulose après transfert sont incubées avec les anticorps monoclonaux 3G3D10 ,3G3E3 et 1H8D6 dilués 10 fois (voir matériel et methodes) dans TRIS NaCl Ovalbumine . Les poids moléculaire des etalons sont de 200 000,116 250 , 92500 , 66200 et 45 000 (ovalbumine). Les poids moléculaire des antigènes reconnus sont de 64560 et 47860 .



BIBLIOGRAPHIE .



=====

- (1) Progress in unraveling pathways of Golgi traffic
Marilyn GIST FARQUHAR
Ann. Rev. cell Biology 1985 1: 447-88
- (2) The Golgi apparatus : two organelles in tandem
JAMES E. ROTHMAN .
Science Volume 213 11 septembre 1981 .
- (3) The TRANS Golgi network : Sorting at the exit site of the
Golgi complex .
GARETH GRIFFITHS and KAI SIMONS
Science Volume 334 .
- (4) Vésicules and citernes in the trans Golgi apparatus of
human fibroblasts are acidic compartments .
RICHARD G.W.ANDERSON and RAVINDRA K. PATHAK .
Cell. vol. 40 635-643 . 1985 March .
- (5) The Golgi complex
GERARD KARP MAC GRAW-HILL
CELL BIOLOGY
- (6) L'appareil de Golgi .
JAMES ROTHMAN
Pour la science volume 97 année 1985
- (7) L'appareil de Golgi
PHILIPPE CHEVALLIER
Etude structurale et moléculaire .
La cellule
- (8) The Golgi apparatus
W.G. WHALEY
Cell. biology monographs
Volume 2 1975
- (9) Immunologie fondamentale .
A. Depelchin 1985 .
- (10) Molecular biology of the cell .
BRUCE ALBERTS , DENNIS BRAY , JULIAN LEWIS ,
MARTIN RAFFS , KEITH ROBERTS , JAMES D.WATSON .
1983 .
- (11) Phospholipids , vitamine A and ubiquinone of the Golgi
apparatus subfractions from rat liver after acute Ethanol
intoxication .
A. CASU , D.COTTALASSO , M.A.PRONZATO , U.M.MARINARI
and G. NANNI .

- (12) Microtubules and the organization of the Golgi complex .
JOHAN THYBERG and STANISLAW MOSKALEWSKI .
Experimental cell research 159 (1985) 1-16 .
- (13) Composition , stability and electrolyte permeability of Golgi
membranes from lactating - rat mammary gland .
MARK D. WHITE , SIMON WARD and NICHOLAS J. KUHN .
BIOCHEM. J. (1981) 200 663-669 .
- (14) Multiple pathways of exocytosis , endocytosis , and membrane
recycling : validation of a Golgi route .
Marilyn G. FARQUHAR .
- (15) Glycoprotéines , protéoglycanes et glycosaminoglycanes .
WILLIAM J. LENNARZ .
1980 .
- (16) Isolation and caractérisation of the Golgi complex from rat
ascites hepatoma AH.130 cells .
J.BIOCHEM . 92 725-736 (1982) .
- (17) Golgi and secreted Galactosyl transferase .
GER J. STROUS .
CRC critical review in biochemistry .
Vol 21 119-151 .
- (18) Mannose 6 phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle
between the Golgi complex and endosomes .
WILLIAM J. BROWN , JOSEPH GOODHOUSE , and MARILYN
GIST FARQUHAR .
The journal of cell biology vol 103 1986
1235-1247 .
- (19) A monoclonal antibody against a 135-kD Golgi membrane protein
BRIAN BURKE , GARETH GRIFFITHS , HUBERT REGGIO,
DANIEL LOUVARD and GRAHAM WARREN .
EMBO journal Vol 1 1982 (1621-1628) .
- (20) A monoclonal antibody that recognizes Golgi associated protein
of cultured fibroblast cells .
JIM JUNG-CHING LIN and SHARON A. QUEALLY .
Journal of cell biology Vol 92 january 1982 102-112.
- (21) The rough endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus visualized
using specific antibodies in normal and tumoral prolactin cells
in culture .
C. TOUGARD , D. LOUVARD , R. PICART and A. TIXIER-VIDAL.
Journal of cell biology volume 96 may 1983 1197-1207.

- (22) Endogenous and monoclonal antibodies to the rat pancreatic acinar cell Golgi complex .
Z.D.J. SMITH , F.D'EUGENIO GUMKOWSKI , K.YANAGISAWA
and J.D. JAMIESON .
Journal of cell biology Volume 98 June 1984
2035-2046 .
- (23) Antibodies to the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum .
DANIEL LOUVARD , HUBERT REGGIO and GRAHAM WARREN .
Journal of cell biology Vol 92 January 1982 92-10
- (24) characterisation of cytoplasmically oriented Golgi proteins with the monoclonal antibody .
Y. CHICHEPORTICHE , P. VASSALI and A.M. TARTAKOFF.
Journal of cell biology Vol 92 december 1984 .
2200-2210 .
- (25) Overview :role of intracellular membrane systems in glycosylation of proteins .
WILLIAM LENNARZ .
Methods in enzymology Vol 98 1983 .
- (26) Compartmentation of asparagine - linked oligosaccharide processing in the Golgi apparatus .
WILLIAM G. DUNPHY and JAMES ROTHMAN .
The journal of cell biology Vol 97 July 1983 .
- (27) Synthesis in vitro of intrinsic membrane proteins by free membrane - bound , and Golgi apparatus - associated polyribosomes from rat liver .
JOHN ELDER and D.JAMES MORRE .
The journal of biological chemistry Vol 251
August 1976 5054-5068 .
- (28) demonstration of an extensive TRANS-TUBULAR network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in Glycosylation .
JÜRGEN ROTH , DOUGLAS J. TAATJES
CELL Vol 43 287-295 Novembre 1985 .

- (29) Simplifying the complex Golgi .
 ALAN MICHAEL TARTAKOFF .
 T. 26 MAY 1982 .
- (30) Differential subcompartmentation of terminal glycosylation
 in the Golgi apparatus of intestinal absorptive and goblet cell
 JÜRGEN ROTH , DOUGLAS J. TAATJES .
 The journal of biological chemistry 1986 Vol 261
- (31) involvement of CIS and TRANS Golgi apparatus elements in the
 intracellular sorting and targeting of acid hydrolases to lyso-
 somes .
 NITA MINNIFIED .
 European journal of cell biology 42 92-100 1986 .
- (32) COMPARTIMENTAL organisation of the Golgi stack .
 WILLIAM G. DUNPHY and JAMES E. ROTHMAN .
 CELL Vol 42 13-21 August 1985 .
- (33) The confined function model of the Golgi complex : Center for
 ordered processing of biosynthetic products of the rough endo-
 plasmique reticulum .
 ALAN TARTAKOFF .
 Int. review of Cyto . 1983 .
- (34) Isolation of highly purified Golgi membranes from rat liver
 use of cycloheximide in vivo to remove Golgi contents .
 JANET A. TAYLOR JACOB D. JUDAH .
 BIOCHEMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 769 1984 171-178 .
- (35) purification and characterization of rabbit liver 1 ----3
 mannosidè 1---2 N-acetylglucosaminyltransferase .
 CATHERINE L. OPPENHEIMER and ROBERT L. HILL.
 The journal of biological chemistry . Vol 256
 1981 799-804 .
- (36) Topography of sialoglycoproteins and sialyltransferases in
 mouse and rat liver Golgi .
 DAVID J. CAREY and CARLOS B. HIRSCHBERG .
 The journal of biological chemistry Vol 256
 1981 989-993 .

- (37) Purification and characterization of a rat liver Golgi α -mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides
IRA TABAS and STUART KORNFELD .
The journal of biological chemistry . Vol 254
1979 11655-11663 .
- (38) Purification and characterization of mannosidase from rat liver Golgi membranes .
DAULAT RAM P. TULSIANI , DENIS J. OPHEIM and OSCAR TOUSTER .
The journal of biological chemistry . Vol 252
1977 3227-3233 .
- (39) Solubilisation and properties of Galactosyltransferase and Sulfotransferase activities of Golgi membranes in TRITON X 100.
BECCA FLEISHER and MURRAY SMIGGEL .
The journal of biological chemistry . Vol 253
1978 1622-1638 .
- (40) Improved method for the isolation of rat liver plasma membrane.
ALFRED E. BROWN , M.P. LOK and JOHN ELOVSON .
Biochimica et biophysica acta. 426 (1976) 418-432 .
- (46) Immunologie fondamentale et appliquée .
Ivan ROITT JONATHAN BROSTOFF DAVID MALE .
MEDSI medicine et sciences internationales .1985 .
- (41) Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in metrizamide gradients.
ROBERT WATTIAUX , SIMONE WATTIAUX - DE CONINCK , MARIE-FRANCE RONVEAUX-DUPAL and FRANZ DUBOIS .
J. cell BIOLOGY . 
- (42) Principles of internal medicine 11th edition . HARRISON'S
BRAUNWALD ISSELBACHER PETERSDORF WILSON MARTIN FAUCI .
Mc GRAW-HILL BOOK COMPANY . 

- (43) Biochimie bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires
ALBERT LENINGHER .
Seconde édition .
- (44) The mannose-6 - phosphate receptor for lysosomal enzymes is concentrated
in CIS Golgi cisternae .
BROWN ,W.J. and M.G. FARQUHAR .
1984 CELL Vol 36 295-307 .
- (45) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin:
its possible role in protein transport within the Golgi stack .
LELIO ORCI , BENJAMIN S. GLICK and JAMES ROTHMAN .
Cell Vol 46 171-184 1986 .
- (47) HOWELL and PALADE
The journal of cell biology Vol 92 1982 822-832 .
- (48) HOWELL and PALADE .
The journal of cell biology Vol 92 1982 833-
- (49) Immunochemical techniques for the identification and estimation of macro-
molécules .
J. CLAUSEN .
2nd, revised edition . General editors : T.S. WORK and E. WORK .
- (50) Practical immunology .
L. HUDSON and F.C. HAY .
Second edition . Blackwell scientific publications .
- (51) Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat
liver . VIII subfractionation of preparations enriched with plasma
membranes , outer mitochondrial membranes , or Golgi complex membranes .
MAURICE WIBO , DENISE THINES-SEMPOUX ...
The journal of cell biology Vol 89 juin 1981 456-474 .
- (52) Golgi fractions prepared from rat liver homogenates . I. Isolation pro-
cedure and morphological characterization .
EHRENREICH , J.H. , J.M. BERGERON , P. SIEKEVITZ and E. PALADE .
J . Cell biology 59:45-72 .
- (53) Golgi and secreted Galactosyltransferase .
GER. J. STROUS .
Reprinted from the critical reviews in biochemistry . Vol 21
pages 119-151 1986 .
- (54) topology of mannosidase II in rat liver Golgi membranes and release of the
catalytic domain by selective proteolysis .
KELLEY W. MOREMEN and OSCAR TOUSTER .
The journal of biological chemistry . 1986 Vol 261 10945-10951 ;

(55) mémoire de licence ; anticorps monoclonaux dirigés contre la membrane de lysosomes de foie de rat .

MARIE-MONIQUE GONZE .

Année 1983-1984 .