



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude préliminaire des polysaccharides libres dans les cultures en suspension de *Festuca arundinacea* (L.) Schreb

DUCHÊNE, Benoît

Award date:
1988

[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.

1988

ETUDE PRELIMINAIRE DES POLYSACCHARIDES
LIBRES DANS LES CULTURES EN SUSPENSION
DE FESTUCA ARUNDINACEA (L.) SCHREB.

Benoît DUCHENE

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Faculté des Sciences

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081-22.90.61 Télex 59222 facnam Téléfax 081-23.03.91

Etude préliminaire des polysaccharides
libres dans les cultures en suspension
de Festuca arundinacea (L.) Schreb.

Benoît DUCHENE

Résumé.

Après vérification de la cinétique de développement des cultures en suspension de Festuca arundinacea, nous entreprenons une étude préliminaire du complexe polyosidique extra cellulaire de cette monocotylée. Notre travail débute par une précipitation à l'éthanol qui fournit deux fractions dénommées culot et surnageant éthanol. Chacune de ces fractions fait l'objet de dosages calorimétriques permettant d'estimer les quantités de protéines (0,17 → 1,07 g de protéines pour 100 g de cellules sèches), d'oses neutres (0,11 → 6,01 g pour 100 g de cellules sèches) et d'acides uroniques ($5 \cdot 10^{-3}$ → $8,6 \cdot 10^{-2}$ pour 100 g de cellules sèches). Le surnageant éthanol seul est alors chromatographié sur colonne échangeuse d'ions et tamis moléculaire. Les résultats des chromatographies basse pression notifient l'absence de pics de polyosides acides et l'accentuation d'une hétérogénéité de poids moléculaire au cours du temps. Enfin, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des deux fractions décèle la présence d'une xylane peu branchée dans le culot, d'une arabinoxylane branchée dans le surnageant et de plus faibles quantités de fucose, galactose, mannose et glucose. Cette même technique appliquée aux sorties de tamis moléculaire indique que l'accentuation de l'hétérogénéité de poids moléculaire avec le temps provient sans doute de l'hydrolyse d'un

seul polysaccharide. Des essais de séparation d'oses neutres par HPLC sont également réalisés. Dans l'ensemble, ils offrent de bons résultats, sauf pour glucose et galactose qui ne sont pas résolus sur nos colonnes. Comme ces deux hexoses sont présents dans nos complexes polysaccharidiques, aucune autre analyse utilisant cette technique n'est effectuée.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 1988
Laboratoire de Biotechnologie Théorique
Promoteur : P. V A N C U T S E M

J'adresse mes plus vifs remerciements
à Monsieur le Professeur Van Cutsem
pour l'accueil dans son laboratoire et
pour l'aide qu'il m'a apportée tout au
long de ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement
Michel Cereghetti, Albert Charlier,
Michel Voué, Pierre Cambier ainsi que
MM. Delaive, Burlet et Bouchat pour
leur collaboration efficace et dévouée.

Je remercie également Monsieur le Professeur
Krief pour l'accès à son laboratoire.

J'adresse un merci tout spécial à
Geneviève, Mme Renard et M. Duchêne
qui se sont chargés de la dactylographie.

Je m'en voudrais d'oublier ma famille
pour son soutien moral et matériel sans
lequel ce travail n'aurait jamais pu
être réalisé.

Table des matières

INTRODUCTION

1. Historique	1
2. La culture in vitro	3
3. La culture en suspension	3
4. La paroi végétale	6
5. Méthodes d'analyse des polysaccharides	11
6. Intérêt de l'étude des polysaccharides extracellulaires et travaux antérieurs	13
7. Démarche de travail	16

MATERIEL ET METHODE

1. Cultures de cellules	19
2. Protocole général employé pour l'étude de la cinétique de développement des cultures	20
3. Obtention des polysaccharides extracellulaires	22
4. Techniques utilisées pour l'étude du complexe polysaccharidique extracellulaire	23

RESULTATS ET DISCUSSION

- Préliminaire : Vérification rapide de la cinétique de développement de la culture des cellules de <i>Festuca arundinacea</i>	35
1. Etude de la dynamique d'excrétion des polysaccharides extracellulaires au cours du temps	36
2. Caractérisation globale des polysaccharides excrétées.	37

<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	45
---	----

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

I. Historique

En 1839, Schwann, au travers de l'énoncé de la théorie cellulaire, posa les premiers jalons de ce qu'Haberlandt dès 1902 dénommera "la culture in vitro des tissus végétaux". Par cette théorie, Schwann exprima notamment l'idée que chaque cellule d'un organisme multicellulaire pouvait, à condition de se trouver dans un environnement adéquat, réaliser un développement indépendant basé sur une succession de mitoses (pas de méioses) (1). De plus, les cellules végétales matures sont exceptionnelles par leur aptitude à se différencier. Elles donnent naissance à des cellules totipotentes dont la descendance produit des types cellulaires matures complètement différents voire un organisme complet (2).

Avant de poursuivre, il nous paraît intéressant de réaliser une distinction entre la culture d'organes et la culture de tissus. Dans le premier cas, par exemple une culture de racines, le matériel cultivé maintient son identité morphologique de racine in vivo (1). Par contre, selon Street (3), le terme "culture de tissus" peut être attribué à n'importe quelle culture multicellulaire grandissant en milieu solide. L'illustration typique de ce genre de culture est la culture d'un tissu sous forme de cal (masse de cellules en division intense peu ou pas différenciées) (1) qui n'a aucun équivalent structural ou fonctionnel avec le tissu prélevé sur le corps de la plante.

La première culture de tissus fut réalisée, avec succès, par Gautheret en 1939, à partir de tissu

cambial isolé de carottes. Ses résultats expérimentaux, ainsi que ceux de Nobécourt et White (1), firent apparaître l'importance, d'une part, d'une vitamine hydrosoluble (la thiamine ou vitamine B1) et, d'autre part, d'une hormone de la famille des auxines (l'acide indole-3-acétique ou AIA) (1). Il s'avère correct de parler des auxines car, en plus de l'AIA qui est l'hormone végétale, il existe une série de composés synthétiques (régulateurs de croissance) à action auxinique tel que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (4).

Dans les années cinquante, Skoog et Miller (1) découvrirent une autre classe d'hormones : les cytokinines. Ce groupe de composés aminopuriques substitués en position 6 (kinétine, zéatine, isopentyl adénine...) stimule la division cellulaire. En 1957, ces mêmes chercheurs avancèrent l'hypothèse que l'initiation de tiges ou de racines dans les cals en culture pouvait être régulée en variant le rapport d'auxine et de cytokinine dans le milieu (1). Cette hypothèse et l'utilisation indispensable de la thiamine HCl dans le milieu de culture constituent deux grands principes généraux de la culture in vitro. Si le rapport $\left(\frac{\text{auxine}}{\text{cytokinine}}\right)$ est supérieur à 1, la maturation cellulaire s'orientera vers le développement de racines. Par contre, si ce rapport est inférieur à 1, la formation de parties aériennes sera promue (5) (6).

Après les balbutiements et les premiers essais de cultures de tissus du début du siècle, les physiologistes possédaient, au début des années soixante, une connaissance et une expérience suffisantes qu'ils pouvaient mettre en pratique au travers de diverses techniques de culture in vitro.

2. La culture in vitro

Ce moyen de culture offre deux orientations différentes : le clonage, ou multiplication conforme, et la variation (fig. I). Dans le premier cas, le but est de produire des individus strictement identiques aux parents. Pour ce faire, le matériel de départ utilisé est un amas cellulaire non différencié (méristème, bourgeon latéral...). Quant à la variation (mode de multiplication in vitro), elle introduit dans la descendance des variations génétiques (modification du nombre de chromosomes) ou épigénétiques (matériel génétique inchangé mais expression génique différente). Le matériel de départ est un tissu mature (feuille, tige ou racine) qui peut suivre :

a. une morphogenèse directe où deux approches sont possibles : - l'organogenèse (5) (6) : formation de racines ou de parties aériennes à partir de petits amas cellulaires organisés.

- l'embryogenèse somatique (5) (7) : développement d'un embryon à partir d'une seule cellule somatique.

b. une morphogenèse indirecte où le tissu subit la callogenèse, c'est-à-dire la prolifération d'une masse de cellules de type parenchymateux qui peut ensuite être utilisée pour l'embryogenèse somatique, l'organogenèse ou l'utilisation de cultures en suspension (8).

3. La culture en suspension

Cette technique étant le fondement de notre travail, il nous paraît intéressant de nous y attarder.

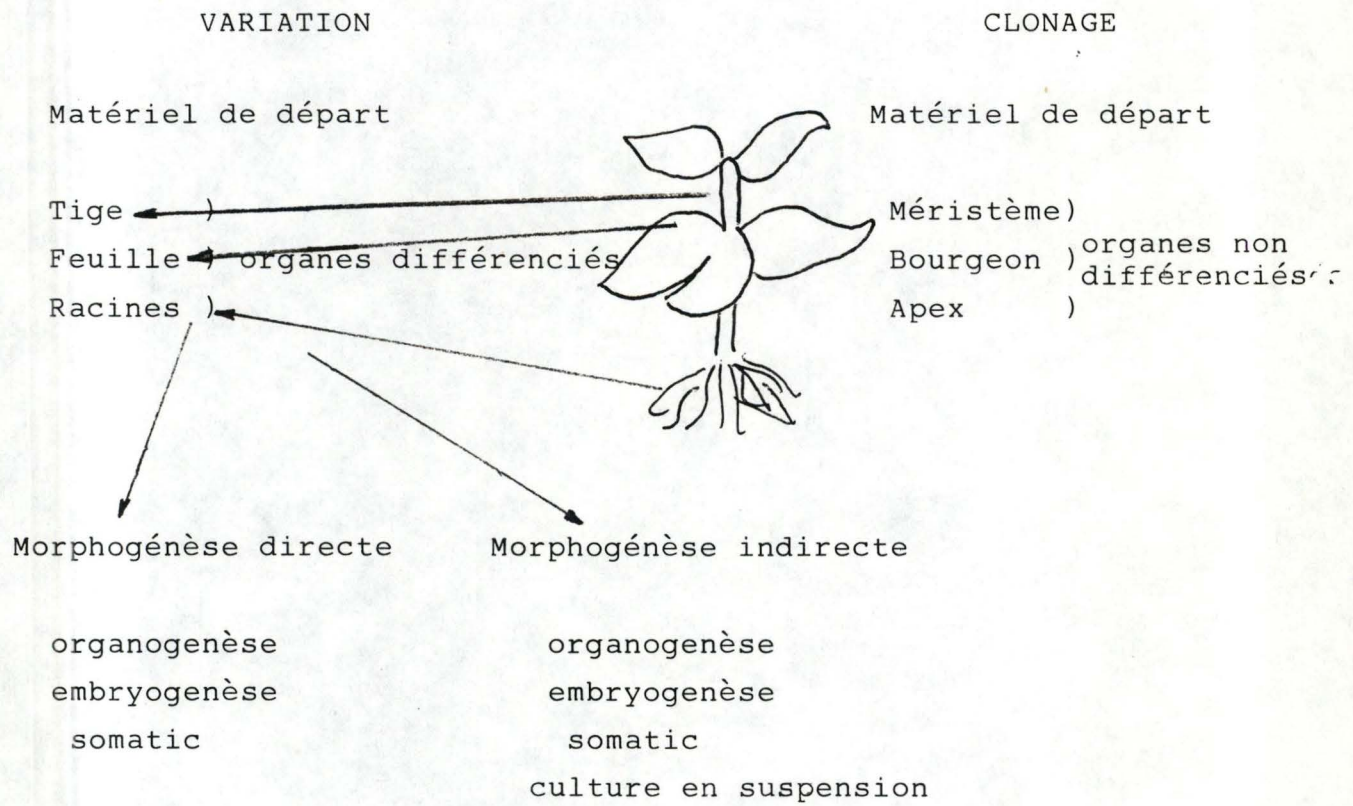


fig. 1 : Schéma général des orientations de la culture in vitro.

3.I. Principes généraux

En 1953, Muir démontra que des fragments de cals, transférés dans un milieu liquide aéré par un agitateur, donnaient une suspension de cellules isolées et agrégées qu'il était possible de propager par repiquage (I).

Les cellules en suspension possèdent un certain nombre de caractéristiques (9) :

- a. elles sont fortement séparées mais l'individualisation n'est jamais complète.
- b. leur morphologie est très homogène.
- c. le noyau est clairement visible et le cytoplasme est dense, surtout chez les petites cellules.
- d. elles présentent fréquemment des grains d'amidon dans le cytoplasme.
- e. le temps de génération est beaucoup plus lent que chez les espèces bactériennes (E. coli : 20 minutes ; cellule végétale : de 24 à 72 heures).
- f. il existe une ^{tendance} générale de ^{perte de} totipotence après un nombre variable de repiquages. Ceci se traduit par l'incapacité des cellules à régénérer un tissu ou une plante. Cependant, ces cellules peuvent servir comme producteur de métabolites secondaires (10) ou comme modèle pour les études physiologiques (II).
- g. l'habituation aux hormones : en général, les cellules végétales isolées synthétisent des hormones en trop faible quantité pour permettre un bon développement ; c'est pourquoi, dans les techniques de culture in vitro, des régulateurs de croissance sont ajoutés. L'habituation découle de cet apport exogène : il arrive que les cellules soient stimulées par ces molécules et accroissent leur production d'hormones endogènes. Dès ce moment, l'absence de régulateurs de croissance lors d'un repiquage ne porte plus à conséquence. Les cellules assurent l'apport des facteurs

de croissance jusqu'au repiquage suivant (9).

La culture des suspensions peut se réaliser selon un mode continu ou discontinu (batch). Dans la culture en batch, les cellules se développent par remplacement de la suspension en erlen dans un volume fixe de milieu renouvelé périodiquement dans des rapports 1/1, 1/4, 1/10 (suspension milieu frais)... (12). En système continu, il existe un flux de milieu nutritif traversant la culture, et le système peut être fermé (pas de prélèvement de biomasse) ou ouvert (chémostat ou turbidostat) (10).

L'agitation est importante dans la culture in vitro des suspensions cellulaires. Elle permet de résoudre les problèmes de diffusion liés principalement à la couche d'eau immobile présente autour de la paroi à l'interface milieu-cellule. En outre, elle agit sur la taille des colonies, induit un stress favorable à la production de métabolites secondaires et permet les échanges gazeux (10).

3.2. Intérêt de la culture en suspension

Les suspensions cellulaires de plantes supérieures constituent un matériel expérimental valable pour de nombreuses études physiologiques (13). De plus, les cultures de cellules représentent à l'heure actuelle une source potentielle très prometteuse de métabolites secondaires (composés synthétisés par la cellule végétale, non indispensables à sa survie (12)) d'importance commerciale (11). Enfin, l'utilisation de cellules cultivées in vitro, par la technique des suspensions cellulaires, répond à la demande d'un matériel végétal uniforme et présente l'avantage de fournir des masses cellulaires importantes permettant l'isolement de fractions subcellulaires. Ce dernier

point est particulièrement intéressant. En effet, bien que les suspensions cellulaires soient éloignées de la plante mère d'un point de vue physiologique, elles constituent néanmoins un excellent modèle biologique pour l'étude structurale des polysaccharides extracellulaires constitutifs des parois primaires (II).

4. La paroi végétale

La paroi de la cellule végétale est une forme spécialisée de matrice extracellulaire appliquée étroitement à la surface externe de la membrane plasmique de cette cellule. La plupart des cellules animales possèdent également des composés formant une matrice extracellulaire à leur surface, partie intégrante de leur revêtement cellulaire ou glycocalyx. Mais la paroi végétale est généralement plus épaisse (de $0,1\mu\text{m}$ à plusieurs μm), plus solide et surtout plus rigide. Les rôles de la paroi cellulaire végétale sont multiples :

- a. elle détermine la taille et la forme des cellules végétales et donc des tissus (I3).
- b. elle protège l'organisme contre la déshydratation et les chocs osmotiques (I4).
- c. elle représente une barrière physique aux micro-organismes et autres agents nuisibles (I3).
- d. elle constitue une réserve de précurseurs d'une classe de substances qui une fois libérées sont capables de commander toute une série de fonctions végétales (I5).
- e. elle exerce un contrôle sur la composition ionique de la phase liquide absorbée et transportée dans le végétal.

Les parois sont responsables de fonctions qui, chez l'animal, sont remplies par le squelette, la peau et le système circulatoire. Dès lors, il n'est pas surprenant que, pour remplir toutes ces fonctions, des parois cellu-

lares de composition et de structure différentes aient été développées. Il est donc impossible de définir une paroi cellulaire type.

4.1. Paroi primaire et paroi secondaire

La paroi d'une cellule en croissance est appelée paroi primaire. Afin de ne pas entraver le développement de la cellule, elle est plus mince et semi-rigide. Elle se compose de microfibrilles de cellulose (20 à 30 % de son volume) plongées dans une matrice formée de glycoprotéines (10 %) et de polysaccharides tels les hémicelluloses et les pectines dont les structures complexes ne sont pas encore complètement définies (16). Le principe architectural fondamental intervenant dans ce cas est identique à celui utilisé dans des matériaux de construction courants tels que les fibres de verre ou le béton armé (15).

La paroi secondaire est, quant à elle, une structure mécanique statique qui détermine la forme et la taille d'une cellule mature. La cellulose y est relativement plus abondante que dans les parois primaires. Cette paroi contient également des quantités significatives de lignine (13).

4.2. Les polysaccharides constitutifs de la paroi primaire

Les polysaccharides constitutifs de la paroi primaire sont répartis en trois classes : la cellulose, les hémicelluloses et les pectines.

4.2.1. La cellulose

Il s'agit d'un homopolysaccharide linéaire non ramifié, formé de 10.000 (voire plus de 10.000) unités de

D glucoses unies par des liaisons glycosidiques I \rightarrow 4 en configuration β (I7) (fig. 2).

4.2.2. Les hémicelluloses

Ce sont des polysaccharides ramifiés, variés, qui ne sont ni des pectines ni de la cellulose. Xyloglucanes, xylanes et β glucanes constituent trois classes d'hémicelluloses.

a. Les xyloglucanes : leur structure de base consiste en un squelette de β -I, 4-D glucose portant des chaînes latérales de D xyloses liés en α -I,6 (fig.3). Ces polymères constituent 20 % des polysaccharides de la paroi des dicotylées et seulement 2 % chez les monocotylées (I6).

b. Les xylanes : ils sont constitués de D xyloses reliés en β -I,4. Des chaînes latérales riches en arabinofuranoses peuvent être greffées au niveau des C2 ou C3. En faible quantité chez les dicotylées, ils forment la principale hémicellulose des monocotylées (I6) (fig. 4).

c. Les β -glucanes : ces polysaccharides sont composés d'un mélange de β -I,3 et β I,4 glucoses. Ils sont absents chez les dicotylées mais présents chez les monocotylées, exclusivement chez les graminées (I6).

4.2.3. Les pectines

Il s'agit de polysaccharides hétérogènes ramifiés et très hydratés qui contiennent de nombreux résidus d'acide galacturonique chargés négativement (fig. 5). Les pectines sont présentes dans la paroi primaire (où elles sont les principaux composants de la matrice à côté des hémicelluloses) ainsi que dans la lamelle mitoyen-

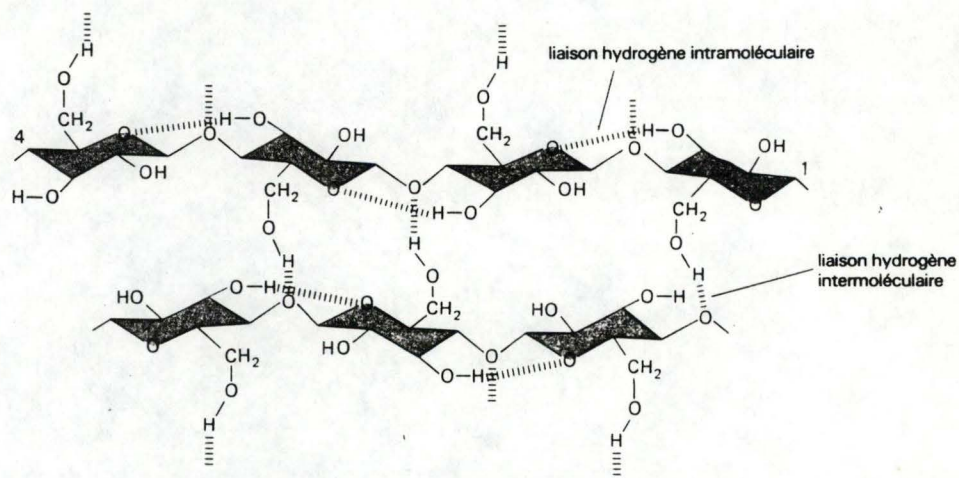


fig. 2 : Deux chaînes de cellulose formées de résidus glucose liés en β 1 \rightarrow 4. Des liaisons hydrogène intermoléculaires stabilisent chaque chaîne ; des liaisons hydrogène intermoléculaires relient étroitement les chaînes adjacentes à l'intérieur d'une microfibrille.

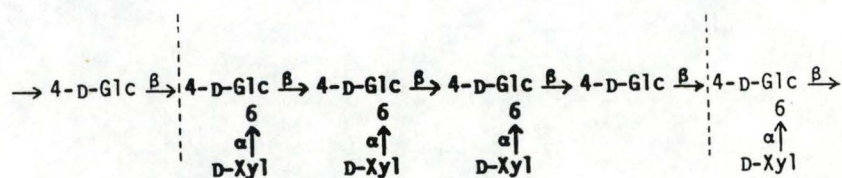


fig. 3 : Structure possible d'une xyloglucane.
(Mc Neil et al., 1984)

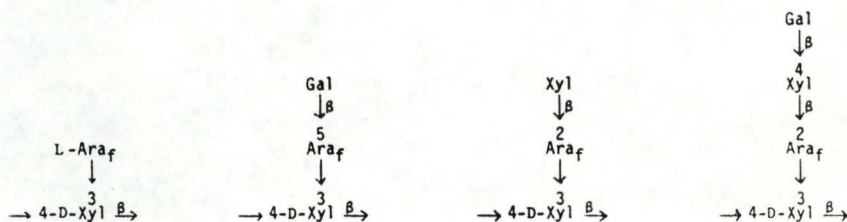
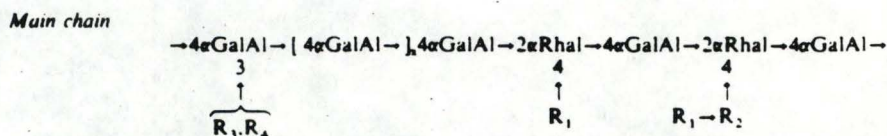


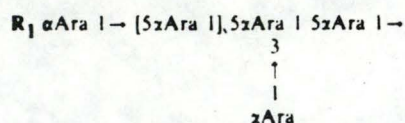
fig. 4 : Exemples de chaînes latérales greffées sur les résidus xyloses des xylanes.
(Mc Neil et al., 1984)



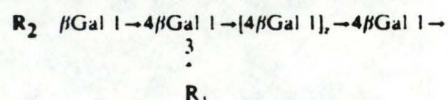
Rhamnose may be dispersed or alternating with galacturonic acid in branched blocks.

A variable proportion of the galacturonic acid residues carry $-\text{CO}_2\text{Me}$ and, in some pectins, $-\text{OAc}$ groups.

Major side-chains



The proportion of branch points varies greatly.



$\text{R}_3 \beta\text{Xyl} 1 \rightarrow$: may have galactose or fucose attached to 0-2

$\text{R}_4 \text{Api} 1 \rightarrow 3\text{Api} 1 \rightarrow$

R_3 and R_4 are major side-chains of certain unusual pectins.

fig. 5 : Principales chaînes constitutives des pectines.
(Jarvis, 1984)

ne de la plupart des plantes à fleurs (14) (16).

Les graminées représentent une exception par rapport aux plantes supérieures. En effet, elles possèdent dans leurs parois des pectines de structure habituelle mais en plus faible quantité (17).

Sur base des propriétés physico-chimiques, les pectines sont parfois classées en deux grands groupes :

- la pectine I : il s'agit d'un acide homopolygalacturonique, non méthylé et non branché. En raison de leur charge négative, ces molécules lient les cations avec avidité. L'ajout d'ions bivalents à une solution de molécules de pectine provoque, par association coopérative, la formation d'un réseau relativement rigide portant le nom de "boîte d'oeuf" (egg box) (16). Ce processus est coopératif puisque la fixation d'un premier ion bivalent entre deux chaînes quelconques entraîne leur alignement partiel. Cet alignement favorise la liaison d'un second cation, et ainsi de suite tout au long de la chaîne. Cependant, ce type de pectine n'a pas un degré de polymérisation infini. En effet, de longues séquences homopolygalacturoniques sont insolubles en présence de calcium et ne permettent pas la réalisation d'un gel hydraté. Afin d'éviter cette insolubilisation, la pectine I est régulièrement parsemée de blocs de sucres neutres et de rhamnose qui introduisent un "coude" dans l'alignement de la molécule (fig. 6). De cette façon, une molécule de pectine I est forcée de s'associer à de nombreuses autres, créant ainsi un réseau tridimensionnel contenant des poches d'eau (18).

- la pectine II : parsemée de blocs de sucres neutres,

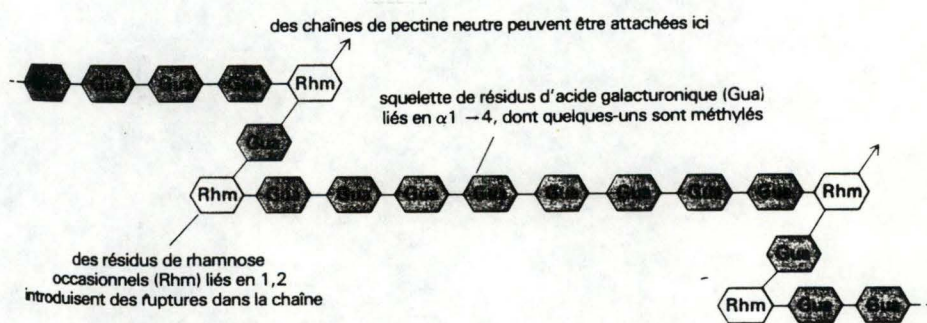


fig. 6 : Exemple de molécule de pectine acide (un rhamno-galacturonane) de la paroi d'un végétal supérieur. Des ruptures dans la chaîne linéaire de résidus d'acide galacturonique chargés négativement sont introduites de temps à autre par les résidus de rhamnose.

méthylée et branchée, elle ne peut adopter la conformation en boîte d'oeuf. Ici, la fixation d'un cation bivalent sur deux groupements carboxyliques n'aura aucune influence sur l'alignement des carboxylates voisins. Ce type de polymère perd donc la stabilité additionnelle qu'apporte la coopérativité (18)

4.3. Relation entre les différents polysaccharides de la paroi

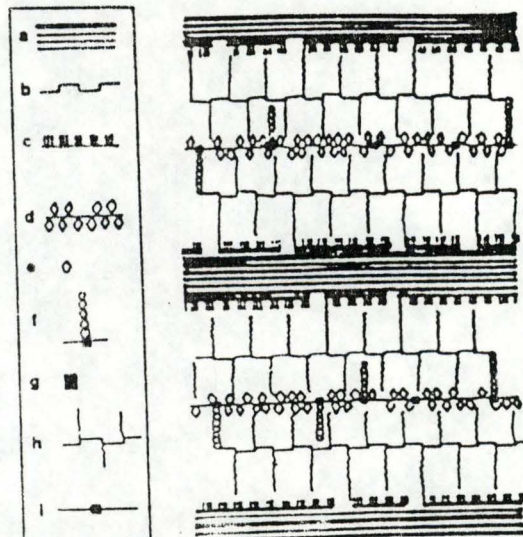
Un modèle de structure de la paroi végétale fut proposé par l'équipe de Keegstra en 1973 (19). Les pectines seraient liées par covalence aux xyloglucanes (hémicelluloses) via leurs chaînes latérales d'arabinones ou de galactanes, les xyloglucanes étant eux-mêmes reliés aux microfibrilles de cellulose par des ponts hydrogène. Les rhamnogalacturomanes pourraient être reliés aux protéines de la paroi par pontage covalent via des arabinogalactanes (fig. 7).

Ce modèle est cependant critiquable sur certains points :

- (a) établi à partir de cultures de cellules en suspension, il ne tient compte ni de la lamelle mitoyenne, ni de la paroi secondaire.
- (b) il ne fait pas intervenir de liaisons électrostatiques entre les molécules.

4.4. Synthèse des polysaccharides pariétaux

a. La cellulose : Chez la plupart des végétaux, ce polysaccharide est synthétisé à la surface de la cellule par un complexe enzymatique lié à la membrane plasmique. Ces enzymes utilisent deux précurseurs nucléotides-oses : l'UDP-glucose et le GDP-glucose. Les chaînes de celluloses naissantes s'auto-assemblent spontanément en microfibrilles



- a : microfibrilles de cellulose
 b : rhamnogalacturonanes (squelette pectique)
 c : xyloglucanes
 d : protéines de paroi avec tétra-arabinosides
 e : arabinosides liés à l'hydroxyproline
 f : arabinogalactanes de type II liés au résidu sérine
 g : résidu sérine des protéines de paroi
 h : polysides pectiques : squelette pectique + chaînes latérales (arabinanes et arabinogalactanes de type I)
 i : résidus sérine non substitués

fig. 7 : Organisation des polysaccharides de la paroi primaire d'après Keegstra et al. (1973)

qui sont intégrées dans la structure d'ensemble de la paroi (20).

b. Les hémicelluloses : les complexes enzymatiques responsables de leur synthèse sont probablement associés aux membranes subcellulaires. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour rendre compte de la synthèse de ces composés. A l'heure actuelle, deux modèles restent en lice. Le premier postule une synthèse dans l'appareil de Golgi puis un transfert par vésicules vers la membrane plasmique. Le second envisage la synthèse dans le reticulum endoplasmique et un transport vers la membrane plasmique (20).

c. Les pectines : leur synthèse se réalise au niveau du golgi, au départ de sucres diphospho-nucléosidiques, pendant la période de division cellulaire et d'expansion de la cellule. Les pectines seraient synthétisées sous forme estérifiée soluble et donc transportées rapidement. Elles seraient déestérifiées in situ (20).

5. Méthodes d'analyse des polysaccharides

Contrairement à la cellulose qui est constituée d'un seul type de molécule de sucre, les polysaccharides de la matrice sont formés d'une série de sucres de base (pentoses ou hexoses) dont le carbone 1 qui peut se trouver sous la forme α ou β . De plus, hexoses ou pentoses sont reliés les uns aux autres par une variété de liaisons (à l'opposé de la cellulose qui ne connaît qu'un seul type de liaison). Il existe ainsi 64 types de liaisons différentes entre deux molécules d'un sucre à 6 atomes de carbone. Trois molécules de sucre peuvent donc s'assembler de plus de 1000 façons différentes (15).

En outre, la complexité structurale des polysaccharides ne se limite pas aux types de liaisons qui associent une gamme de sucres différents. Ces polymères peuvent être modifiés par d'autres substituants. Les groupes hydroxyles peuvent être acétylés, méthylés, sulfatés ou phosphoxylés et les fonctions carboxyliques peuvent elles-mêmes être estérifiées (15).

Des méthodes d'extraction, de purification, d'analyse et de marquage ont été progressivement mises au point pour tenter d'élucider la structure primaire de ces polysaccharides.

Méthodes classiques d'extraction et de purification des polysaccharides végétaux :

a. Extraction : Les polysaccharides sont extraits des parois cellulaires végétales par différentes techniques incluant l'usage d'enzymes, d'agents chélateurs (oxalate d'ammonium, CDTA = cyclohexanediamine tetraacetic acid) (11) ainsi que de solvants alcalins, acides ou organiques (MM No = 4-méthylmorpholine N-oxyde, DMSO = diméthylsulfoxyde) (13).

b. Purification : Parmi les méthodes les plus utilisées on trouve les précipitations globales à l'éthanol ou sélectives (acétate de cuivre et cétaflon pour les pectines) (13), les chromatographies échangeuses d'ions, les tamis moléculaires, les chromatographies sur papier (couche mince) et les dialyses (13) (21).

Méthodes d'analyse :

La complexité structurale des polysaccharides a nécessité le développement de différentes méthodes

d'analyse afin d'en déterminer la composition en monomères et la séquence. Les principales sont :

a. La chromatographie en phase gazeuse, couplée ou non à la spectrométrie de masse. Il s'agit d'une méthode rapide permettant une bonne détermination quantitative mais présentant cependant un inconvénient majeur : la transformation nécessaire des composés à analyser en dérivés volatiles (21).

b. La chromatographie liquide à haute performance . Ce procédé connaît actuellement un développement rapide avec les progrès importants réalisés dans le domaine des supports. L'avènement de ces nouvelles phases de remplissage fait de cette méthode un outil de tout premier ordre conduisant à des séparations rapides et permettant des dosages précis sans longues préparations des échantillons (21). A l'heure actuelle, l'HPLC est de plus en plus utilisé dans le domaine biomédical et industriel (22) (23).

A ces deux techniques, il faut ajouter la NMR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy) (24) et l'utilisation récente d'anticorps poly ou monoclonaux (25). Ces molécules hautement spécifiques permettent la purification ou la localisation in situ (dans la paroi végétale) d'un polysaccharide ou d'une séquence d'un polymère (25).

6. Intérêt de l'étude des polysaccharides extracellulaires et travaux antérieurs

Il est démontré, depuis de nombreuses années, que les cellules cultivées in vitro libèrent dans leur milieu de culture des polysaccharides similaires (par la composition et la structure) à ceux présents dans les parois (Burke et al., 1974).

Les complexes polyosidiques rejetés dans le milieu extracellulaire sont isolés très facilement. En effet, leur obtention ne requiert pas la mise en oeuvre de technique particulièrement complexe. Le rejet de ces polysaccharides dans le milieu de culture des cellules a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs qui se sont attachés à les purifier et à tenter d'expliquer leur rôle :

- Takeuchi et Komamine (1978) suggèrent la présence de xyloglucane, d'arabinogalactane et de polymère à caractère acide dans le complexe polysaccharidique extracellulaire de culture en suspension de Vinéa rosea.
- Akiyama et al. (1984) ont purifié une aribunoglucuronomannane à partir du complexe polyosidique extracellulaire des cellules de Nicotiana tabacum cultivées en suspension.
- Albersheim et al. (1985), en étudiant les polysaccharides extracellulaires de cellules d'érable cultivées en suspension, isolèrent une xyloglucane, une arabinoxylane, deux arabinogalactane et une rhamnogalacturonane.

Au vu des différentes données de la littérature, nous constatons une très grande diversité des polysaccharides libérés par les cellules dans leur milieu environnant, diversité qui prend son origine au sein-même de la paroi. La composition des polysaccharides sécrétées dans le milieu de culture est, en effet, en étroite relation avec celle des fractions pectiques et hémicellulosiques des parois (26) (30). Cependant, la quantité et la nature des polysaccharides excrétés dans le milieu de culture dépendent de nombreux facteurs tels que la composition-même du milieu de culture initial (Moore, 1973), la température

de culture (Olson et al., 1969), l'âge des cellules (Olson et al., 1969 ; Takeuchi et Komamine, 1978)...

Pour chaque suspension cellulaire étudiée, dans des conditions données, il apparaît que la quantité de polysaccharides libérés dans le milieu de culture augmente au cours de la croissance. En effet, les cellules en phase de division intense excrètent activement des polysaccharides dans le milieu, jusqu'à un taux maximum atteint au cours de la phase stationnaire de croissance (Takeuchi et Komamine, 1978). L'analyse globale du complexe polyosidique excrété au cours de la croissance ne révèle pas d'importantes variations de la composition en oses neutres. Par contre, il semble que le complexe polyosidique excrété par les cellules jeunes de dicotylées soit enrichi en acides uroniques (Takeuchi et Komamine, 1978).

Différentes hypothèses ont été émises quant à l'origine et au rôle de ces polysaccharides extracellulaires :

a. Selon Kato et Noguchi (1976), les polysaccharides excrétés sont en fait des précurseurs de la paroi, qui ne s'incorporent cependant pas à la paroi en raison de l'environnement artificiel que constitue une culture en suspension.

b. Takeuchi et Komamine (1980-a) ont émis l'hypothèse que les modifications simultanées de la composition de la fraction hémicellulosique de la paroi et des polysaccharides extracellulaires constituent une particularité du processus d'élongation. Par marquage radioactif, ils ont montré que la fraction hémicellulosique est dégradée au cours de la croissance. Cette dégradation partielle provoque la solubilisation de polysaccharides qui vont s'accumuler dans

le milieu de culture. Ainsi, la sécrétion de polysaccharides dans le milieu extracellulaire serait une conséquence du turn over des polysaccharides de la paroi au cours de la croissance (Takeuchi et Komamine, 1980-b).

c. L'effet stimulant, sur la croissance, de polysaccharides acides excrétés par les cellules de *Silene* a été étudié par Morvan (1982). Ces polysaccharides acides sont capables d'augmenter leur propre excrétion, favorisant ainsi l'allongement cellulaire, comme le ferait une substance de croissance. Il apparaît que ces polysaccharides acides ont pour origine les modifications de la paroi au cours de l'élongation et à ce titre ils pourraient agir sur les mécanismes qui permettent leur libération et notamment des activités polyosidiques. Ces résultats corroborent bien l'hypothèse de Takeuchi et Komamine (1980-b).

Ainsi l'examen des données de la littérature montre que les caractéristiques moléculaires des polysaccharides extracellulaires sont connues dans leur ensemble. La nature et la composition de ces entités moléculaires sont en étroite relation avec la composition des parois. Par contre, le rôle des excrétions suscitent des hypothèses diverses. Bien qu'une étroite relation avec le turn-over des polysaccharides de la paroi au cours de la croissance soit probable, les mécanismes mis en jeu restent peu ou mal connus.

7. Démarche de travail

Désirant réaliser une étude graduelle (fig. 8) des polysaccharides extracellulaires des cellules de *Festuca arundinacea* cultivées en suspension, nous avons commencé notre travail par des analyses globales mettant

en oeuvre des dosages colorimétriques. Ensuite, nous avons voulu affiner notre étude. C'est pourquoi nous avons successivement entrepris des chromatographies d'échange ionique, des tamis moléculaires, des hydrolyses et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse de nos hydrolysats. Cette étude pourrait se poursuivre par l'analyse en spectrométrie de masse des dérivés méthylés, la RMN, l'HPLC ou l'isolement par chromatographie d'un polysaccharide préalablement bien caractérisé.

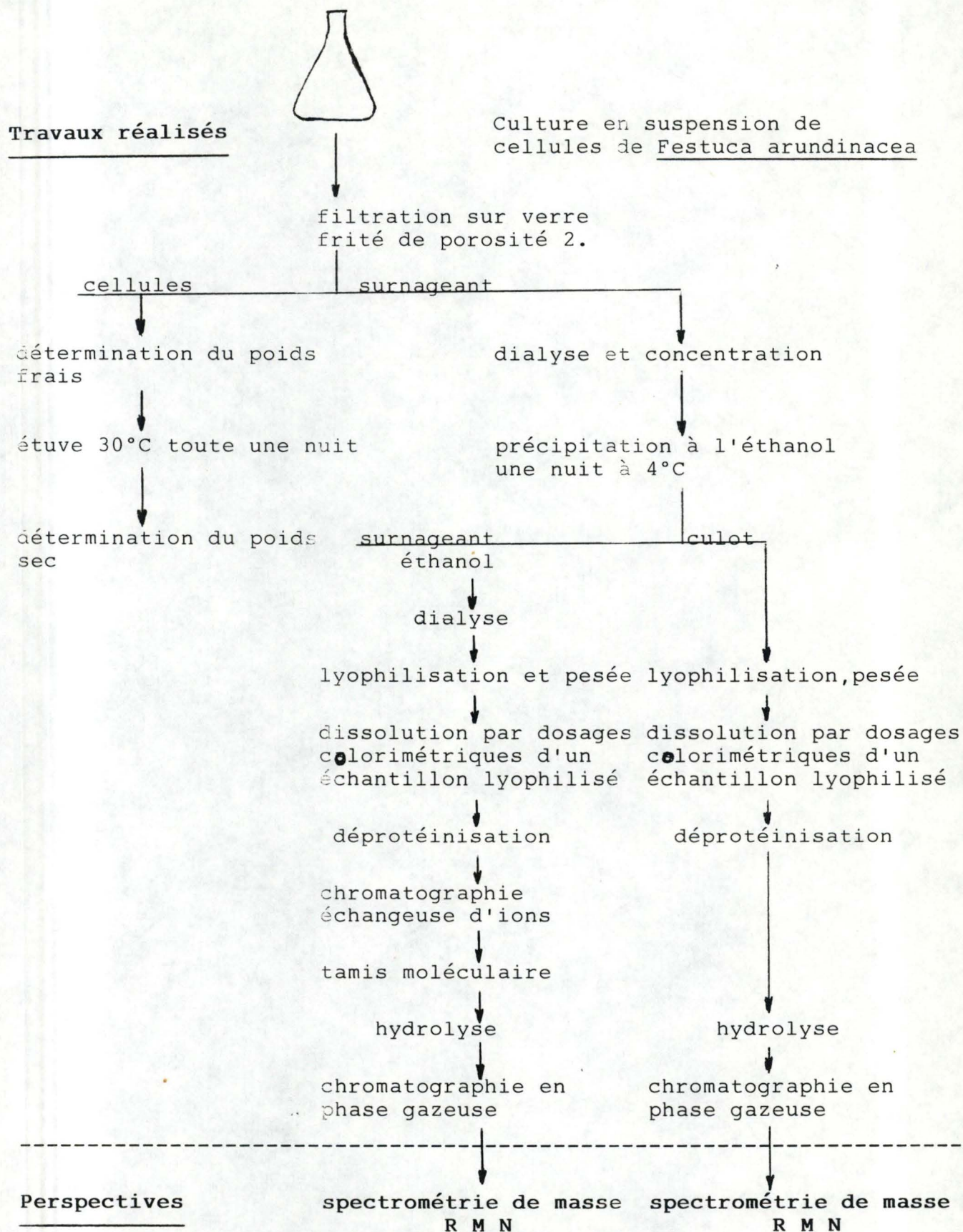


fig. 8 : Schéma des différentes étapes et des perspectives de ce travail.

MATERIEL ET METHODE

I. Cultures de cellules

Les suspensions cellulaires ont été obtenues à partir de la graminée Festuca arundinacea (Fétuque roseau) et font partie d'une lignée B I3. Cette lignée a été isolée en 1984 au départ d'embryons matures par S. Dalton au Tissue culture laboratory du Welsh Plant Breeding Station d'Aberystwyth (Dalton 198). Les cellules sont cultivées in vitro dans un milieu liquide de Murashige et Skoog dont la composition est reprise ci-dessous (37).

I.I. Milieu de culture

Le milieu de culture est appelé MS/CSM (Muroshige et Skoog/Cell Suspension Medium) et est composé de :

- Saccharose (Fluka) 30 g/l
- 2,4-D (acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique) 2 mg/ml (Sigma)
- M S salts (Sels de Murashige et Skoog) 4,7 g/l

Composition des sels de Murashige et Skoog (en mg/l):

Ca Cl ₂ .2H ₂ O	440,00 mg
Co Cl ₂ .6H ₂ O	0,025
Cu SO ₄ .5H ₂ O	0,025
Fe Na EDTA (acide éthylènediamine-tétracétique)	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
KH ₂ PO ₄	170,0
KI	0,83
KNO ₃	1900
Mg SO ₄ .7H ₂ O	370,0

Mn SO ₄ .4H ₂ O	22,30
Na ₂ Mo O ₄ .2H ₂ O	0,25
NH ₄ NO	1650
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Inositol	100
Acide nicotinique	0,50
Thiamine HCl	0,10
Pyriodoxine HCl	0,50
Glycine	2,00

Les sels de Murashige et Skoog prêts à l'emploi sont commercialisés par les laboratoires Flow et ne nécessitent que l'adjonction de sucrose et d'hormones. L'eau utilisée est désionisée grâce à un déminéralisateur Aqualab 30 (Vol) et sa résistivité est de 1,5 M Ohm/cm. Le milieu de culture est stérilisé par autoclavage 15 minutes à 121°C (1 bar) (37).

I.2. Conditions de culture

Les cultures se font dans des erlenmeyers de 250 ml fermés par une bourre d'ouate et du papier aluminium afin d'éviter l'évaporation. Ces erlen contiennent un volume de 50 ml de culture et sont placés sur un agitateur rotatif Bühler VKS 75 à 100 rpm, dans une chambre thermostatée à 25°C sous illumination constante de 2000 lux. Le repiquage s'effectue tous les 7 jours par transfert stérile de 25 ml de culture dans un cylindre gradué de 50 ml contenant 25 ml de milieu frais. Les 25 ml de culture restant dans l'erlen sont éventuellement dilués par addition de 25 ml de milieu (37).

2. Protocole général employé pour l'étude de la cinétique de développement des cultures

Nous intéressent aux polysaccharides excrétés

dans le milieu au cours du temps, il nous fallait en éliminer les cellules. Nous avons dès lors entamé notre travail sur le complexe osidique extracellulaire en vérifiant la cinétique de développement des cultures que nous utilisons. Ne cherchant qu'à confirmer le travail réalisé par M. Cereghetti (1987) dans ce domaine, nous ne nous sommes intéressés qu'à l'évolution des poids frais et sec des cellules au cours du temps. La détermination de ces deux poids nous permet, par ailleurs, de normaliser les quantités de polysaccharides excrétés dans le milieu. Les mesures sont étalées sur 25 jours et sont réalisées sur une série de 16 erlenmeyers provenant des repiquages d'un seul erlen de départ (chaque erlen est dédoublé tous les 7 jours lors du repiquage), afin de garantir une homogénéité maximale. Les prélèvements se font après :

- 4 jours, en phase exponentielle,
- 7 jours, au début de la phase stationnaire,
- 14 jours, au début de la phase de sénescence,
- 21 jours, sur des cellules sénescents.

Détails des techniques utilisées

a. Mesure du poids frais (38), (39), (40)

Le contenu de 2 erlens de culture est filtré sur creuset filtrant en verre frité de porosité 2. Les cellules sont rincées abondamment à l'eau désionisée pour éliminer la solution adsorbée. Elles sont ensuite récoltées à l'aide d'une spatule et pesées dans une boîte de Petri en verre préalablement tarée.

b. Mesure du poids sec (38), (39)

La boîte de Petri contenant les cellules fraîches est lavée durant 24 heures à 60°C dans une étuve

ventilée, puis pesée.

3. Obtention des polysaccharides extracellulaires

3.1. Filtration

Le milieu de culture et les eaux de lavage sont séparés des cellules comme décrit ci-dessus (§ 2.a.). Les cellules ainsi retenues représentent le matériel expérimental de notre étude de la cinétique de développement de la culture.

3.2. Purification

Le surnageant récupéré est dialysé et concentré à l'aide d'une cellule d'ultrafiltration Amicon modèle 202 équipée d'une membrane Amicon Diaflo PM 10 (seuil de coupure 10000) (40). L'efficacité de la dialyse est appréciée au moyen de la résistivité du surnageant (39), déterminée à l'aide d'un impédance-mètre Hewlett-Packard 4800 A avec une cellule de conductivité YSI 3417 (Ankersmit) calibrée dans une solution de KCl 100 mN. La constante de calibration K vaut 1239 cm^{-1} et la formule de correction est $\text{Rho} = \text{R}/\text{K}$ (Rho=résistivité ; R=résistance). Les mesures sont réalisées dans l'ordre suivant :

- 2 mesures de l'eau désionisée
- 2 mesures du surnageant de culture
- 2 mesures de l'eau désionisée.

On arrête la dialyse lorsque la résistivité est égale ou supérieure à $100 \text{ K}\Omega/\text{cm}$. On traite un volume de surnageant dialysé par 3 volumes d'éthanol et le mélange est placé une nuit à 4°C . Le précipité formé est repris par l'eau et lyophilisé dans un lyophilisateur Edwards freeze dryer modulyo Pirani 501. Le surnageant éthanol est lui

aussi dialysé et lyophilisé. Nous avons utilisé ce schéma général afin d'évaluer la quantité de polysaccharides excrétés dans le milieu au cours de la culture.

4. Techniques utilisées pour l'étude du complexe polysaccharidique extracellulaire

4.I. Dosages colorimétriques

a. Dosage des oses neutres par la méthode à l'orcinol sulfurique (41) (42)

a.I. Principe

Sous l'action de l'acide sulfurique concentré, les polyosides sont hydrolysés en oses neutres (pentoses + hexoses) et en acides uroniques. Les monomères neutres libérés sont déshydratés en dérivés furfuriques qui forment avec l'orcinol (dihydroxytoluol) un complexe de couleur brun-jaune présentant un maximum d'absorption à 420 nm (fig. 9). La méthode n'est pas spécifique des oses neutres, les acides uroniques donnant aussi dans les mêmes conditions une coloration brun-jaune qui doit être soustraite. Comme de leur côté, les monosaccharides neutres interfèrent dans le dosage des acides uroniques par la méthode au métahydroxydiphényl (voir après), il est nécessaire d'introduire une correction réciproque provenant de la résolution des deux équations suivantes :

$$A = ax + by$$

$$B = cx + dy$$

x = quantité réelle d'oses neutres

y = quantité réelle d'acides uroniques

A, a, b = absorbances données dans le dosage à l'orcinol, respectivement par 1 ml de la solution à analyser, par 1 μ g d'oses neutres et par 1 μ g d'acide uronique.

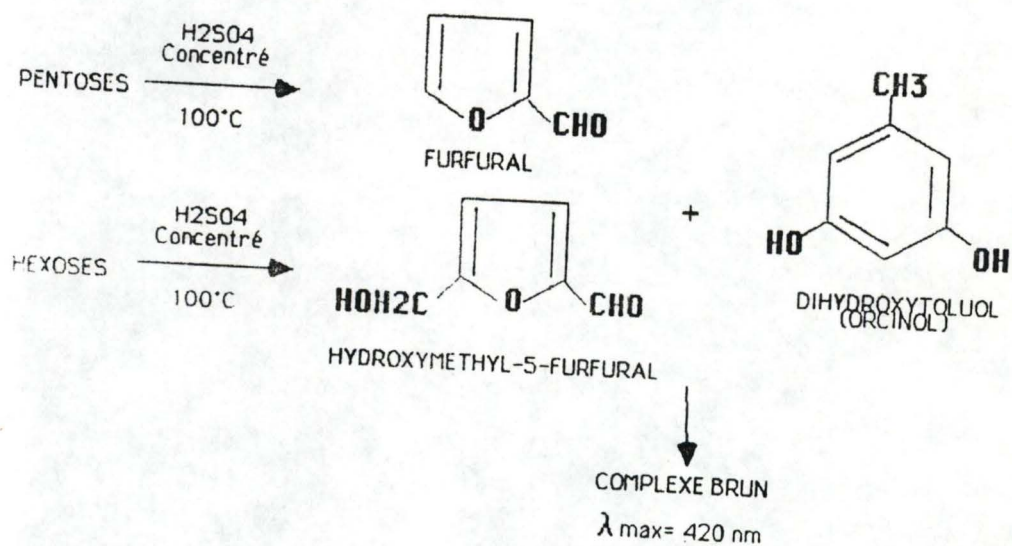


fig. 9 : Réactions chimiques se déroulant lors du dosage des oses neutres à l'orcinol sulfurique.

B, c, d = absorbances données dans le dosage au méta-hydroxydiphényl, respectivement par 1 ml de la solution à analyser, par 1μ g d'oses neutres et par 1μ g d'acide uronique.

Une trop forte concentration en protéines (supérieure ou égale à 10 %) provoque aussi des interférences annulées par une détection à 510 nm au lieu de 420 nm.

a.2. Réactifs

- solution d'orcinol à 1,5 g dans 100 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique (Merck 95-97 %) pur à 30 % (V/V) à conserver à 4°C.
- solution d'acide sulfurique à 60 % (V/V).
- solution de galactose (ou autre ose neutre) à diluer (Aldrich chemie 99 %).

a.3. Mode opératoire

Dans des tubes à essai sont introduits 200μ l de la solution à doser renfermant de 5 à 200μ g d'oses totaux, 400μ l de la solution d'orcinol et 3 ml de la solution d'acide sulfurique à 60 %. Après mélange au vortex, les tubes sont ^{maintenus} trente minutes dans un bain marie (Büchi 461 water bath) à $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ puis refroidis sous un courant d'eau et placés à l'obscurité pendant quarante-cinq minutes. L'absorbance est déterminée à 410 ou 520 nm selon la quantité de protéines de l'échantillon. La coloration reste stable pendant vingt-quatre heures à l'obscurité et à $+4^{\circ}\text{C}$. Une gamme étalon de galactose a été utilisée dans tous les cas, la réponse étant linéaire entre 0 et 200μ g (fig. 10). Les dosages sont réalisés avec un spectrophotomètre Philips PU 8740 UV/Vis scanning spectrophotometer et une cuvette en quartz Hellma QS 100 d'un parcours optique de 1 cm.

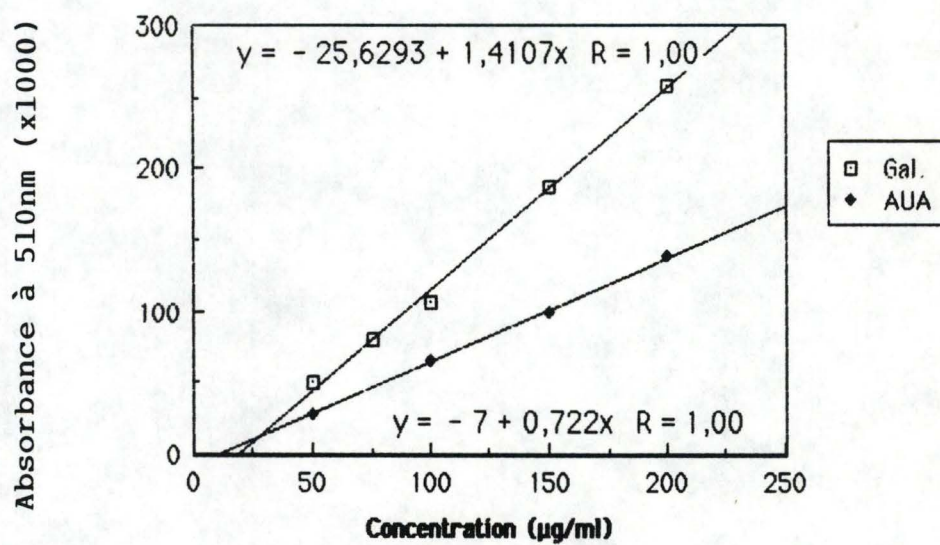


fig. 10 : Droite étalon d'un dosage à l'orcinol et interférence des acides uroniques.

b. Dosage des acides uroniques par la
méthode au méta-hydroxydiphényle
(Blumenkrantz et Arboe-Hansen, 1973)

b.1. Principe

Sous l'action de l'acide sulfurique concentré, les polyosides sont hydrolysés en oses neutres et en acides uroniques. Les monomères acides libérés sont déshydratés en dérivés furfuroïques qui forment avec le méta-hydroxydiphényle un complexe de couleur rose présentant un maximum d'absorption à 500 nm (fig. II). L'interférence des oses neutres est éliminée en résolvant les deux équations énoncées page 23.

b.2. Réactifs

- solution de méta-hydroxydiphényle (3 phényl phénol 90 % Aldrich).
- solution d'acide sulfurique concentré 97 à 98 %.
- solution d'acide polygalacturonique à diluer (98 % Sigma).

b.3. Mode opératoire

A 1 ml d'une solution contenant de 5 à 100 μ g d'acides uroniques, on ajoute, dans un bain de glace, 6 ml de la solution d'acide sulfurique concentré. Le mélange est agité au vortex et les tubes chauffés dans un bain marie bouillant pendant cinq minutes. Après refroidissement dans la glace, on ajoute 100 μ l de réactif au méta-hydroxydiphényle. On place les tubes à l'obscurité durant 15 minutes, on les agite et on lit l'absorbance à 520 nm. La coloration est stable pendant douze heures. Une gamme étalon d'acide polygalacturonique a été utilisée dans tous les cas, la réponse étant linéaire entre 0 et 100 μ g/ml

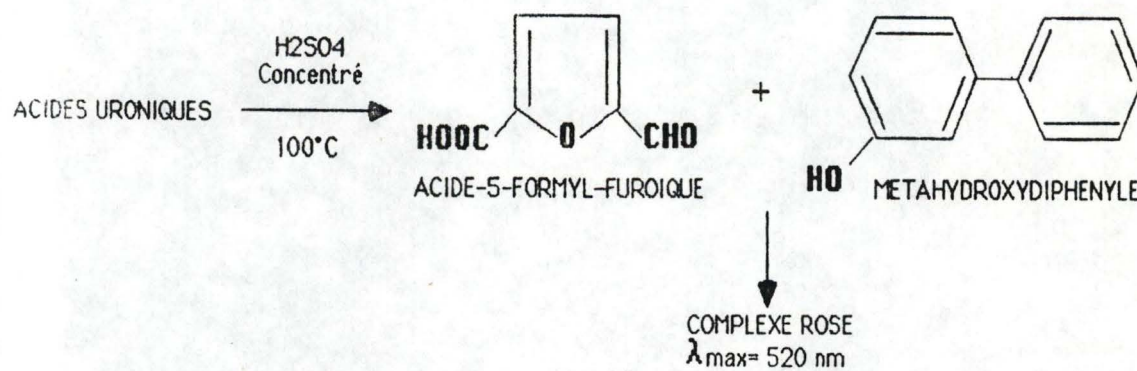


fig. 11 : Réaction chimique se déroulant lors du dosage des acides uroniques par le méta-hydroxydiphényl.

(fig. I2). Les dosages sont réalisés comme décrit au paragraphe a.3.

c. Dosage des protéines par la méthode de Lowry (45)

c.1. Principe

Sous l'action de l'hydroxyde de sodium, les protéines sont dénaturées. Leur structure native est détruite. Elles présentent ainsi tous leurs groupements aux réactifs. La coloration est due d'une part à la formation d'un complexe entre le cuivre et les liaisons peptidiques et, d'autre part, à la réduction d'un complexe phosphomolybdique en complexe phosphomolybdeux par les groupements tyrosine et tryptophane de la protéine. La lecture du complexe coloré se fait à 660 nm.

c.2. Réactifs

- solution de Na OH IN (Merck pour analyse)
- solution alcaline : $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ 0,19 M 100 ml
- Cu SO_4 0,04 M 1 ml
- $\text{Na K C}_4 \text{H}_4 \text{O}_6 \text{H}_2\text{O}$ 0,07 M 1 ml
- réactif de Folin : solution stock diluée 2 fois (Merck)
- solution de sérum albumine bovine à diluer (Sigma 99%)

c.3. Mode opératoire

Dans des tubes à essai sont déposés 500 μ l de solution à doser renfermant de 50 à 250 μ g de protéines et 500 μ l de Na OH IN. Après trente minutes d'incubation à température ambiante, on ajoute 5 ml de solution alcaline, on homogénéise au vortex et on réincube quinze minutes. De minute en minute, on ajoute 0,5 ml de mélange de Folin

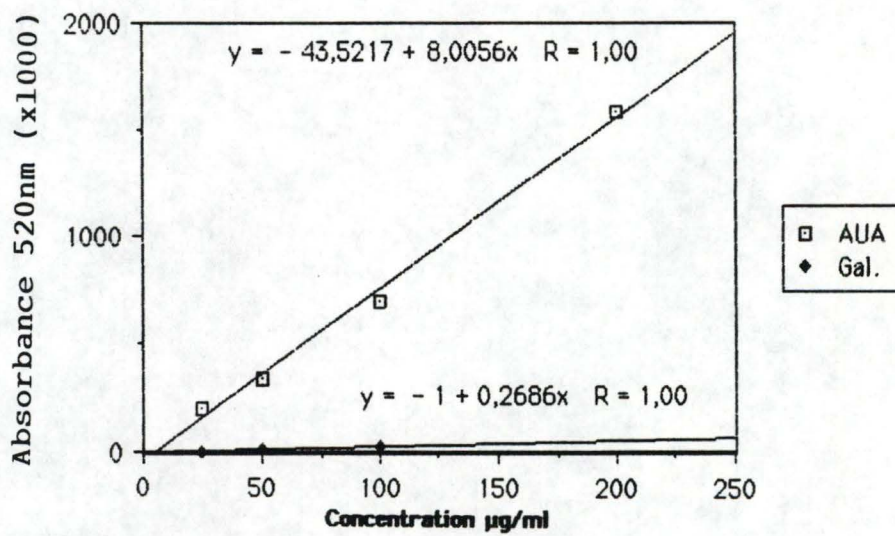


fig. 12 : Droite étalon d'un dosage au Métahydroxy-diphenyl et interférences des oses neutres.

et les tubes sont immédiatement vortexés. Après trente minutes de repos, l'absorbance de chaque test est lue de minute en minute à 660 nm. Une gamme étalon de protéine a été utilisée dans tous les cas, la réponse étant linéaire entre 0 et 500 μ g/ml (fig.; I3). Les dosages sont effectués comme décrit au paragraphe a.3.

4.2. Déprotéinisation

a. Raison de la déprotéinisation

Nous intéressant uniquement aux polysaccharides extracellulaires, nous avons procédé à l'élimination des protéines par précipitation à l'acide trifluoroacétique (T.F.A.). L'élimination de ces protéines est indispensable car elles interfèrent lors des dosages colorimétriques de même que lors des chromatographies échangeuses d'ions (compétition pour l'adsorption, choix de la longueur d'onde de détection). Le choix de ce réactif est motivé par trois raisons :

- Le T.F.A. est un composé très volatile. De ce fait, il s'élimine facilement par simple évaporation à 30°C au rotavapor. Cette basse température présente l'avantage de n'occasionner aucune dégradation des polysaccharides (45).
- Le T.F.A. entraîne une bonne précipitation des protéines ; après traitement, il ne subsiste que 0,5 % de protéines dans le surnageant.
- Le T.F.A. est l'acide organique que nous utilisons pour l'hydrolyse de nos polysaccharides. Ainsi, nous minimisons le nombre de composés contaminant nos échantillons. Ceux-ci s'avèrent surtout gênants pour l'étude ultérieure par chromatographie en phase gazeuse des polysaccharides extracellulaires.

b. Mode opératoire

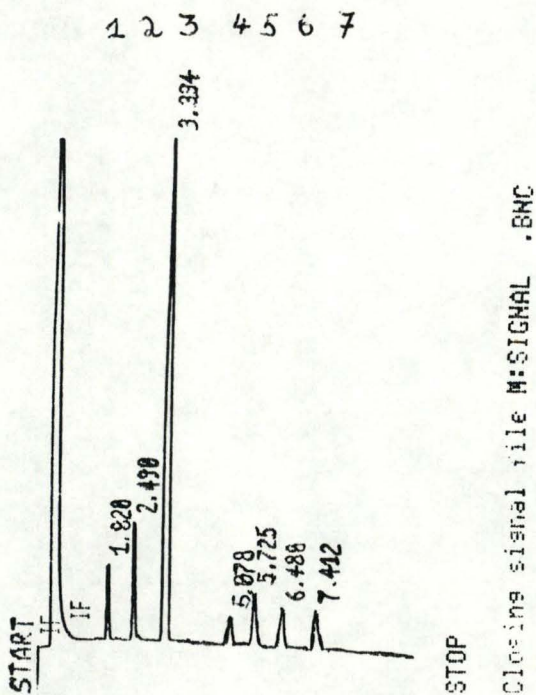
Dans un tube à centrifuger, on introduit 100 μ l de T.F.A. par 100 μ l de protéines et on centrifuge à 4000 tours/minutes durant cinq minutes. Le surnageant est récupéré dans un ballon et

Référence 37, bibliographie lire Festuca arundinacea à la place de
3ème ligne, Festuca arundinacea

Référence 41, bibliographie lire Z. Dische à la place de Z. Dixhe
première ligne,

Page 25, 3ème ligne, lire Asboe-Hansen à la place de Arboe-Hansen

Annexe 2, remplacer le graphique présenté par celui repris
ci-dessous



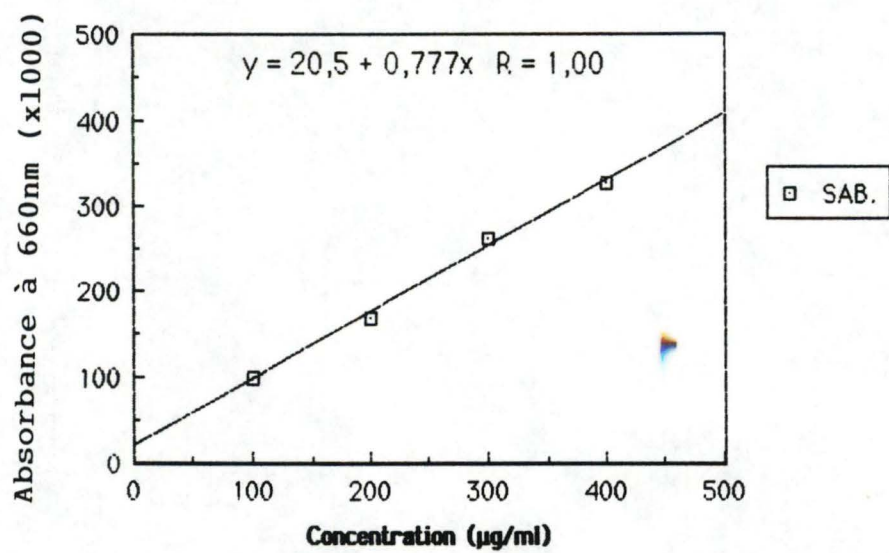


fig. 13 : Droite étalon d'un dosage de protéines par la méthode de Lowry.

l'acide trifluoroacétique éliminé par une succession d'évaporations à l'éthanol au rotovapor Büchi RE III à 30°C. Finalement, le résidu polyosidique sec est resuspendu dans le solvant désiré. Avec cette déprotéinisation nous avons créé des solutions enrichies en polysaccharides extracellulaires dont nous avons ajusté la concentration à 1 mg/ml.

4.3. Séparation par chromatographie

a. Chromatographie par échange d'ions

a.1. Principe

Il se base sur le caractère chargé ou non chargé des substances à séparer. L'échantillon déposé sur la colonne est entraîné par le solvant. Les molécules ionisées se fixent sur les charges du gel tandis que les substances neutres sont éluées par le lavage de la colonne. Le décrochage des substances chargées s'effectue ensuite par l'application généralement en gradient, d'un tampon. Les ions de ce tampon, ayant une charge opposée à celle du groupe fonctionnel, vont interférer avec la fixation de la molécule sur l'échangeur. Enfin, le gel est rééquilibré par des lavages avec le solvant de départ (46).

a.2. Conditions opératoires

La chromatographie se réalise sur DEAE sépharose CL6B Pharmacia. Il s'agit d'un gel d'agarose réticulé sur lequel sont greffés des groupements diéthylaminoéthyle (DEAE). Le domaine de fractionnement est compris entre $4 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$ de surnageant éthanol. Une solution (1ml) de polysaccharides extracellulaires (1mg/ml) est injectée sur une colonne (17 x 2 cm). L'éluion est réalisée par trois tampons acétates (0,1 M ; 0,5 M ; 1 M pH 4,7) appliqués en paliers à un débit de 40 ml/h. Des fractions de 5 ml sont collectées et le pic est localisé par un dosage rapide

au phénol. Ce dosage consiste en un mélange de 100 μ l de solution du tube concerné à une solution de phénol H_2SO_4 80 % et à 1 ml d' H_2SO_4 concentré. Les sucres présents développent une coloration brun rougeâtre appréciée à l'oeil ou au spectromètre à 490 nm (46). Les contenus des tubes révélés positifs, par le dosage au phénol sont rassemblés et évaporés sous vide, à 30°C puis resuspendus dans l'eau. La détection est réalisée en UV à 320 nm comme § a.3. mais avec une cellule à circulation en quartz Helma 178010-QS (volume 80 μ l). Le choix de 320 nm comme longueur d'onde de détection est motivé par deux raisons :

- Le balayage au spectre UV-vis du complexe polyosidique ext racellulaire nous révèle un maximum d'absorption aux environs de 320 nm (fig. 14).
- Le tampon acétate absorbe à 200 nm, dès lors une détection à cette longueur d'onde serait masquée par ce tampon (fig. 15).

b. Chromatographie de perméation de gel

b.1. Principe

Ce type de chromatographie permet de séparer les molécules selon leur taille. Le gel utilisé est une structure tridimensionnelle constituée d'un matériel solide entouré d'un liquide. En greffant des groupements réactionnels adéquats, il est possible de réaliser des gels avec presque toutes les macromolécules : gels d'agarose (Pharmacia) , gels d'acrylamide (Biorad)... Malgré la diversité des gels, le principe de la chromatographie est semblable dans tous les cas. Les gels sont formés de pores de dimensions variables. Les molécules de taille supérieure aux plus gros ne peuvent pénétrer dans les grains du gel : elles vont descendre la colonne dans la phase liquide circulant autour des billes et vont être éluées de la colonne très rapidement. Le résultat d'une chromatographie sur perméation de gel sera une séparation des molécules, par ordre

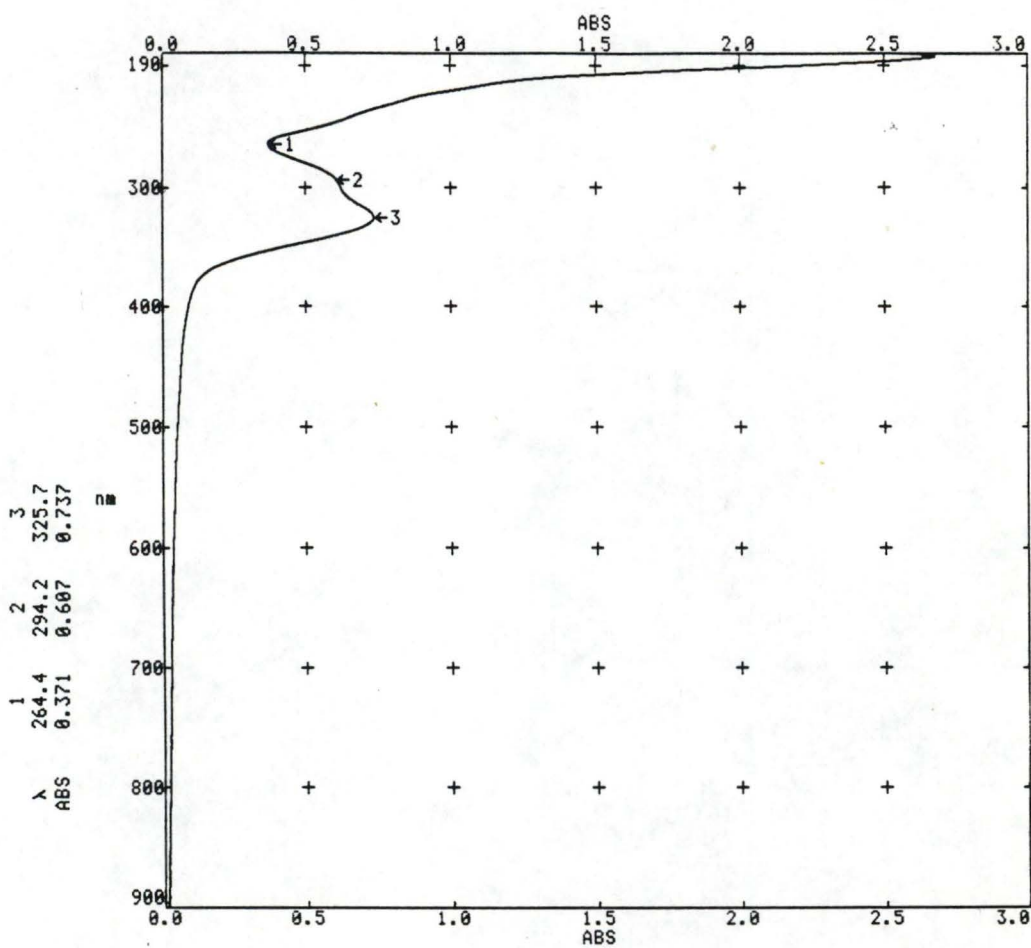


fig. 14 : Balayage au spectre UV-Vis du complexe polyosidique extracellulaire. Ce graphe révèle un maximum d'absorption vers 320 nm.

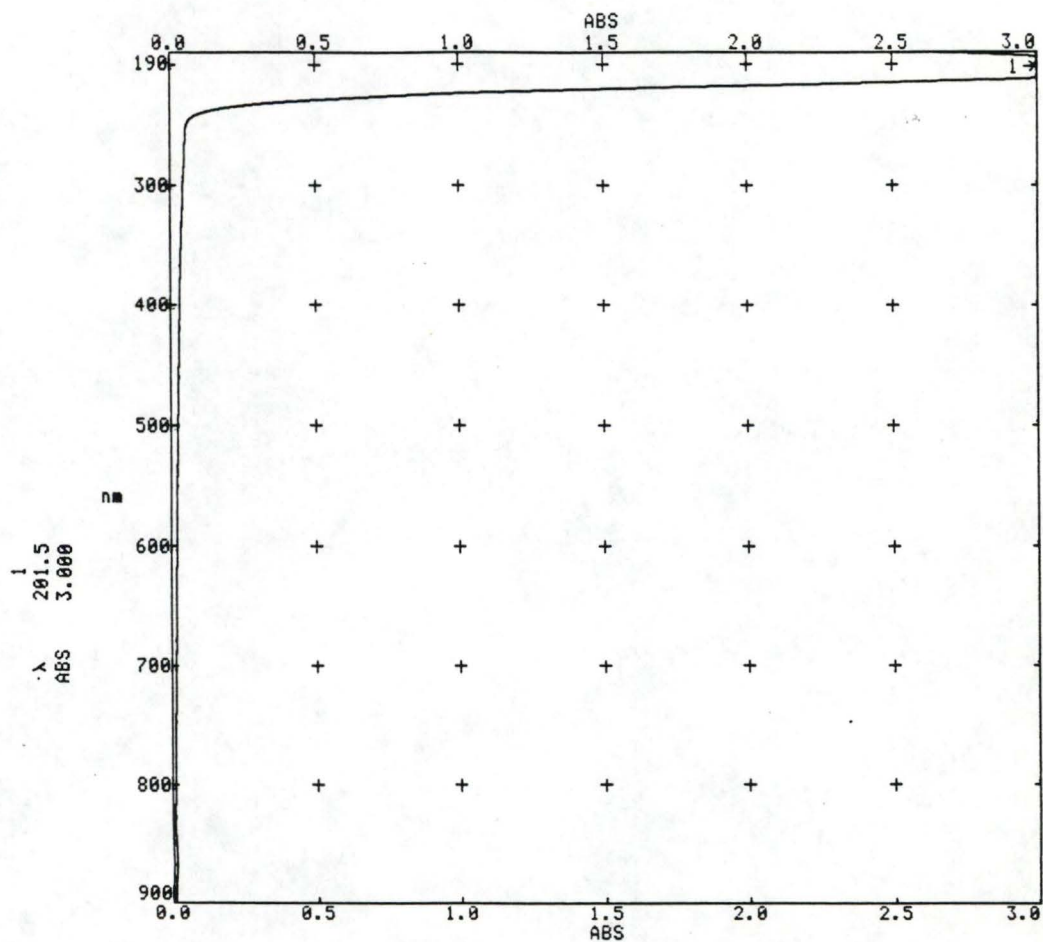


fig. 15 : Balayage au spectre UV-Vis du tampon acétate.
Celui-ci absorbe à 200 nm, dès lors, une détection à cette longueur d'onde serait masquée par le tampon.

décroissant de taille (fig. 16) (46).

b.2. Conditions opératoires

Les gels de tamis moléculaire et d'échange d'ions s'avèrent parfois fort semblables. La confection d'un gel échangeur d'ions peut être le fruit du greffage de groupements chargés sur une matrice couramment utilisée dans le tamis moléculaire (sepharose, acrylamide...). Conscient de ce fait, il semble possible de convertir un gel échangeur d'ions en tamis moléculaire par simple neutralisation de ces charges. Dès lors nous avons tenté l'expérience avec le DEAE sepharose CL6B utilisé auparavant comme échangeur d'ions. Les caractéristiques de ce gel sont mentionnées page 28. On injecte 1 ml de polysaccharides extracellulaires (1 mg/ml de surnageant éthanol) sur une colonne 50 x 1,5 cm ($V_0 = 29$ ml ; $V_t = 84$ ml). L'éluion est réalisée par une solution Na Cl 0,1 M pH 4,7 à un débit de 40 ml/h. Des fractions de 5 ml sont collectées. Détection, localisation et évaporation des fractions se réalisent comme décrit pages 28 et 29.

c. Chromatographie sur couche mince

Les produits de dégradation des polysaccharides extracellulaires hydrolysés à l'acide trifluoroacétique (voir ci-après) ont été identifiés globalement par chromatographie couche mince sur gel de silice. L'éluant est un mélange isopropanol, acétate d'éthyle, H_2O dans les proportions 6/2,5/1. Les plaques ont été révélées avec une solution d'orcinol 0,1 % H_2SO_4 70% en chauffant quinze minutes à 100°C. (46)

4.4. Hydrolyse des polysaccharides

Celle-ci se réalise à l'aide de l'acide trifluoroacétique (T.F.A.). Dans un tube à hydrolyse sont mélangés 1 ml

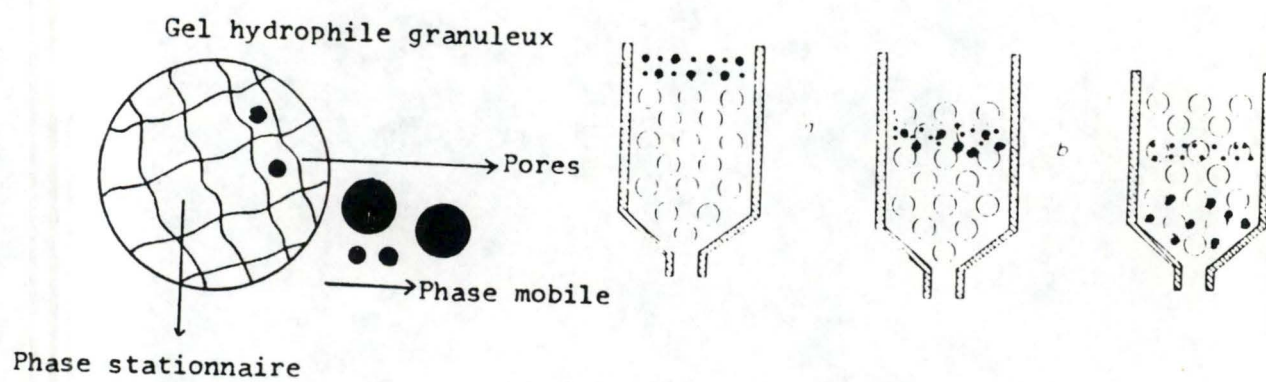


fig. 16 : Principe de la chromatographie de perméation gel.

d'échantillon, contenant au maximum 1 mg de sucres totaux, et 1 ml de TFA 2N. Les tubes sont fermés hermétiquement et placés dans l'étuve à 100°C pendant 1 à 4 heures suivant le type de composé et la normalité du T.F.A. Finalement, l'acide trifluoroacétique est éliminé par plusieurs évaporations sous vide (40) (45). Le choix du temps d'hydrolyse est important. Trop long, il risque de dégrader certains sucres hydrolysés. Trop court, l'hydrolyse ne sera pas complète (45). C'est pourquoi, par chromatographie sur couche mince nous avons déterminé le temps d'hydrolyse optimal des polysaccharides extracellulaires de Festuca arundinacea. Les résultats (photo 1) démontrent qu'après une heure, l'hydrolyse est complète.

4.5. Chromatographie en phase gazeuse des hydrolysats de polysaccharides extracellulaires

a. Principe

La chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) n'est utilisable que pour des molécules de petit poids moléculaire, volatiles ou pouvant le devenir après traitement chimique. Dans cette technique, la phase mobile est un gaz inerte (gaz porteur) qui entraîne les substances dans une colonne qui contient la phase stationnaire (fig. 17). Lorsque cette phase stationnaire est un solide, on parlera de chromatographie gaz-solide (C.G.S.) et la séparation des diverses substances se fera suivant les propriétés d'adsorption des substances. Lorsque cette phase solide est recouverte d'un film liquide, on parlera de chromatographie de partage (46)(47). Après évaporation et entraînement de l'échantillon par le gaz porteur, les composants réagissent avec la phase stationnaire de la colonne, ce qui les ralentit. Le ralentissement dépend de l'aptitude des différents composés à se dissoudre ou à s'adsorber dans la phase stationnaire. Plus le composé est soluble ou s'adsorbe, plus il est retenu. Il arrivera plus tard en fin de colonne et donc au détecteur (47). Un schéma général de l'appareil est donné (fig. 18).

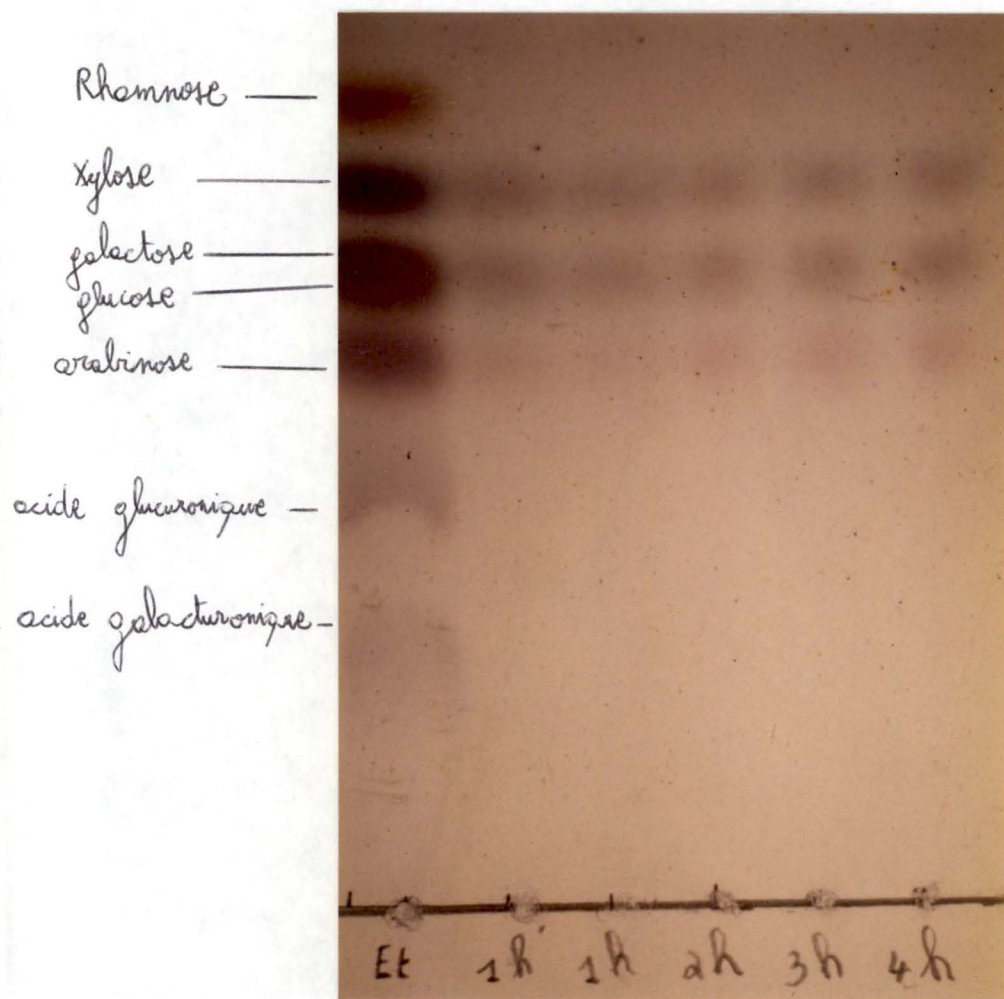


Photo 1 : Détermination du temps d'hydrolyse optimal par chromatographie couche mince. Après une heure, l'hydrolyse est complète.

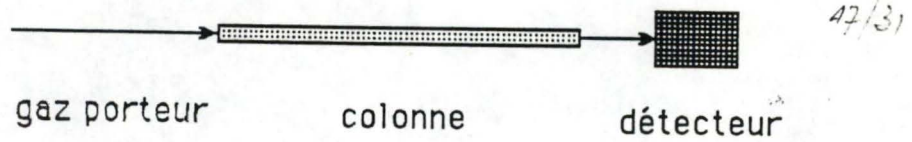


fig. 17 : Principe de la chromatographie en phase gazeuse.

(A. Burlet, 1988)

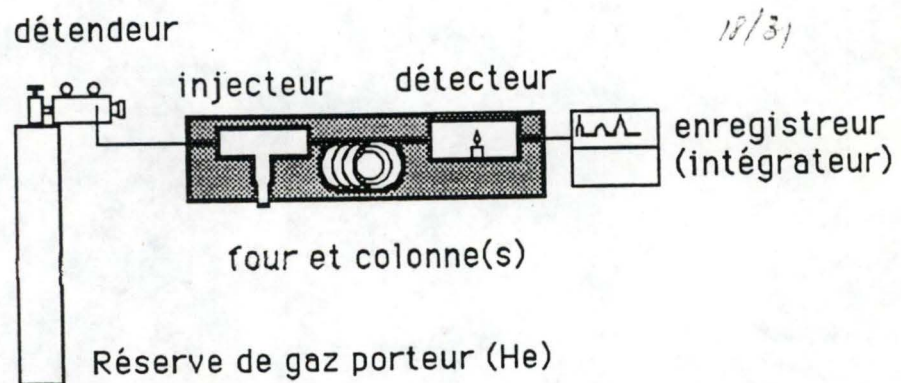


fig. 18 : Schéma du dispositif de chromatographie en phase gazeuse.

(A. Burlet, 1988)

b. Les colonnes

Elles peuvent être faites de différents matériaux : cuivre, acier inoxydable, aluminium, verre et, depuis peu silice fondue. De plus en plus, celles que l'on utilise sont des colonnes capillaires en silice fondue. Elles peuvent avoir une grande longueur (100 m), leur diamètre intérieur varie de 0,2 à 1 mm et l'épaisseur du film de phase stationnaire est de 1 à 7μ m. Leur garnissage est constitué par un solide actif (47).

- La phase stationnaire : c'est l'élément le plus important dans une colonne, il faut qu'elle soit stable thermiquement, inerte vis-à-vis des solutés et non volatile. Le choix de la phase dépend de la composition de l'échantillon à analyser. Les composés non polaires se séparent mieux sur des phases non polaires (SE 30) (fig. 19) et les composés polaires sur des phases polaires (Carborvax) (fig. 20). Ces deux types de phase sont les plus utilisés mais il en existe plus de 1000 spécialement appropriés à chaque sorte de séparation (49). Un bref aperçu de cette diversité est donné (fig. 21) (47).

c. Volatilisation (fig. 22) (Saulnier 1987) (Albersheim 1967)

Les sucres n'étant pas volatiles, il est nécessaire de les réduire avant de les acétyler. Cette réduction permet la fixation des groupements méthyles fournis par l'acétylation.

c.1. Réduction

On prépare une solution à 10 mg/ml de borohydrure de sodium dans l'ammoniaque 1M extemporanément. 250 μ l de cette solution sont ajoutés dans le ballon contenant le résidu sec de l'ose neutre à préparer. On place pendant une heure dans l'étuve à 60°C. Après refroidissement, l'excès de borohydrure est détruit par addition de 3 à 4 gouttes d'acide acétique glacial (arrêt du bouillonnement). Une première éva-

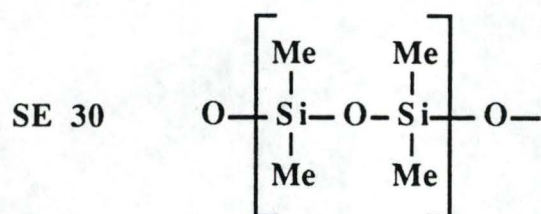


fig. 19 : Gomme méthyl silicone pour les produits non polaires (A. Burlet, 1988).

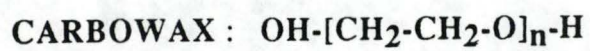


fig. 20 : Pour les produits polaires (A. Burlet, 1988).

Phase	T° (min/max)	Applications	Polarité
SE 30 OV 1 RSL 150 HP 1	50/300	Phénols, hydrocarbures Amines, composés sulfurés	<i>Non polaires</i>
HP 101 OV 101	0/350	Amino acides Huiles essentielles	<i>Non polaires</i>
HP 5 SE 52 SE 54	-60/325	Alcaloïdes, composés halogénés, Acides gras	<i>Non polaires</i>
OV 17 HP 17	25/280	Stéroïdes, Pesticides Glycols	<i>Intermédiaires</i>
CARBOWAX 20M SUPEROX	60/220 60/260	Acides, Alcools, Glycols Ethers, etc	<i>Polaires</i>

fig. 21 : Liste des colonnes et des phases les plus utilisées au laboratoire.

(A. Burlet, 1988)

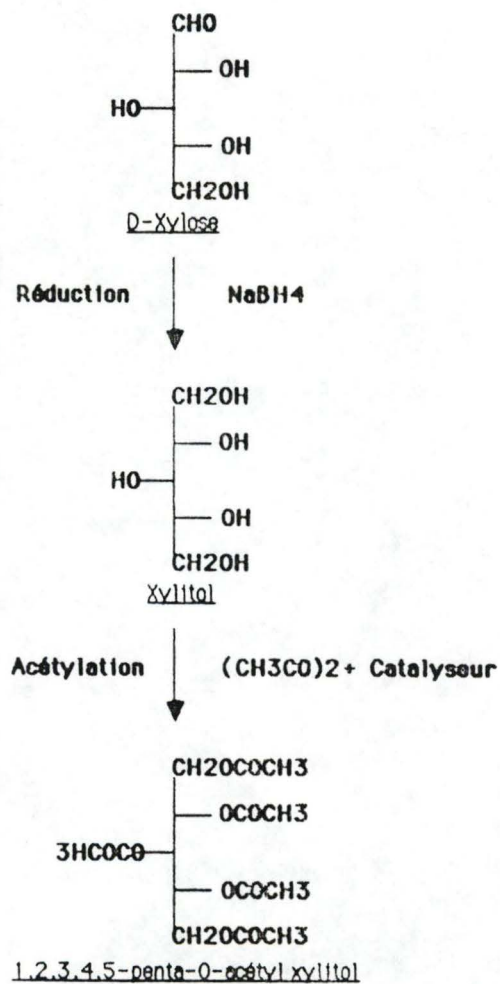


fig. 22 : Séquence chimique pour la préparation des acétates d'alditol (exemple de xylose).
(Saulnier, 1987)

poration, sous vide est effectuée et nous donne un résidu visqueux. Le milieu est ensuite repris par 3 x 250 μ l d'acide acétique à 10 % dans le méthanol puis 3 x 250 μ l de méthanol afin d'éliminer les ions borates, en amenant à sec par évaporation à 30 % C sous vide entre chaque étape. La dernière évaporation s'effectue dans des tubes à hydrolyse en Pyrex et sous un courant d'air.

c.2. Acétylation

Le résidu sec est acétylé par 200 μ l d'anhydride acétique à 120°C pendant deux minutes et en utilisant 100 μ l de pyridine comme catalyseur. L'échantillon est séché sous un courant d'air puis repris par 500 μ l d'eau et 500 μ l de dichlorométhane (il se forme deux phases). La phase organique est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et lavée par 3 x 500 μ l d'eau. L'échantillon est finalement amené à sec sous courant d'air, puis repris par un volume suffisant de dichlorométhane avant d'être injecté ou conservé au congélateur.

d. Séparation par chromatographie en phase gazeuse

Les acétates d'alditol sont séparés sur une colonne capillaire Supelco SP 2330 de 15 m de longueur et 0,25 mm de diamètre intérieur. La phase stationnaire est constituée de bixyanopropylphényl polysiloxane et forme un film de 0,20 μ m d'épaisseur. L'injection est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard HP 5890 et les résultats sont traités par un intégrateur HP 3393A. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- T° injecteur et détecteur : 300°C , T° colonne : isotherme 220°C.
- Volume injecté 1 μ l.
- Gaz porteur : Hélium.

Les facteurs de réponse sont calculés par injection d'une solution d'oses neutres témoins. Un exemple de séparation d'un mélange témoin avec les facteurs de réponse pour chaque ose est présenté (fig. 23).

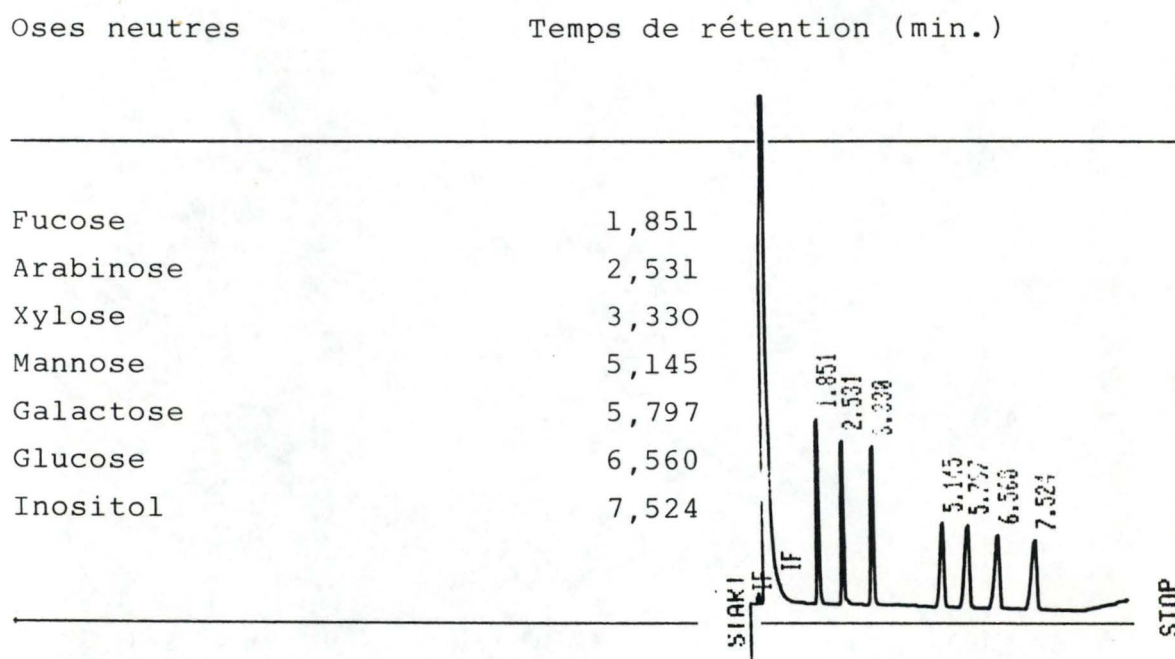


fig. 23 : Séparation par chromatographie en phase d'un mélange de 7 oses témoins avec leur facteur de réponse respectif.

N.B. : colonne Supelco SP2330, diamètre 0,25 mm,
L. 15 m

T° injecteur et détecteur : 300°C

T° colonne isotherme: 220°C

Volume injecté : 1 μ l

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude structurale des polyosides extra-cellulaires comprend inévitablement une étape de séparation et de purification à partir du matériel végétal choisi. Ensuite, l'analyse de la composition chimique et des paramètres physico-chimiques (masse moléculaire, charge...) permet de caractériser globalement les macromolécules et de déterminer le degré d'homogénéité des structures à étudier. L'étude structurale proprement dite peut être alors abordée en utilisant des méthodes enzymatiques, chimiques et physiques permettant de déterminer le type de liaison entre monomères et l'organisation générale du polyoside. Ce dernier point constitue les perspectives de notre travail.

Cette partie comprend un préliminaire et deux chapitres.

Préliminaire : Vérification rapide de la cinétique de développement de la culture des cellules de *Festuca arundinacea* (fig. 24)

Après une phase de latence de 3 à 4 jours, nous constatons une augmentation des valeurs pondérales jusqu'à environ 7 jours. C'est la phase exponentielle de croissance au cours de laquelle les cellules de petites tailles se divisent intensément. Après 8 jours de culture, la phase stationnaire se caractérise par des valeurs croissantes des paramètres pondéraux. Toutefois, dans cette zone, l'évolution du poids frais est plus importante que celle du poids sec. L'explication de ce phénomène peut s'envisager comme suit : il s'agirait d'une accumulation d'eau visant à rétablir l'isotonicité cellule-milieu perdue lors des deux premières phases de culture. M. Cereghetti (1987) a

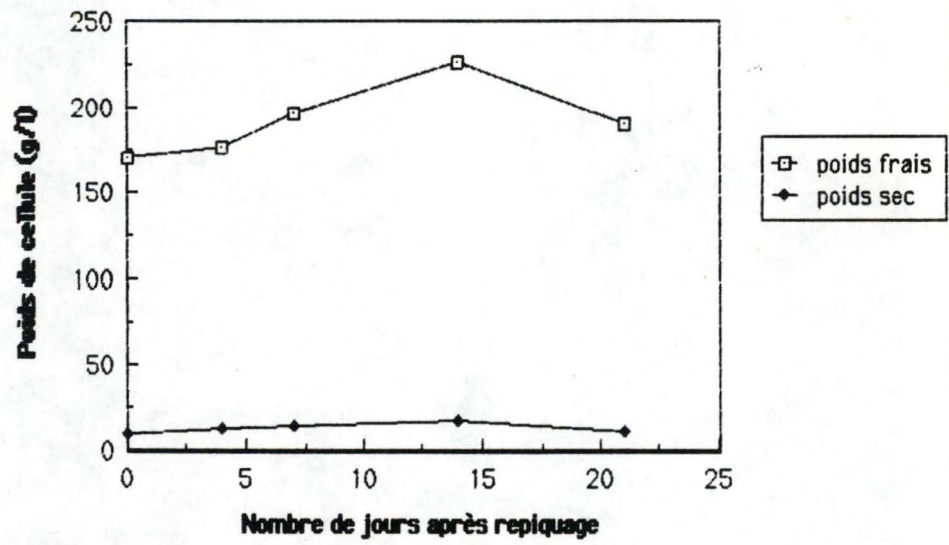


fig. 24 : Evolution des poids frais et sec des cellules en fonction du nombre de jours après repiquage.

observé une diminution rapide de la pression osmotique du milieu. Cette absorption d'eau augmente le poids frais mais n'influence que très peu le poids sec. Au-delà de 15 jours, la phase de sénescence s'installe : nous observons une diminution des poids frais et sec.

I. Etude de la dynamique d'excrétion des polysaccharides extracellulaires au cours du temps

I.1. Séparation

Elle met en oeuvre une ultrafiltration et une précipitation à l'éthanol. L'utilisation d'une cellule d'ultrafiltration équipée d'une membrane PM 10 (seuil de coupure 10000) permet d'obtenir un très bon dessalage des polysaccharides. Par sa facilité d'emploi et ses résultats, ce procédé concurrence le dessalage sur colonne ou la dialyse classique. Quant à la précipitation à l'éthanol, renseignée par Abbersheim (1974) et Saulnier (1987) comme moyen de précipitation globale, elle n'a entraîné la précipitation que de 0,17 g à 0,32 g/100g de cellules sèches (fig. 25), soit 3 à 4,5% du total des polysaccharides extracellulaires.

I.2. Dynamique d'excrétion

Nous constatons que la quantité de polysaccharides excrétés dans le milieu de culture (exprimée en grammes pour 100 g de cellules sèches) augmente au cours de la croissance (tableau 1).

Il semble qu'au cours du cycle de culture, il y ait trois phases distinctes concernant l'excrétion de polysaccharides (fig. 26). En effet, entre 4 et 7 jours, la quantité de polysaccharides excrétés dans le milieu ne connaît pas d'importantes variations puisque le complexe

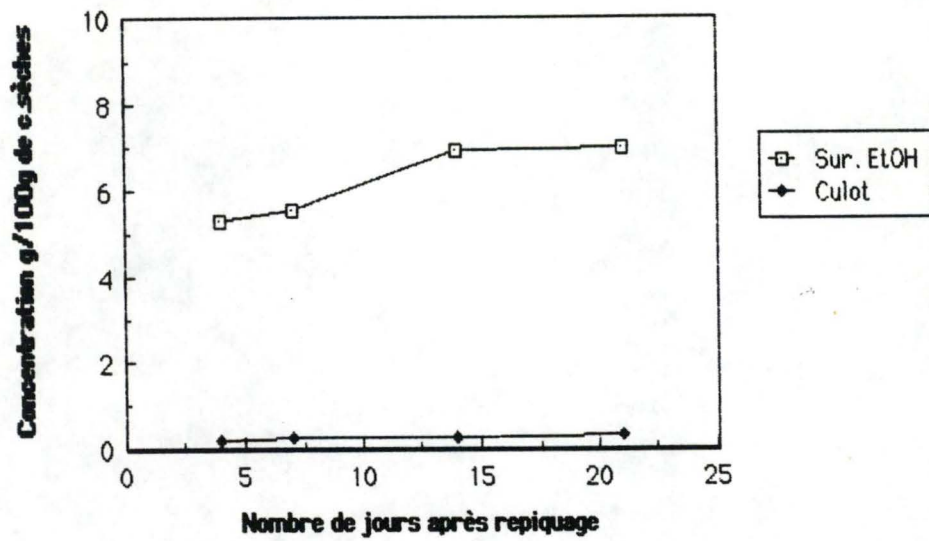


fig. 25 : Répartition des polysaccharides extracellulaires entre le culot et le surnageant éthanol en fonction du nombre de jours après repiquage.

Age (jours)	Poids de cellules sèches (g)	Poids du complexe CP/100 g de polyosidique CP(g)cellules sèches	
4	1,32	$6,1 \cdot 10^{-2}$	5,5
7	1,41	$8,2 \cdot 10^{-2}$	5,8
14	1,60	$9,6 \cdot 10^{-2}$	7,2
21	1,12	$8,1 \cdot 10^{-2}$	7,3

Tableau 1 : Quantité de polysaccharides excrétés par les cellules au cours de la croissance

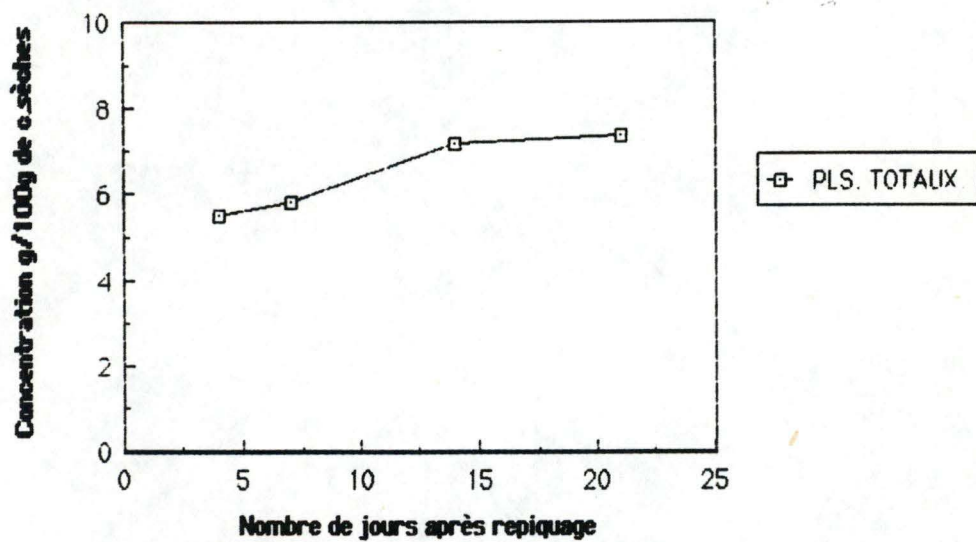


fig. 26 : Evolution de la quantité totale de polysaccharides extracellulaires, pour 100 g de cellules sèches, au cours du temps.

polyosidique représente respectivement 5,5 et 5,8 g/100 g de cellules sèches. Par contre, entre 7 et 14 jours, les cellules sécrètent plus activement des polysaccharides, qui constituent respectivement 5,8 et 7,2 g/100 g de cellules sèches. Enfin, après 14 jours de culture, la production de polysaccharides extracellulaires se stabilise. Nous confirmons de ce fait, la relation existant entre la sécrétion de polysaccharides et la croissance des cellules. Il apparaît que la sécrétion est plus active après la phase exponentielle de croissance des cellules, c'est-à-dire au moment où les divisions cellulaires ont cessé. L'excrétion accrue de polysaccharides pariétaux pourrait être une conséquence des remaniements des polysaccharides pariétaux, comme le proposent Takeuchi et Komamine (1980 a-b).

2. Caractérisation globale des polysaccharides excrétés

2.1. Evolution de la quantité de protéines du culot et du surnageant éthanol au cours du temps

La détermination du taux de protéines, mesuré par la méthode de Lowry (45), révèle la présence de 0,17 à 0,32 g de protéines pour 100 g de cellules sèches dans le culot et de 0,66 à 1,07 g de protéines pour 100 g de cellules sèches dans le surnageant éthanol (fig. 27). Des résultats similaires ont été obtenus par Olson (1969) et Abbersheim (1974). Ces polymères protéiques se trouvent généralement sous forme de glycoprotéines ou d'enzyme (peroxydases, glycosyl hydrolases, glycosyl transferase, phosphatase, ...). Les protéines riches en hydroxyprotène forment deux familles à localisation différente. Il y a, d'une part, la famille des protéines de structure, retrouvée exclusivement dans la paroi, et, d'autre part, des glycoprotéines peu présentes au sein de la paroi mais prédominantes dans le milieu de culture. Chez les dicotylées, nous retrouvons

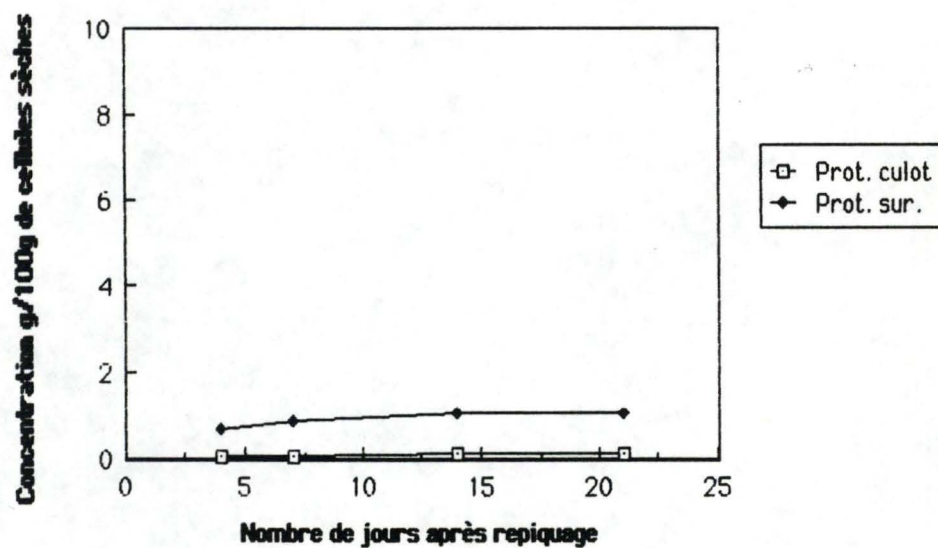


fig. 27 : Evolution des quantités de protéines du culot et du surnageant pour 100 g de cellules sèches en fonction du nombre de jours après repiquage.

les mêmes types de protéines, mais en plus faible quantité (Abbersheim, 1974).

2.2. Evolution de la quantité d'oses neutres et acides du surnageant éthanol et du culot au cours du temps (fig.28)

L'analyse à différents âges du surnageant éthanol et du culot fait apparaître la pauvreté en acides uroniques ($5 \cdot 10^{-3}$ -- $8,6 \cdot 10^{-2}$ g pour 100 g de cellules sèches) de ces complexes polyosidiques. Cette constatation est en accord avec les données de la littérature insistant sur la faible teneur en ces molécules des monocotylées (Saulnier, 1987) (Abbersheim, 1974). Chez les dicotylées, par contre, les complexes polyosidiques extracellulaires font apparaître un caractère acide marqué avec 1 à 2 g (pour 100 g de cellules sèches) d'acides uroniques (Abbersheim, 1974) (Cartier, 1987).

Le contenu en oses neutres du surnageant éthanol présente une légère augmentation (de 3,95 à 6,01 g de surnageant éthanol pour 100 g de cellules sèches) au cours de la croissance, cantonnée aux temps correspondants à la phase stationnaire. Cette augmentation cadre bien avec l'idée énoncée auparavant postulant une excrétion accrue de polysaccharides durant cette phase stationnaire (35) (36).

La variation importante de la quantité d'oses neutres du culot enregistrée à 14 jours est plus difficile à interpréter. Sans exclure une erreur expérimentale, on observe cependant une corrélation inverse entre le contenu en protéines et la quantité d'oses neutres du culot à 14 jours. Dès lors, une action hydrolytique plus intense pourrait expliquer la plus faible teneur en polysaccharides insolubles à l'éthanol après 14 jours de culture. Les enzymes clivent les polysaccharides en divers oligosaccharides plus solubles dont certains s'échappent lors de l'ultrafiltration

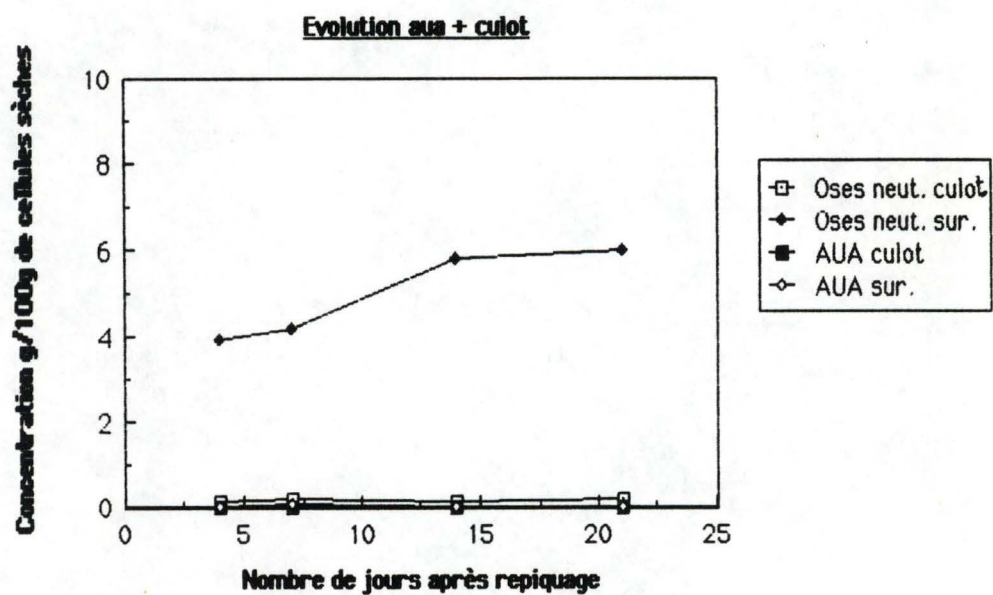


fig. 28 : Evolution des quantités d'oses neutres et d'acides uroniques du surnageant éthanol et du culot à 4, 7, 14 et 21 jours.

de départ effectuée avec une membrane de cut off égale à 10000.

2.3. Chromatographie des polysaccharides
des surnageants éthanol sur DEAE
sepharose CL 6 B

2.3.1. DEAE sepharose CL 6 B utilisé
comme échangeur d'ions

Les polyosides neutres sont élués de la colonne par un tampon acétate 0,01 M (pH 4,8), les fractions acides étant décrochées par l'application en paliers de 3 tampons acétates (0,1 , 0,5 et 1 M , pH 4,8). Les résultats de cette chromatographie sont rapportés à la figure 29. Les chromatogrammes des polyosides neutres de 4, 7 et 14 jours présentent une grande similitude tant dans le tracé qu'en hauteur de pic. Quant aux fractions polysaccharidiques acides, l'élution par palier n'a révélé à aucun moment leur présence par un pic d'élution.

Ces résultats de chromatographie nous amènent à supposer que la faible quantité d'acides uroniques décelée par dosage colorimétrique a été :

- perdue lors de la manipulation de déprotéinisation,
- ou noyée dans le bruit de fond du détecteur placé en sortie de colonne,
- ou adsorbée irréversiblement dans la colonne.

La troisième solution semble la plus probable car nous avons constaté la fixation irréversible sur ce gel du bleu de dextran, molécule pourtant peu chargée. Cette situation pourrait sans doute se modifier en utilisant un gel de polyacrylamide au lieu du gel d'agarose. En effet, dans ce cas, le risque d'adsorption irréversible deviendrait très faible puisqu'il n'existerait plus d'analogie entre les polysaccharides à séparer et le gel.

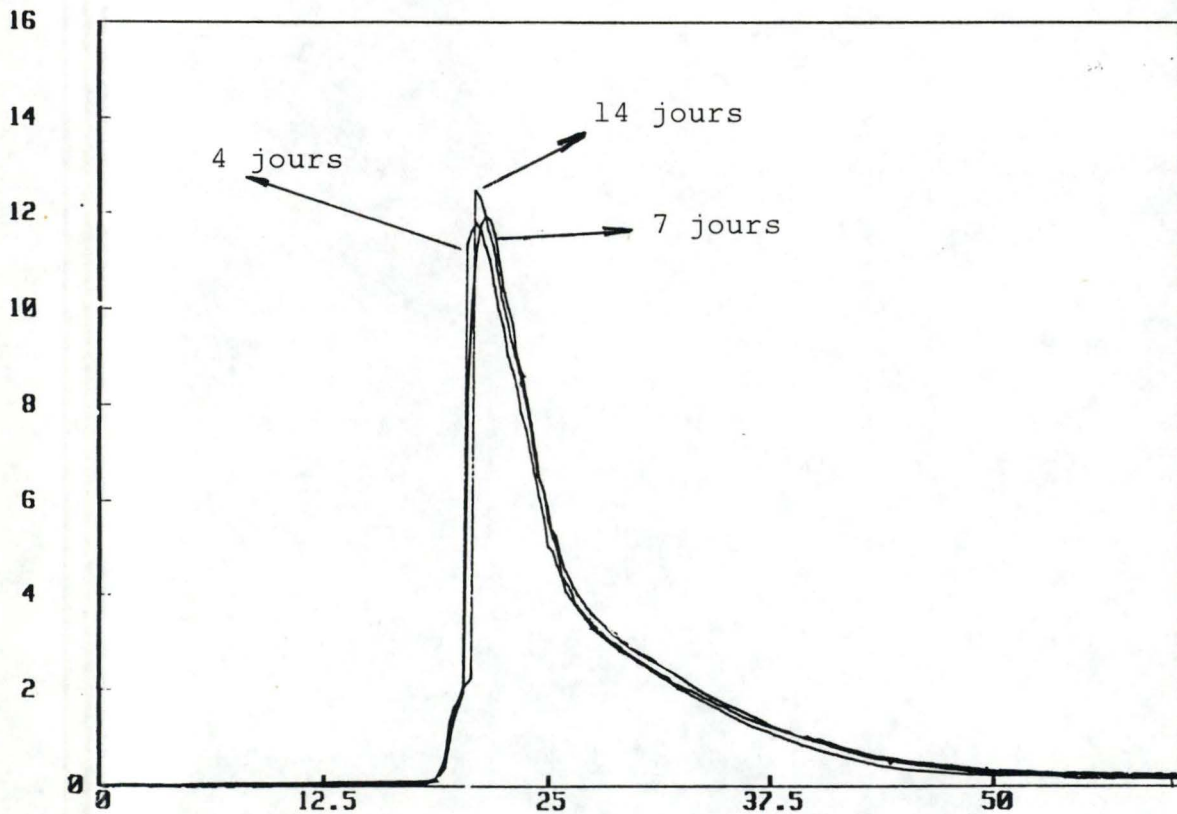


fig. 29 : Superposition des chromatogrammes des polyosides neutres des cultures de 4, 7 et 14 jours. Chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE sepharose CL 6 B. Colonne diamètre intérieur 2 cm, L = 17 cm tampon Na-O-Ac 0,01 M, débit 40 ml/h.

2.3.2. DEAE sepharose CL 6 B utilisé comme gel de tamis moléculaire

Ne possédant pas ou presque pas de polysaccharides chargés, nous avons décidé d'utiliser le DEAE sepharose CL 6 B comme support de tamis moléculaire. Exception faite des groupements diéthylaminoéthyle (DEAE), ce gel possède les mêmes propriétés que son analogue de tamis moléculaire, le sepharose CL 6 B.

Nous avons chromatographié les complexes polysaccharidiques extracellulaires d'âges extrêmes (4 et 21 jours), afin d'évaluer l'homogénéité de poids moléculaire des polysides végétaux au cours du temps. Les résultats de cette chromatographie sont rapportés à la figure 30. En passant de 4 à 21 jours, les tracés font apparaître un épaulement vers les faibles poids moléculaires. Cette constatation suggère une augmentation de l'hétérogénéité de masse des polysaccharides extracellulaires avec le temps. A ce stade des analyses, nous ne pouvons affirmer l'existence de polysaccharides différents. L'apparition de faibles poids moléculaires peut aussi bien s'expliquer par une action enzymatique plus importante durant la phase de sénescence. Dans ce cas, il s'agirait du même polysaccharide réparti en fragments de plus faible masse moléculaire suite à une action enzymatique accrue après 21 jours de culture.

2.4. Utilisation de l'HPLC pour analyser les hydrolysats de polysaccharides extracellulaires

Les différents tests d'étalons osidiques réalisés sur nos colonnes montrent une bonne séparation des différents oses, à l'exception du glucose et galactose (fig. 31). Ces deux hexoses étant présents dans nos complexes polysaccharidiques extracellulaires, nous devons renoncer à l'emploi

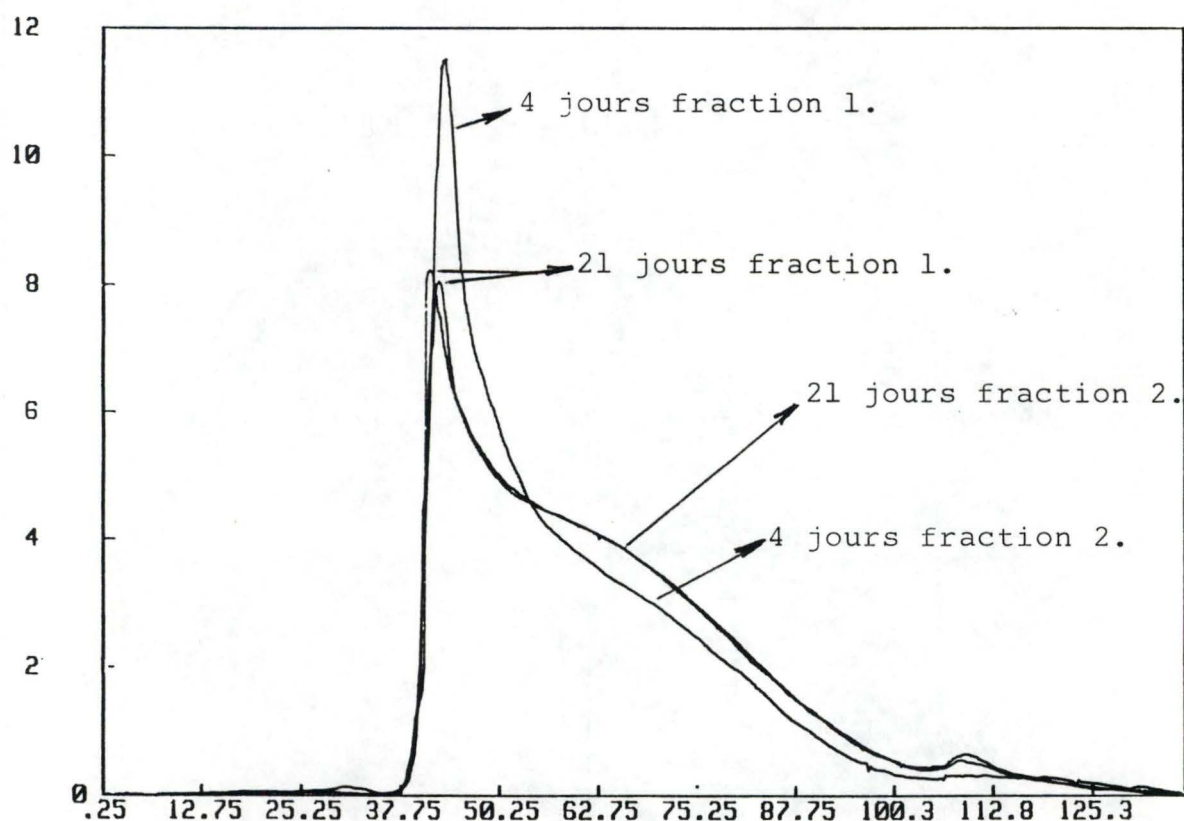


fig. 30 : Superposition des chromatogrammes des polysaccharides neutres de culture de 4 et 21 jours. Chromatographie de perméation gel sur DEAE sépharose CL 6 B neutralisé par un tampon 0,1 M Na Cl. Diamètre interne de la colonne : 1,5 cm Longueur : 50 cm Débit : 40 ml/h Cette chromatographie montre une augmentation d'hétérogénéité de poids moléculaire au cours du temps. La fraction 2 prenant plus d'importance après 21 jours de culture.

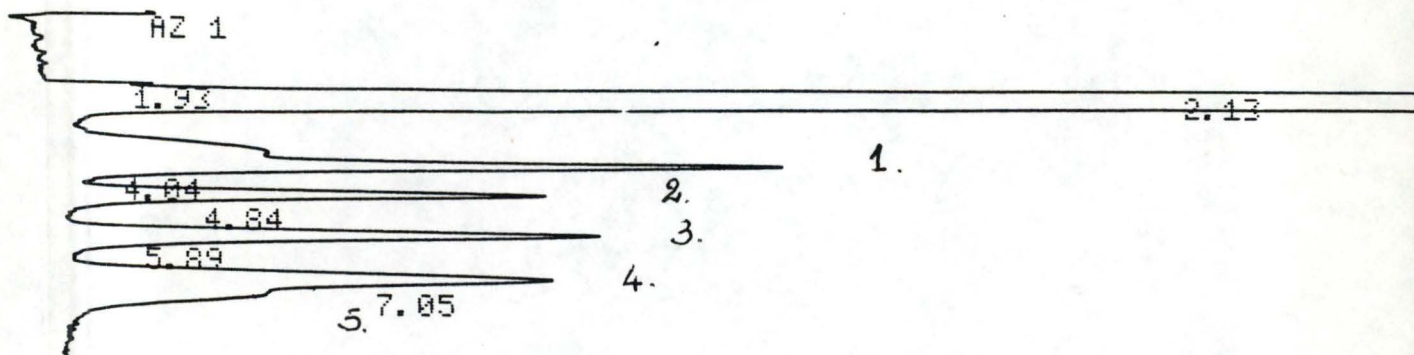


fig. 31 : Séparation par HPLC d'un mélange de 5 oses neutres. On constate que galactose et glucose ne sont pas bien résolus.

- 1 = Rhamnose
- 2 = Xylose
- 3 = Fructose
- 4 = Glucose
- 5 = Galactose

de cette technique jusqu'à ce que nous trouvions une colonne résolvant le galactose indépendamment du glucose.

2.5. Analyse par chromatographie en phase gazeuse des hydrolysats de différents complexes polyosidiques extracellulaires

2.5.1. Vérification de l'aspect quantitatif de cette technique

Pour ce faire, nous avons étudié l'évolution de la surface des pics et des facteurs de réponse en fonction de concentrations croissantes de 7 oses témoins. L'observation du graphe des surfaces de pics (fig. 32) nous montre une évolution linéaire de celles-ci pour les concentrations testées. Le fucose 0,99 excepté, tous les autres sucres donnent un coefficient de corrélation égal à 1 (annexe 1).

L'étude des facteurs de réponse (fig. 33) nous apprend deux choses :

- Le fucose, l'arabinose et le xylose forment une famille de sucre facilement détectables tandis que mannose, galactose, glucose et inositol, à concentrations égales, se caractérisent par une plus faible réponse en CPG (de 36 à 43 % en moins).
- Chaque sucre présente un facteur de réponse constant pour la gamme de concentration testée.

Les temps de rétention des 7 oses témoins (tableau 2) évoluent de façon similaire : c'est le nombre d'atomes d'oxygène qui est à la base des différences entre ces deux familles. En effet, dans la famille des sucres rapides, nous comptons cinq atomes d'oxygène alors que nous en avons six pour les autres sucres. Ces atomes d'oxygène sont en partie responsables du caractère polaire des composés. Dès lors, sur

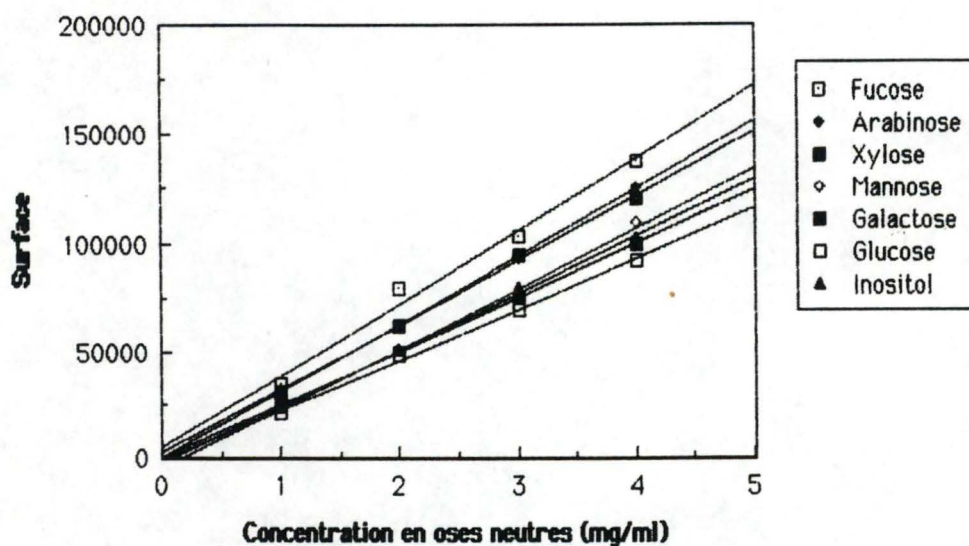


fig. 32 : Evolution de la surface des pics de 7 oses neutres détectés par chromatographie en phase gazeuse en fonction de concentrations croissantes.

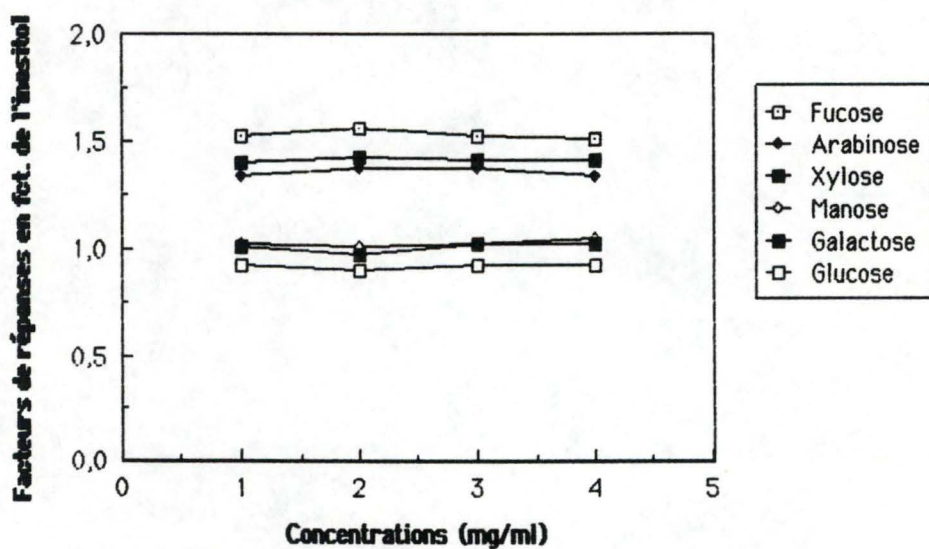


fig. 33 : Evolution des facteurs de réponse en chromatographie en phase gazeuse de 6 oses neutres en fonction de concentrations croissantes.

Oses neutres

Temps de rétention (mi)

Fucose	1,851
Arabinose	2,531
Xylose	3,330
Mannose	5,145
Galactose	5,797
Glucose	6,560
Inositol	7,524

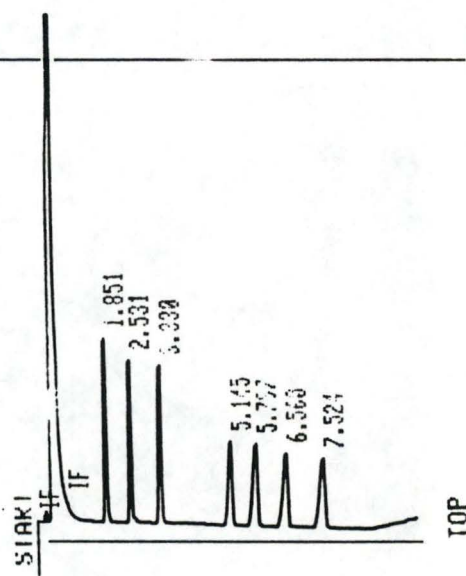


Tableau 2 : Temps de rétention de 7 oses témoins.

notre colonne très polaire, les composés à 6 atomes d'oxygène vont être plus fortement adsorbés que ceux renfermant 5 atomes d'oxygène. Au sein d'une même famille, l'ordre de sortie est aussi déterminé par la présence plus ou moins importante d'autres atomes à caractère polaire (47).

S'il est vrai que le mode de préparation des acétates d'alditols que nous utilisons permet d'obtenir de bons résultats, il nous paraît toutefois intéressant de le comparer à celui proposé par Harris (1983). Parmi toutes les modifications qu'il propose deux apportent des avantages par rapport à notre technique :

- Utilisation de diméthyl sulphoxide (DM SO) comme solvant de la solution réductrice :
l'emploi du DMSO présente deux avantages. Premièrement, la solution de borohydrure ainsi préparée est stable, durant plusieurs jours à l'inverse de la solution aqueuse qui doit être fraîchement préparée. Deuxièmement, le DMSO, à l'opposé de l'eau, n'interfère pas avec l'anhydride acétique durant l'acétylation.
- Acétylation des alditols en présence de borate :
dans notre préparation, les ions borates formés à partir du Na BH_4 doivent être éliminés sous forme de triméthyl borate par des évaporations au méthanol. Nous risquons par ce fait des pertes d'échantillon. Dans la méthode proposée par Harris, ce problème ne se pose pas car le catalyseur utilisé pour l'acétylation (le 1-méthylimidazole) reste efficace même en présence de borates.

En résumé, la méthode d'Harris se démarque de celle d'Abbersheim (que nous avons utilisée) surtout par

l'acétylation en présence de borate. Cependant, elle n'offre pas de meilleurs résultats et n'est pas beaucoup plus rapide. Enfin, le nombre de produits à utiliser est le même, il faut donc aussi veiller à l'extrême pureté de ces réactifs.

2.5.2. Discussion des chromatogrammes

2.5.2.1. Chromatographie en phase gazeuse des hydrolysats du culot (fig. 34)

L'ose neutre, de loin le plus abondant est le xylose, vient ensuite l'arabinose, le galactose et le glucose (dans des rapports 6/1,5/1/1) . . . Leur présence suggère l'existence de xylanes. La grande quantité de xylose donne l'idée de xylanes peu branchées et dès lors insolubles. Cela se retrouve dans la littérature . Ainsi, Mc Neil et al. (1984) émettent l'hypothèse que la solubilité des xylanes dépend de leur degré de branchement. La composition de ce type d'hémicellulose ainsi que des structures ont déjà été décrites lors de l'introduction de ce travail. L'abondance de tels composés chez les monocotylées est l'expression d'un rôle structural joué par ces polysaccharides. Au sein de la paroi végétale, ils assurent la liaison par pont hydrogène entre la cellulose et la matrice (55). La présence de mannose et de glucose, à des taux plus faibles, est aussi mentionnée dans les complexes extracellulaires de monocotylées (Abbersheim, 1974).

2.5.2.2. Chromatographie en phase gazeuse des hydrolysats du surnageant éthanol (fig. 35)

La composition osidique de cette fraction diffère de celle du culot. Les oses neutres les plus abondants sont le xylose, l'arabinose et le galactose (dans des rapports : 1,5/1,2/1). Leur présence suggère l'existence d'arabinoxylones

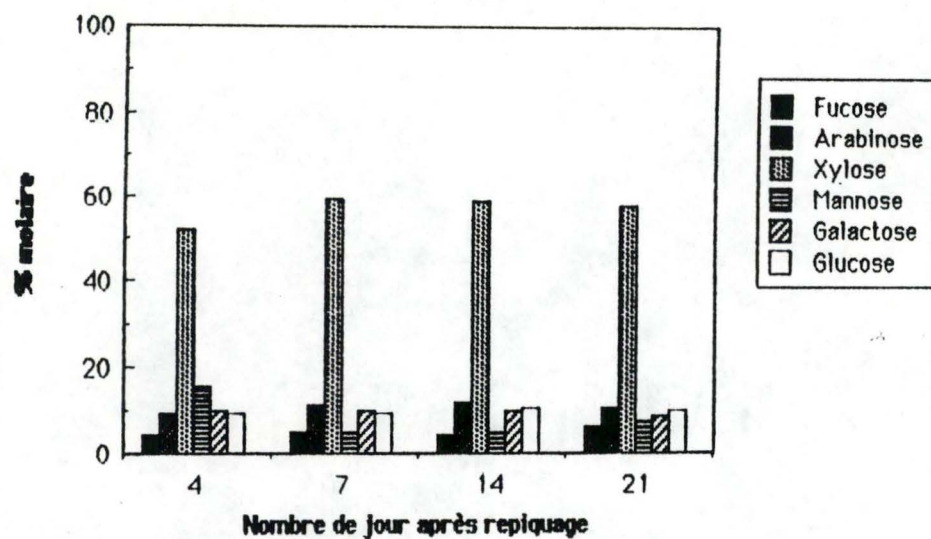


fig. 34 : Composition en monomères osidiques du culot à 4,7,14 et 21 jours déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

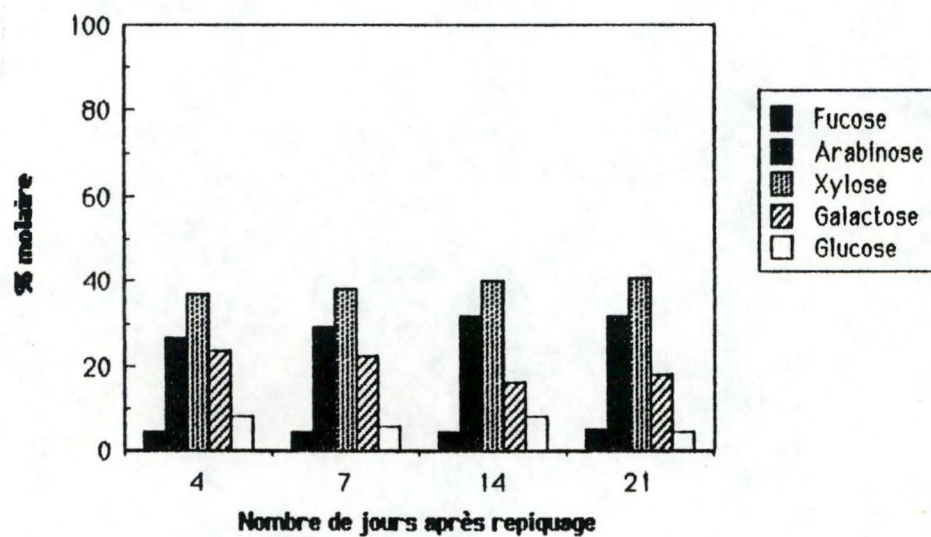


fig. 35 : Composition en monomères osidiques du surnageant éthanol à 4,7,14 et 21 jours déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

fortement branchées et, de ce fait, solubles. Ces arabinoxylanes possèdent de multiples structures dont voici un aperçu fig. 36 (Mc Neil, 1984). La présence d'arabinoxylanes semble être courante. Ainsi, Albersheim et al. (1974), Whistler et al. (1970), ...en isolèrent à partir de nombreux tissus de monocotylées. Cette répartition quasi universelle fait de ce type d'hémicellulose un des composants principaux des parois primaires des polysaccharides extracellulaires des monocotylées (Albersheim, 1974). De plus, la similitude de composition entre arabinoxylanes de paroi et extracellulaires fait de ces dernières un bon modèle pour l'étude des polysaccharides.

2.5.2.3. Chromatographie en phase gazeuse sur tamis moléculaire (fig. 37) (Annexe 4)

Les résultats de la chromatographie sur tamis moléculaire nous ont démontré une augmentation d'hétérogénéité de poids moléculaire au cours du temps. Devant ce fait, nous avons alors invoqué deux hypothèses explicatives : d'une part, la présence de deux polysaccharides différents et, d'autre part, l'hydrolyse du même polyoside. A présent, avec l'analyse en phase gazeuse nous espérons trancher cette question. Cependant, s'il est vrai qu'il existe pour 4 et 21 jours une différence dans la composition en monomère osidique entre les fractions 1 et 2, nous ne pouvons nous prononcer sur l'exactitude de l'un ou de l'autre postulat. L'absence de glucose dans les fractions 2 pourrait provenir d'une perte d'échantillon lors de la préparation des acétates d'alditol. Dans ce cas, il s'agirait essentiellement d'une hydrolyse du polysaccharide et c'est pourquoi il n'y a pas (excepté le glucose) de modification de la composition en monomère.

Sidechains	Source	Approximate proportions
α -L-Araf-(1-3)-	Gymnosperms Dicots	5-20% Usually absent; \leq 5% in woody angiosperms
	Secondary walls in monocots	8-25%
	Primary walls in monocots	30-40%
4 -Me- α -D-GlcpA-(1-2)-	Gymnosperms Hardwoods Other dicots Monocots	14-18% 8-12% Variable, usually \sim 10% Variable, usually $<$ 5%, absent in primary wall arabinoxylans
α -D-GlcpA-(1-2)-	Monocots	Variable, rarely $>$ 5%
α -D-Xylp-(1-3)-L-Araf(1-	Dicots	Probably artifacts
β -D-Xylp-(1-2)-L-Araf(1-3)-		
β -D-Galp-(1-5)-L-Araf(1-		
β -D-Galp-(1-4)-D-Xylp(1-	Secondary walls in monocots	In total up to 13%, but individually $<$ 5%
D-[or L-] Galp-(1-4)-D-Xylp-(1-2)-L-Araf-(1-		
[4 -Me]- α -D-GlcpA-(1-4)-D-Xylp-(1-4)-D-Galp-(1-		

fig. 36 : Exemples de structures d'arabinoxylanes
(Mc Neil et al., 1984).

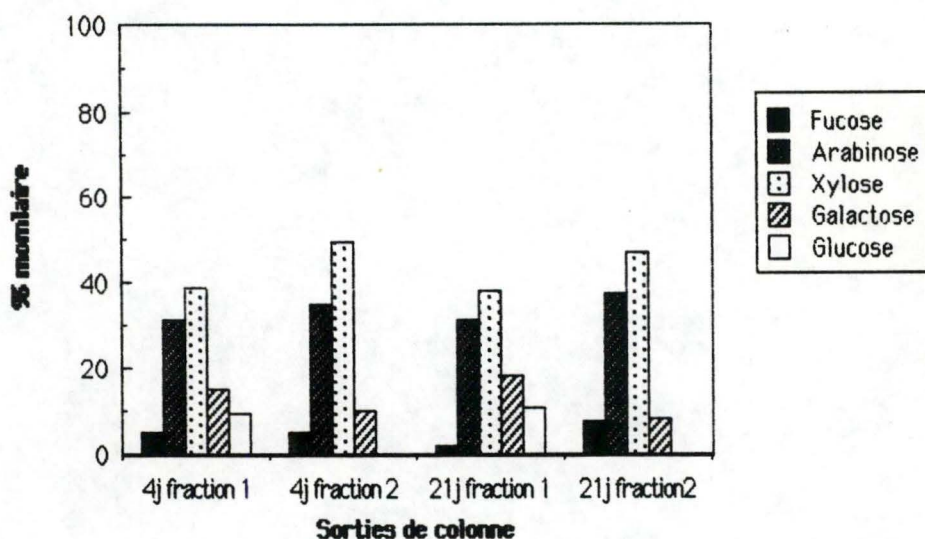


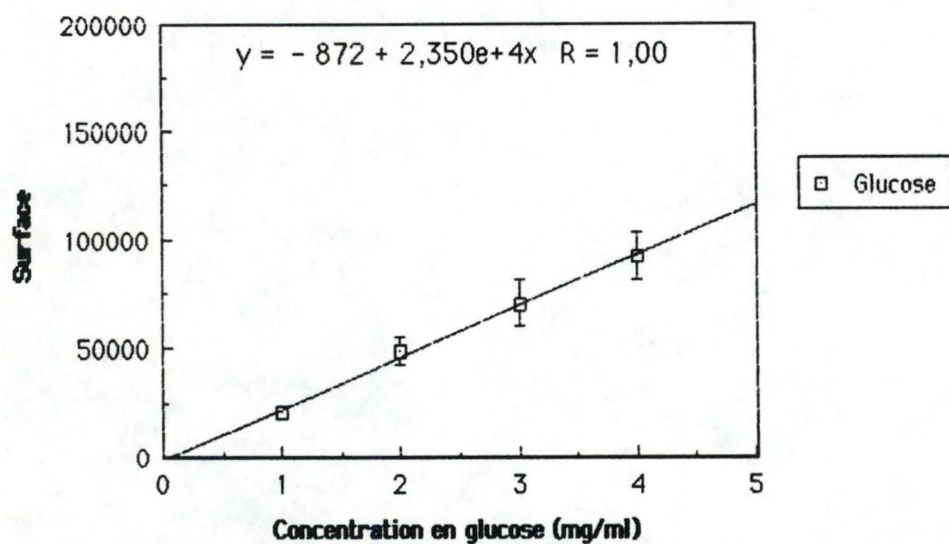
fig. 37 : Composition en monomères osidiques des fractions polysaccharidiques 4 j.1, 4 j.2, 21 j.1 et 21 j.2 déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Cette technique nous donne à penser que l'hétérogénéité de poids moléculaire découverte par le tamis moléculaire est due à l'hydrolyse du même polyside. En effet, exception faite du glucose, les compositions en monomères des deux fractions à chaque temps sont identiques.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

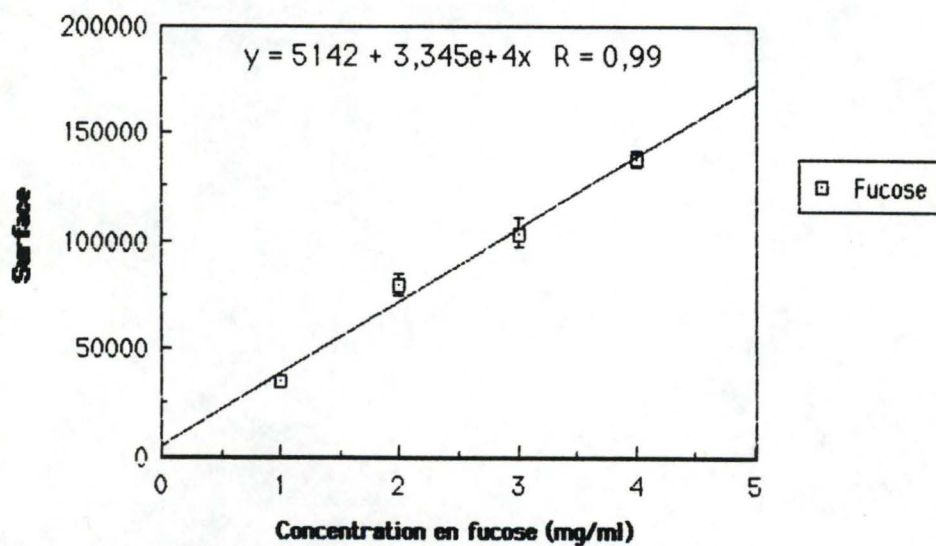
L'étude préliminaire des polysaccharides extracellulaires des cultures en suspension de Festuca arundinacea nous a permis de maîtriser une série de méthodes allant du dosage calorimétrique à l'analyse en chromatographie gazeuse. L'utilisation, en routine, de ces différentes techniques nous a permis dans un premier temps d'établir les quantités de protéines, d'oses neutres et d'acides uroniques excrétés dans le milieu. Ensuite, une série de chromatographies basse pression (échangeuse d'ions, tamis moléculaire) effectuées sur le surnageant éthanol n'enregistra aucune détection de pics de polyosides acides. Cependant, elle fit apparaître une augmentation d'hétérogénéité de poids moléculaire au cours du temps. Finalement, la chromatographie en phase gazeuse nous indiqua la présence de xylanes peu branchées dans le culot et d'arabinoxylanes branchées dans le surnageant. Ce même moyen d'analyse détecta de faibles quantités de fucose, glucose, monnose, et attribua plus probablement l'augmentation d'hétérogénéité de poids moléculaire à une hydrolyse d'un même polysaccharide.

L'intérêt de ce travail résidait dans la démonstration de la possibilité d'étude de la structure polyosidique de la paroi par le biais de l'analyse des polysaccharides extracellulaires. Les résultats de ce travail étant largement positifs, il s'avère qu'une telle approche présente les avantages d'une progression plus rapide (pas besoin d'isolement). Cependant, l'examen des ressources d'un si vaste sujet est loin d'être terminé. L'analyse en spectrométrie de masse des dérivés méthylés, la R.M.N., l'H.P.L.C., les hydrolyses enzymatiques ou l'isolement d'un des polysaccharides représentent quelques-unes des suites possibles de ce travail.

Annexe 1 : Exemple d'évolution linéaire des surfaces de deux oses neutres (glucose et fucose) détectés par chromatographie en phase gazeuse en fonction de concentrations croissantes.

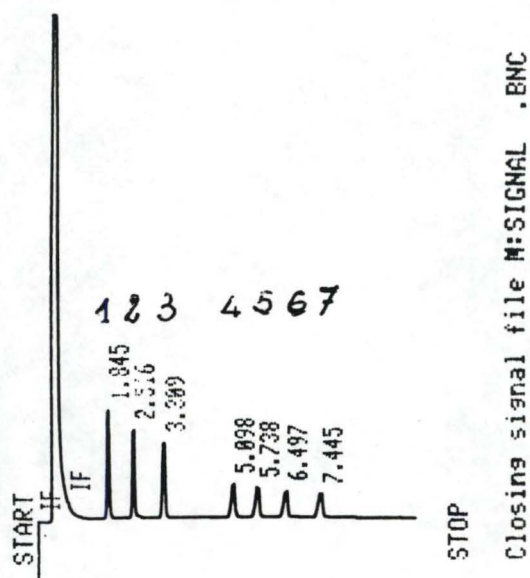


N.B.: \bar{x} = écart-type



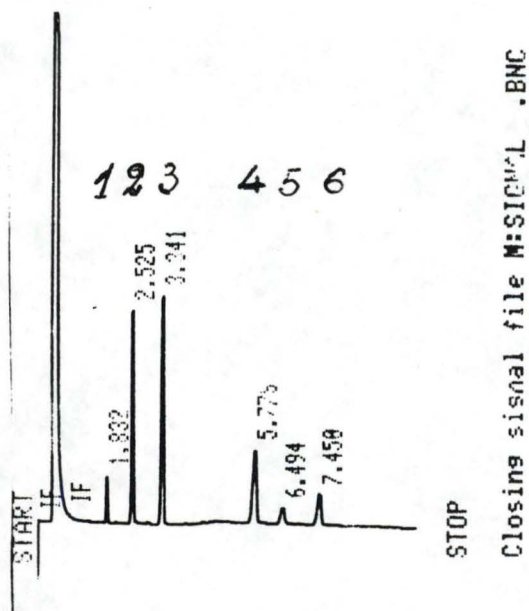
Annexe 2 : Représentation type d'une séparation par chromatographie en phase gazeuse des différents monomères présents dans les polysaccharides du culot.

(Conditions de travail, voir fig. 23)



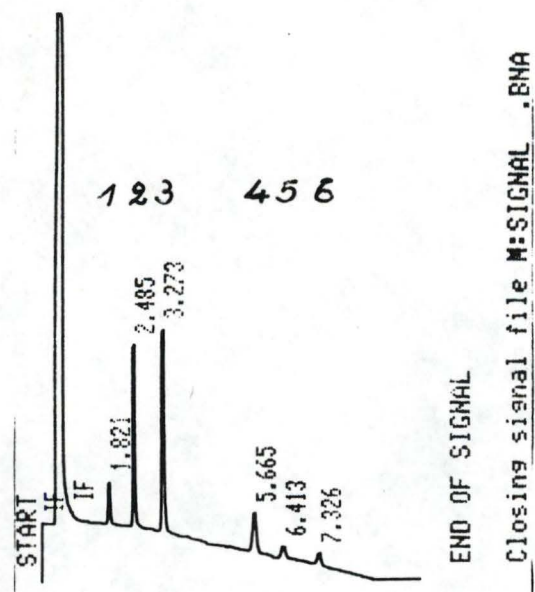
- 1 = fucose
- 2 = arabinose
- 3 = xylose
- 4 = mannose
- 5 = galactose
- 6 = glucose
- 7 = inositol

Annexe 3 : Représentation type d'une séparation par chromatographie en phase gazeuse des différents monomères présents dans les polysaccharides du surnageant éthanol.

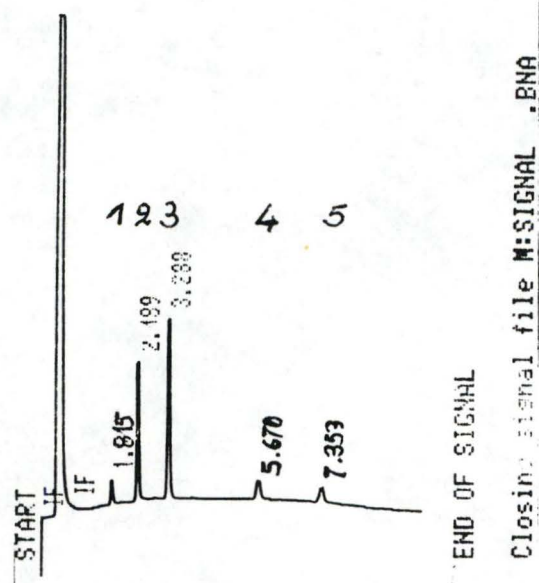


- 1 = fucose
- 2 = arabinose
- 3 = xylose
- 4 = galactose
- 5 = glucose
- 6 = inositol

Annexe 4 : Représentations types de séparations par chromatographie en phase gazeuse des monomères osidiques des fractions 1 et 2.



fractions 1 : 1 = fucose ; 2 = arabinose . 3 = xylose ;
4 = galactose ; 5 = glucose ; 6 = inositol .



fractions 2 : 1 = fucose ; 2 = arabinose ; 3 = xylose ;
4 = galactose ; 5 = inositol.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) J.H.Dodds, L.W.Roberts (1985).
Experiments in plant tissue culture, 2nd ed.
Cambridge University Press, 1-7.
- (2) B.Alberts, D. Bray, J. Lewis, M.Raff, K.Roberts,
J.D.Watson (1986).
Biologie moléculaire de la cellule.
Flammarion Médecine Sciences, chap. 19, 1135.
- (3) H.E.Street (1977).
Introduction : In plant tissue and cell culture .
ed. H.E.Street, Oxford : Blaxkwell Scientific
Publications, 1-10.
- (4) R.A.Dixon, (1985).
Plant Cell Culture a practical approach.
ed. R.A.Dixon, Oxford. Washington D.C. IRL Press, 4-7.
- (5) B.Tisserat (1985).
Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration
ed. R.A.Dixon, Oxford. Washington D.C. IRL Press, 84-98
- (6) J.H.Dodds, L.W.Roberts (1985).
Experiments in plant tissue culture 2nd ed., Part. 6 :
Organogenesis.
Cambridge University Press, 70-73.
- (7) J.H.Dodds, L.W.Roberts (1985).
Experiments in plant tissue culture 2nd ed., Part. 11 :
Somatic embryogenesis.
Cambridge University Press, 122-124.

- (8) J.H.Dodds, L.N.Roberts (1985).
Experiments in plant tissue culture 2nd ed., Part. 5 :
Initiation and maintenance of callus.
Cambridge University Press, 55.
- (9) P.J.King (1980).
Cell proliferation and growth in suspension cultures.
Int. Rev. Cytol. Supplement 11A, 25-54.
- (10) P.Morris et al. (1983).
Secondary product formation by cell suspension cultures.
ed. R.A.Dixon, Oxford Washington D.C.IRL Press, 127-164.
- (11) N.Cartier (1986).
Les Polysaccharides de la paroi primaire des cellules
de Rubus fruticosus cultivées en suspensions.
Intervention des polyosidoses endogènes dans leur réarran-
gement au cours de la croissance. Introduction, 11-14.
Thèse : Université Scientifique, Technologique et Médicale
de Grenoble (France).
- (12) M.W.Fowler (1983).
Applications and economics of plant culture.
ed. S.H.Mantell, Cambridge University press, 6-27.
- (13) W.S.York, A.G.Darwill, M.Mc Neil, T.T.Stevenson,
P.Albersheim (1986).
Isolation and characterisation of plant cell walls and
cell wall components.
Methods in Enzymology 118 : 3 -40.
A.Weissbach and H. Weissbach Eds.
- (14) L.Saulnier (1987).
Etude structurale des substances pectiques de la pulpe
de raisin (carignan rouge).
Thèse : Université Paul Sabatier Toulouse, n° 193.

- (15) P.Albersheim, A.G.Darvill (1985).
Oligosaccharins.
Scientific American, 253 : 58-64.
- (16) M.Mc Neil, A.G. Darvill, S.C.Fry,P.Albersheim (1984).
Structure and function of the primary cell walls of plants.
Ann. Rev. Biochem., 53 : 625-663.
- (17) A.L.Lehninger (1986).
Principes de biochimie : chap. 11 glucides : structure et
fonction biologique.
Flammarion Médecine-Sciences, 291.
- (18) P.Van Cutsem (1987).
Physiologie végétale, cours de première licence sciences
biologiques , F.N.D.P., 19-20.
- (19) K.Keegstra, K.W.Talmdage, W.D.Bauer, P.Albersheim (1973).
The structure of plant cell walls. III A model of the walls
of suspension-cultured sycamore cells based on the intercon-
nections of the macromoleculer components.
Plant physiol., 51 : 188- 196.
- (20) C.M.Duffus, J.H. Duffus (1984).
Carbohydrate metabolism in plants.
Longman group edition, 108 -111.
- (21) A. Heyraud (1981).
Chromatographies liquides appliquées à l'hydrolyse des
oligosaccharides.
Thèse : Université Scientifique, Technologique et Médicale
de Grenoble (France), 7 -36.
- (22) P.Van der Auwera, S.Levin (1986).
L'HPLC : apport à la recherche et à la routine.
Semper 4 : 29-32.

- (23) M.Hanocq (1986).
Chromatographie liquide à haute performance : considérations théoriques et générales.
Compte rendu de conférence, 9-20.
- (24) Allinger, Cava, Johnson, De Jongh, Lebel, Stevens (1976).
Chimie organique 1 Structure des molécules, chap. 5 : spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.
Mc Graw-Hill, Paris, 97-115.
- (25) F.Liners (1988).
Production et caractérisation d'anticorps poly- ou monoclonaux contre l'acide ~~α~~-L, 4 - homopolylacturonique.
Mémoire de licence en sciences biologiques, F.N.D.P.
- (26) D.Burke, P.Kaufman, M.Mc Neil and P. Albersheim (1974).
The structure of plant cell walls. VI A survey of the walls of suspension-cultured monocots.
Plant Physiol., 54, 109-115.
- (27) Y. Takeuchi and A.Komamine (1978).
Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured Vinca rosea cells during culture.
Physiol. Plant., 42, 21-28.
- (28) Y.Akiyama, S.Eda, M.Mori and K.Kato (1984).
An arabinoglucuronomannan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured Tobacco cells.
Agri. Biol. Chem., 48 (2), 403-407.
- (29) P.Albersheim, Thomas T.Stevenson, M.Mc Neil and A.G.Darvill (1986). Structure of plant cell walls. XVIII.An analysis of the ~~extracellular~~ polysaccharides of suspension cultured sycamore cells.
Plant Physiol. 80, 1012-1019.

- (30) N.Cartier (1986).
Les polysaccharides de la paroi primaire des cellules de Rubus fruticosus cultivées en suspensions. Intervention des polyosidoses endogènes dans leur réarrangement au cours de la croissance.
Deuxième partie : Etude des polysaccharides excrétés lors de la croissance.
Thèse, Université Scientifique Technologique et Médicale de Grenoble (France), 281-344.
- (31) T.S.Moose (1973).
An extracellular macromolecular complex from the surface of soybean suspension cultures.
Plant Physiol., 51, 529-536.
- (32) A.C.Olson, J.J.Evans, D.P.Frederick and E.F.Jansen (1969).
Plant suspension culture media macromolecules.
Pectic substances, protein and peroxydase.
Plant Physiol., 44, 1594-1600.
- (33) K.Kato and M.Noguchi (1976).
Sugar composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured Tobacco cells.
Agri. Biol. Chem., 40, 1923-1928.
- (34) A.Komamine and Y.Takeuchi (1980-a).
Turnover of the cell wall polysaccharides of suspension-cultured Vinca rosea cells during culture.
Physiol. plant., 48, 271-277.
- (35) A.Komamine and Y. Takeuchi (1980-b).
Turnover of arabinogalactan of the cell wall polysaccharides of suspension-cultured Vinca rosea cells during culture.
Physiol. Plant., 50, 113-118.

- (36) H.Morvan (1982).
Libération des polymères pectiques acides au cours de la
croissance des suspensions cellulaires de Silène.
Physiol. Vég. 20 (4), 671-678.
- (37) M.Cereghetti (1987).
Etude de la cinétique d'isolement et de fusion de protoplastes
de Festuca arundinacea (L.) Schreb.
Mémoire de licence en sciences biologiques F.N.D.P.
- (38) J.H.Dodds, L.N.Roberts (1985).
Experiments in plant tissue culture.
Cambridge University Press, 110-200.
- (39) H.E.Street (1977).
Plant tissue and cell culture.
Chap. 4 : cell suspension cultures-Techniques.
ed. H.E.Street, Blackwell Scientific publ. Oxford.
- (40) N.Cartier (1986).
Les polysaccharides de la paroi primaire des cellules de
Rubus fruticosus cultivées en suspensions. Intervention
des polyosidoses endogènes dans leur réarrangement au cours
de la croissance.
Partie expérimentale .
Thèse : Université Scientifique, Technologique et Médicale
de Grenoble (France), 402- 425.
- (41) Z.Dixhe (1953).
Orcinol essay for colorimetric dosage.
J.Biol. Chem. 204, 983.
- (42) F.Chapeville and H.Clauser (1978).
Biochimie : part II dosages colorimétriques.
Hermann edition, 86-95.

- (43) N.Blumenkrantz and G.Asboe-Hansen (1973).
New method for quantitative determination of Uronic acids
Analytical biochemistry 54 , 484-489.
- (44) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.Lewis Farr and R.J.Rendall
(1951).
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol. Chem., 193, 265-275.
- (45) P.Albersheim and D.J.Nevins (1967).
A method for the analysis of sugars in plant cell-wall
polysaccharides by gas-liquid chromatography.
Carbohyd. Res., 5, 340-345.
- (46) J.Remacle (1984).
Techniques biochimiques. Chap. III : les chromatographies.
F.N.D.P., 14-76.
- (47) A.Burlet (1988).
La chromatographie en phase gazeuse.
F.N.D.P., Département de chimie organique (A.Krief).
- (48) N.Cartier (1986).
Les polysaccharides de la paroi primaire des cellules de
Rubus fruticosus cultivées en suspensions. Intervention
des polyosidoses endogènes dans leur réarrangement au cours
de la croissance. Conclusion générale.
Thèse, Université Scientifique Technologique et Médicale
de Grenoble (France), 391-401.
- (49) J.Harris, A.B.Blakeney, R.J.Henry and B.A.Stone (1983).
A simple and rapid preparation of alditol acetates for
monosaccharide analysis.
Carbohyd. Res. , 113 , 291- 299.
- (50) R.L.Whistler and E.L.Richards (1970).
Hemicelluloses : the carbohydrates, vol. II A.
Academic Press, New York, 447- 469.