Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

**MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

# Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre le rhamnose, un ose neutre constitutif des pectines des parois des cellules végétales

Levêque, Carole

*Award date:*
1991

*Awarding institution:*
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

# PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX CONTRE LE RHAMNOSE, UN OSE NEUTRE CONSTITUTIF DES PECTINES DES PAROIS DES CELLULES VEGETALES.

LEVEQUE CAROLE

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**
**FACULTE DES SCIENCES**
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

# Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre le rhamnose, un ose neutre constitutif des pectines des parois des cellules végétales.

LEVEQUE Carole

Résumé

Au cours de ce travail, nous avons produit deux anticorps monoclonaux contre le rhamnose, un ose neutre constitutif des pectines des cellules végétales et souvent porteur de chaînes latérales. Pour ce faire, nous avons isolé par chromatographie anionique des fragments pectiques contenant du rhamnose. Après la fusion des cellules d'un myélome avec les lymphocytes B issus de la rate de souris immunisées, nous avons criblé par tests ELISA les hybridomes afin de détecter les clones intéressants. Nous avons obtenu deux anticorps monoclonaux d'isotypies différentes : une IgG1, le 8G11 et une IgG2b, le 10H1. Nous avons ensuite déterminé les conditions ioniques optimales pour la reconnaissance de l'épitope par nos anticorps et sommes parvenus à un test ELISA fiable nécessitant la présence de Tris 20mN et de Ca 1mN. Par ces tests ELISA adaptés à nos anticorps, par la chromatographie en phase gazeuse et par un marquage en microscopie électronique, nous avons pu confirmer que l'épitope reconnu par le 10H1 contient du rhamnose. Cet anticorps permettra de localiser rapidement le rhamnose porteur de chaînes latérales par rapport aux régions lisses homopolygalacturoniques.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 1991
**Promoteur** : Prof. P. VAN CUTSEM

Au terme de ce travail, je remercie Monsieur le professeur P. Van Cutsem pour l'accueil réservé dans son laboratoire ainsi que pour les conseils qu'il m'a donné tout au long de l'année.

Je remercie également les membres du département de Biotechnologie plus particulièrement F.Liners, J.Messian, P.Baes et A. Charlier pour leurs encouragements et leurs précieux conseils. J'adresse aussi un grand merci à P.Cambier pour son aide efficace.

Je tiens aussi à remercier les membres du département d'immunologie plus spécialement C. Didembourg pour son dévouement et sa bonne humeur perpétuelle, A.Magger qui m'a également aidé dans mon travail et toutes les personnes qui, d'une façon où d'une autre, m'ont renseigné et encouragé durant mon mémoire.

1 INTRODUCTION.....1

1.1 LA PAROI VEGETALE.....1

1.2 LES POLYSACCHARIDES DE LA PAROI.....1

1.2.1 La cellulose.....2
1.2.2 Les hémicelluloses.....2
1.2.3 Les pectines.....2

1.2.3.1 Les homogalacturonanes.....2
1.2.3.2 Les rhamnogalacturonanes I.....3
1.2.3.3 Les rhamnogalacturonanes II.....4
1.2.3.4 Biosynthèse des pectines.....5
1.2.3.5 Localisation des pectines .....5
1.2.3.6 Propriétés physico-chimique des pectines.....5
1.2.3.7 Propriétés biologiques des pectines..6
1.2.3.8 Intérêt général pour les pectines....7

1.3 ORGANISATION GENERALE DES POLYMERES PARIETAUX.....8

1.4 ETUDE DES POLYSACCHARIDES PARIETAUX.....8

1.4.1 Les sources de polysaccharides.....9
1.4.2 Les outils biologiques pour l'étude des sucres.....9

1.4.2.1 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux.....10
1.4.2.2 Utilisation d'anticorps monoclonaux.11
1.4.2.3 Anticorps monoclonaux et étude de la paroi.....12

1.5 BUT DU TRAVAIL.....13

2 MATERIELS ET METHODES.....14

2.1 PURIFICATION DU SURNAGEANT.....14

2.2 ANALYSE DES POLYSACCHARIDES.....15

2.2.1 Dosage qualitatif à l'orcinol sulfurique....15
2.2.2 Dosage quantitatif des oses neutres par la méthode de Dubois.....15
2.2.3 Dosage quantitatif des acides uroniques par la méthode au métahydroxybiphényle.....16
2.2.4 Obtention de chaînes latérales.....16
2.2.5 Analyse au chromatographe en phase gazeuse..17

2.3 IMMUNISATION DE L'ANIMAL.....18

2.4 PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.....18

2.4.1 Matériel cellulaire.....19
2.4.2 Protocole de fusion et sélection des hybridomes.....19
2.4.3 Le criblage.....20

2.4.3.1 Criblage par test ELISA.....20
2.4.3.2 Criblage par Dot-blot.....23

2.4.4 Le clonage.....23
2.4.5 Les ascites.....24

2.4.5.1 Production d'ascites.....24
2.4.5.2 Purification des ascites.....24

2.4.6 Stockage des hybridomes.....25

2.5 DEMARCHE SUIVIE POUR LA CARACTERISATION DE L'EPITOPE.....26

2.5.1 Inhibition anticorps-antigène.....26
2.5.2 Digestion enzymatique.....26
2.5.3 Précipitation des anticorps.....26
2.5.4 Analyse en phase gazeuse.....26

2.6 MARQUAGE DE COUPES PAR LA MICROSCOPIE.....27

3 RESULTATS ET DISCUSSION .....28

3.1 ANALYSE DE L'ANTIGENE.....28

3.1.1 Analyse colorimétrique.....28
3.1.2 Analyse par la chromatographie gazeuse.....29

3.2 IMMUNISATION DE L'ANIMAL.....30

3.3 LES ANTICORPS POLYCLONAUX.....30

3.3.1 Reconnaissance de l'antigène.....30
3.3.2 Dilution du sérum.....31
3.3.3 Optimalisation de la saturation.....31

3.4 LES ANTICORPS MONOCLONAUX.....33

3.4.1 Détermination isotypique.....33
3.4.2 Mise au point du test ELISA pour optimaliser les réponses du 10H1 et 8G11...34

3.4.2.1 Effet de tampons sur la réponse des anticorps contre l'antigène.....35

3.4.2.2 Effet de tampons sur la réponse des anticorps contre la pectine.....36

3.4.3 Courbe de dilution des ascites.....37
3.4.4 Inhibition des anticorps par le DP9.....38
3.4.5 Inhibition des anticorps par différentes concentrations antigèniques.....40
3.4.6 Inhibition des anticorps par différentes concentration de pectine.....41
3.4.7 Mise en évidence de la réassociation intermoléculaire des chaînes pectiques.....43
3.4.8 Optimalisation des conditions ioniques du test ELISA.....47

3.4.8.1 Effet d'un monovalent: le Na+.....47
3.4.8.2 Effet d'un monovalent: le Tris.....48
3.4.8.3 Effet de la concentration en calcium.....50
3.4.9 Analyse par la chromatographie en phase gazeuse de l'épitope reconnu.....51
3.4.10 Marquage électronique.....53

4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....55

5 BIBLIOGRAPHIE.....57

# 1 INTRODUCTION

## 1.1 LA PAROI VEGETALE

Les cellules végétales sont entourées d'un édifice complexe, épais et rigide: la paroi, constituée de microfibrilles de cellulose noyées dans une matrice amorphe de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines (figure 1.1).

La paroi remplit une variété de fonctions chez les plantes parmi lesquelles :

- elle constitue la charpente structurale de la cellule déterminant sa forme ainsi que sa taille,

- elle se présente comme une barrière physique aux microorganismes et autres agents pathogènes,

- certains oligosaccharides libérés de la paroi pourraient agir comme des molécules jouant un rôle régulateur de la physiologie cellulaire.

Dans une paroi végétale, on distingue la paroi primaire de la paroi secondaire sur base du moment de leur dépôt et de différences quant à leurs propriétés mécaniques et à leurs compositions chimiques. La paroi primaire est une structure dynamique qui entoure la cellule pendant la période d'expansion qui suit la division cellulaire. La paroi secondaire, quant à elle, est une structure plus statique qui est synthétisée chez les cellules matures lorsque la croissance est terminée (Weissbach,1986).

Les voies de synthèse, la structure et les différentes fonctions de la paroi sont loin d'être toutes connues et présentent un intêret certain pour les physiologistes. Du simple point de vue de la composition chimique de la paroi, on se heurte à une telle diversité de structures complexes qu'on n'est pas encore parvenu à proposer un modèle cohérent d'association des polymères cristallins et amorphes de la paroi, et d'en déduire un mécanisme d'action dans les phénomènes de croissance cellulaire.

Nous allons cependant, dans le paragraphe suivant, passer en revue les principaux composants pariétaux en ne nous attardant, toutefois, qu'aux composants pectiques.

## 2.2 LES POLYSACCHARIDES PARIETAUX

La paroi végétale présente une hétérogénéité de sa composition chimique.
En effet, on y observe généralement trois types de polysaccharides à savoir:
- la cellulose,
- les hémicelluloses,
- les pectines.

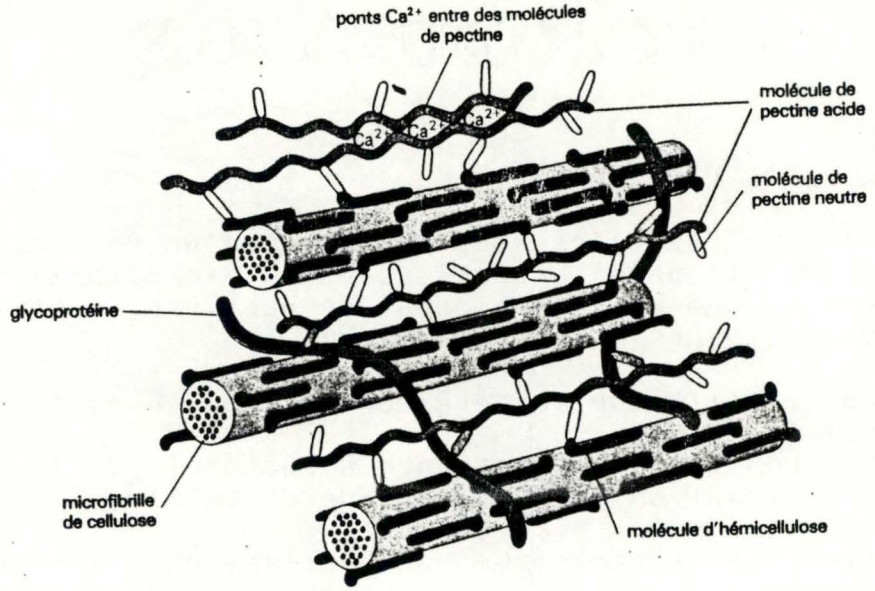



Fig 1.1 Constituants principaux de la paroi des cellules végétales (Alberts et col, 1988)

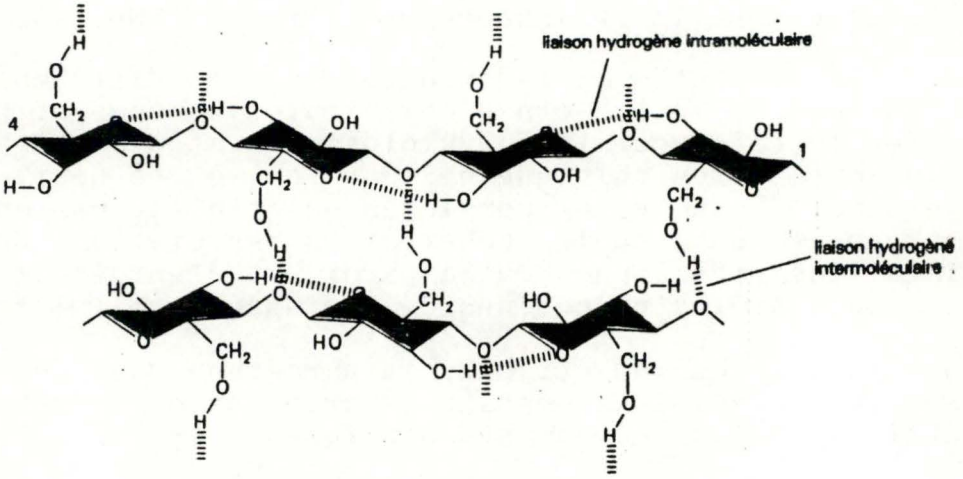



Fig 1.2 Chaînes de cellulose formées de résidus glucoses liés en β -1,4- (Alberts et col, 1986)

### 1.2.1 La cellulose

Abondante dans la paroi secondaire, elle est le polysaccharide le mieux connu. Ce polymère est formé d'une chaîne linéaire de $\beta$-1,4- D glucose. Cet enchaînement confère à chaque molécule une structure plate stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. De plus des liaisons intermoléculaires relient étroitement les chaînes adjacentes constituant ainsi une microfibrille (Alberts et col,1986) (figure 1.2).

### 1.2.2 Les hémicelluloses

Cette catégorie regroupe les polysaccharides capables de s'associer par ponts hydrogènes à la cellulose, réalisant ainsi la transition entre la phase cristalline cellulosique et la phase amorphe hémicellulosique et pectique. On y distingue:

- les xyloglucanes : polysaccharides neutres ayant un squelette de $\beta$-1,4- D glucose sur lequel se greffent des chaînes latérales de xylose,

- les xylanes : formées d'un squelette de xylose lié en $\beta$-1,4- sur lequel se greffent des arabinofuranoses et des acides glucuroniques,

- les $\beta$glucanes : formées d'une chaîne linéaire où alternent du $\beta$-1,4- glucose avec du $\beta$-1,3- glucose (Mc Neil et col,1984).

### 1.2.3 Les pectines

Elles constituent le troisième type de polysaccharides de la paroi. Il s'agit de polymères hétérogènes, ramifiés et très hydratés (Alberts et col,1986). Ce sont des molécules particulièrement riches en acide galacturonique, rhamnose , galactose et arabinose. Elles sont caractéristiques de la lamelle mitoyenne et de la paroi primaire des dicotylédones et sont aussi présentes, mais en moindre quantité, chez les monocotylédones.

#### 1.2.3.1 Les homogalacturonanes

La structure de base de ces polysaccharides est un enchaînement d'acides galacturoniques liés en $\alpha$-1,4- pouvant être partiellement méthyl-estérifiés. Les autres résidus saccharidiques en sont habituellement absents. Ces homopolygalacturonanes sont présents en quantité dans les fruits ainsi que dans la paroi primaire des cellules de dicotylédones.
Par convention, les homogalacturonanes faiblement méthyl estérifiées sont dénommées acides pectiques tandis que les molécules fortement estérifiées sont appelées acides pectiniques ou encore pectine, bien que cette terminologie fasse surtout référence aux molécules contenant des homogalacturonanes et des rhamnogalacturonanes liés par covalence (Mac Neil et col,1984) (figure 1.3).

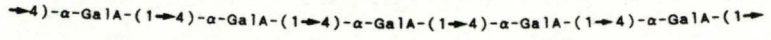



Fig 1.3 Structure de base des homogalacturonanes (Brett,1990)

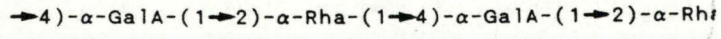



Fig 1.4 Squelette des rhamnogalacturonanes chez les cellules de sycomore (Brett et col,1990)

### 1.2.3.2 Les rhamnogalacturonanes I (RG I)

Le RG I est un polysaccharide très complexe qui a surtout été étudié à partir de parois de cellules d'érable en suspension traitées par une endopolygalacturonase qui solubilise le polymère par hydrolyse de son squelette.Il est formé d'un squelette d'acide galacturonique $\alpha$-1,4- alternant avec du rhamnose lié en $\alpha$-1,2-. Chez les cellules de sycomore, on trouve un rapport acide galacturonique/rhamnose d'environ 1-1 (figure 1.4). Chez d'autres cellules, on estime que ce rapport est faible et donc que le rhamnose est présent à des intervalles plus longs. Beaucoup de résidus galacturoniques de RG I sont méthyl-estérifiés. Le degré d'esterification varie selon la source de polymères pectiques (Mc Neil et col,1984).
Il est en général élevé dans les pectines natives où les fonctions estérifiées sont réparties en blocs. Des groupements hydroxiles peuvent être également acétylés. A nouveau le taux d'acétylation est très variable et peut être important, comme par exemple dans les pectines de betterave sucrière (Fry,1988)
Le squelette du RG I est long, et même après extraction de la paroi et traitement enzymatique,le degré de polymérisation atteint 2000 unités (Albersheim,1990).

Nous venons de le voir, la deuxième caractéristique fondamentale des RG I, après les acides galacturoniques, est la présence du rhamnose qui a pour effet d'induire une déviation de l'ordre de 90° dans l'alignement de la chaîne, on parle ainsi de coude pectique. Le RG I est porteur d'un nombre variable de chaînes latérales attachées sur le C4 du rhamnose. On estime qu'environ la moitié des résidus rhamnose sont ramifiés de cette manière. Ces chaînes latérales sont composées principalement d'arabinose et de galactose. La présence d'acides galacturoniques n'en est pas exclue. Ces chaînes sont parfois assez grandes, elles peuvent comporter jusqu'à 12 oses neutres. En plus de ces longues chaînes, d'autres structures latérales plus petites ont aussi été trouvées sur le RG I. On peut se rendre compte de la diversité de ces chaînes latérales sur les rhamnogalacturonanes.

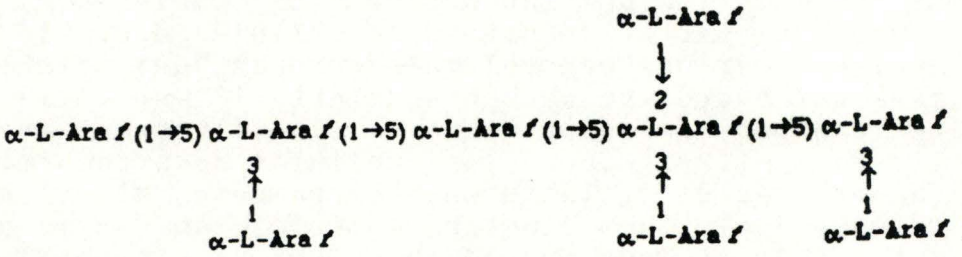



Fig 1.5 Structure des arabinanes (Saulnier,1987)

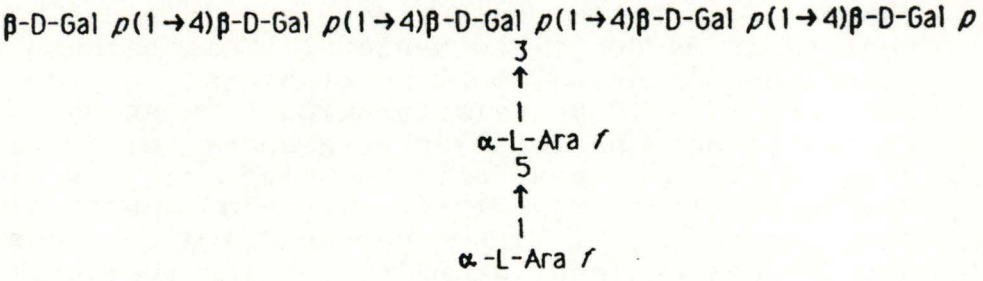



Fig 1.6 Structure possible de l'arabinogalactane I de soja (Saulnier,1987)

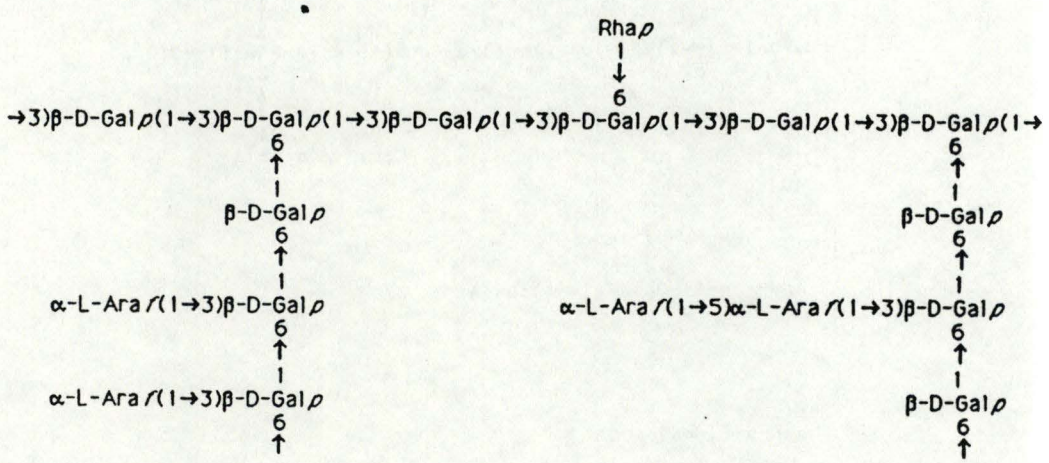



Fig 1.7 Arabinogalactnanes II de feuilles de tabac (Saulnier,1987)

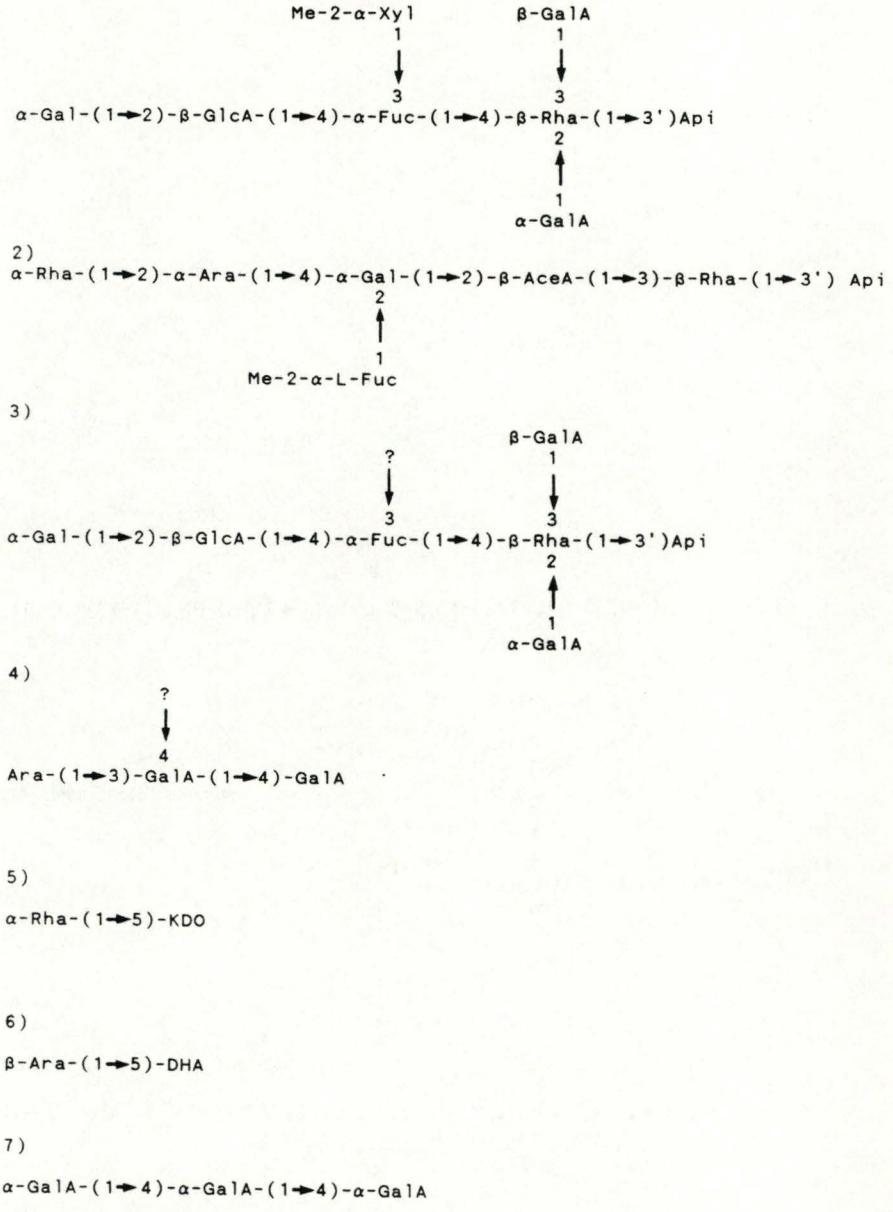



Fig 1.8 Rhamnogalacturonanes II
Structures d'oligosaccharides libérés du RGII
par hydrolyse acide partielle (Brett,1990)

Actuellement, on classe ces chaînes latérales en:

-Arabinanes : polysaccharides hautement ramifiés constitués d'un squelette d'$\alpha$-1,5- arabinose et de chaînes simples de résidus arabinoses liés en $\alpha$-1,2- ou $\alpha$-1,3- à la chaîne principale (Mc Neil et col,1984) (figure 1.5).

-Galactanes : polysaccharides formés de $\beta$-1,4- galactose avec peu ou pas de matériel polysaccharidique supplémentaire sur la molécule. Dans certains cas cependant, on peut trouver des galactoses liés en 1-6 (Mc Neil et col,1984).

-Arabinogalactanes I : Ces molécules sont constituées d'un squelette de $\beta$-1,4- galactose auquel sont attachées de courtes chaînes d'arabinose liés en $\beta$-1,5- (Cartier et col,1984) (figure 1.6).

-Arabinogalactanes II : montrent une plus grande diversité de structure,on y trouve en effet des chaînes importantes de $\beta$-1,3- galactoses attachés à d'autres chaînes $\beta$-1,6- galactoses. Sur ce squelette des arabinoses sont greffés. (Saulnier,1987) (figure 1.7).

La compréhension de la structure et de la distribution de ces chaînes latérales constitue un but important dans l'étude des RG I. On admet que l'organisation intramoléculaire des pectines est la suivante: des résidus de sucres neutres sont concentrés en blocs dans des zones rhamnogalacturonanes hautement substituées: ce sont des régions hérissées qui seraient attachées de manière covalente à des homogalacturonanes ou encore régions lisses (Massiot et Thibault,1988).

### 1.2.3.3 Les rhamnogalacturonanes II (RG II)

C'est un composant mineur de la paroi primaire des cellules en suspension.Relargué de la paroi par une endopolygalacturonase, il pourrait être attaché au RG I ou aux régions homopolygalacturonanes. Isolé, il présente un degré de polymérisation de l'ordre de 60 unités (Albersheim et col,1990). Sa structure est nettement plus complexe: en plus des acides galacturoniques, du rhamnose, du galactose et de l'arabinose, on y trouve des sucres plus rares comme l'apiose ou encore l'acide acérique et l'acide 3 déoxy-manno-octulosonique(KDO) (Albersheim et col,1990) (figure 1.8).

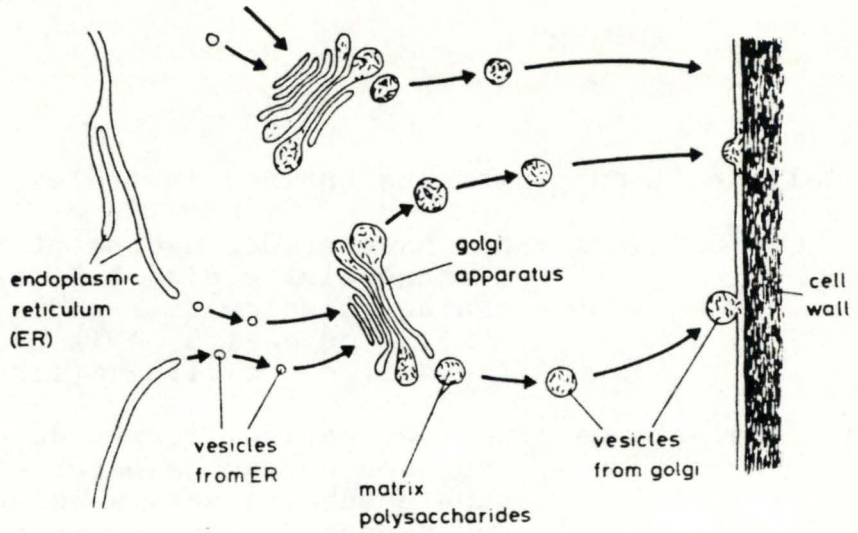



Fig 1.9 Parcours des polysaccharides depuis l'appareil de Golgi jusqu'à la paroi cellulaire (Brett,1990)

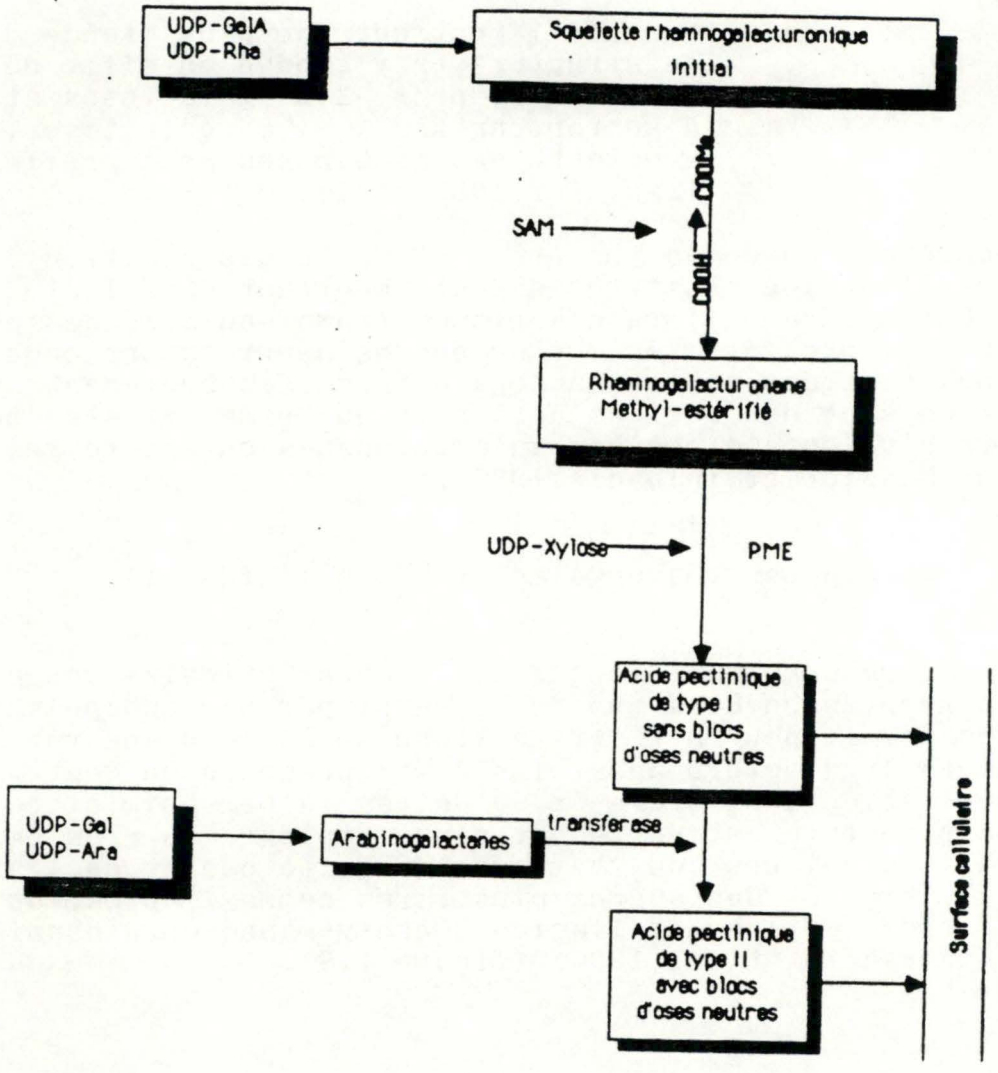



Fig 1.10 Voies de biosynthèse des substances pectiques (Saulnier,1987)

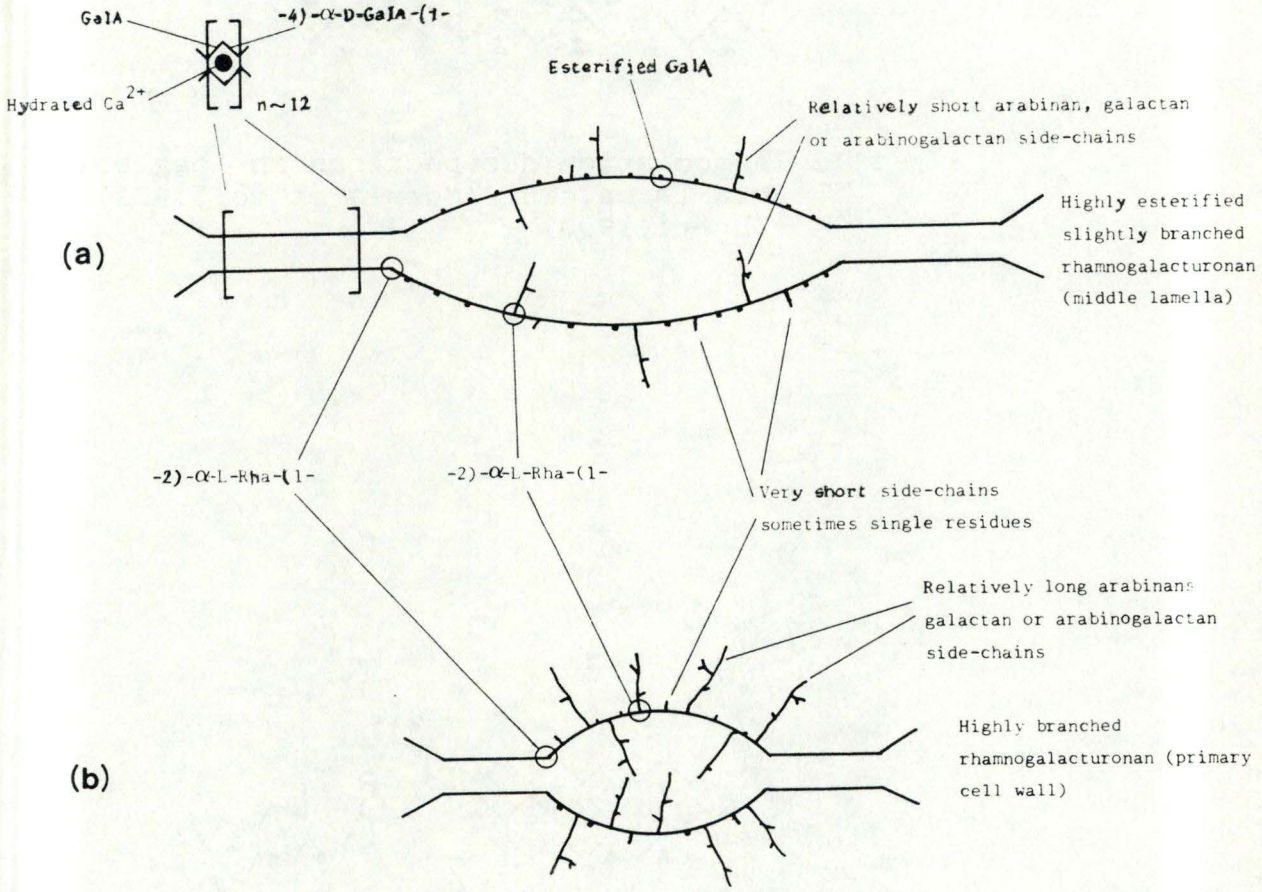



Fig 1.11 Représentation schématique des pectines
a) dans la lamelle mitoyenne
b) dans la paroi primaire
(Brett,1990)

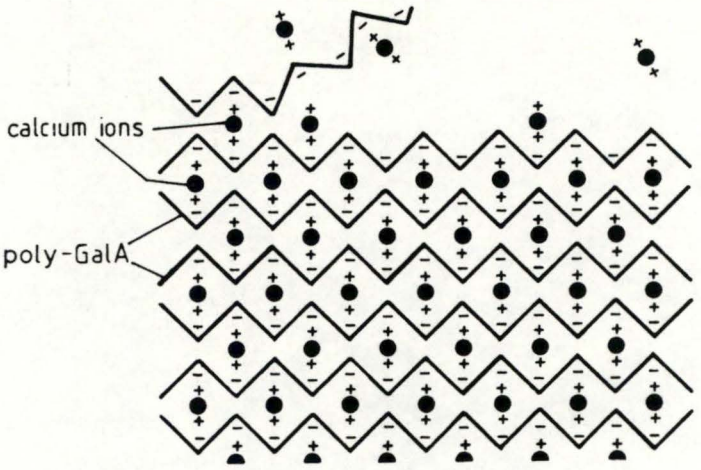



Fig 1.12 Association des pectines en "egg box" via le calcium (Morris et col,1982) (brett,1990)

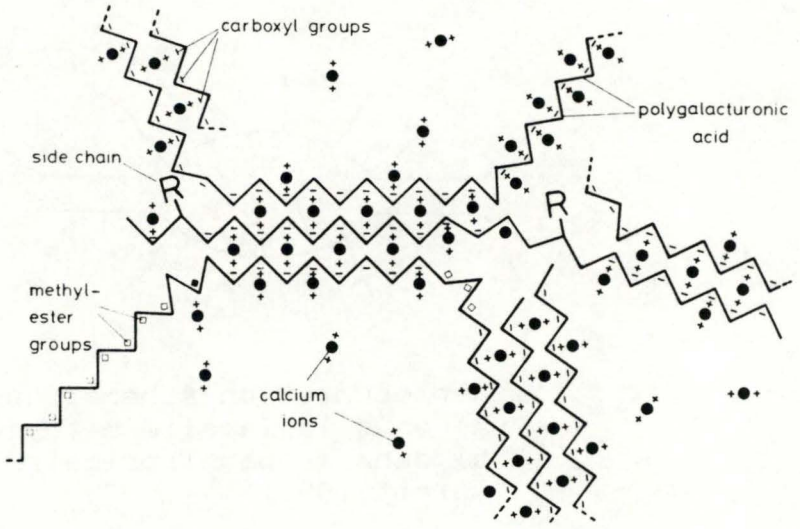



Fig 1.13 Association des molécules pectiques dans la paroi cellulaire (Brett,1990)

### 1.2.3.4 Biosynthèse des pectines

Les polysaccharides ne sont pas synthétisés dans la paroi. Ils le sont surtout ou entièrement dans un système d'endomembrane: l'appareil de golgi à partir duquel des vésicules apparaissent, transportant les nouveaux polymères formés jusqu'à la membrane plasmique.Les vésicules fusionnent alors avec cette dernière, déversant leur contenu dans la paroi (Brett,1990) (figure 1.9).

Les substances pectiques sont synthétisées uniquement pendant les périodes de division cellulaire et d'expansion de la cellule (Saulnier,1987) (figure 1.10).

### 1.2.3.5 Localisation des pectines (figure 1.11)

Les pectines sont présentes en grande quantité dans la paroi primaire, ce qui pourrait suggérer leur implication dans la croissance. Mais leur localisation ne se limite pas là on en trouve aussi dans la lamelle mitoyenne où elles remplissent un rôle de cohésion cellulaire (Fry,1988). Les pectines de la lamelle mitoyenne contenant des acides galacturoniques et du rhamnose pourraient être différentes des pectines de la paroi primaire.
Les premières ont

- moins de résidus rhamnoses,
- moins de ramifications latérales, elles sont d'ailleurs plus courtes.
- un degré de méthylestérification plus important que dans la paroi primaire (Brett et col, 1990).

### 1.2.3.6 Propriétés physico-chimiques des pectines.

En raison de leurs charges négatives, les acides galacturoniques peuvent fixer les cations. Les pectines se montrent sélectives vis-à-vis des cations: la sélectivité dépendra de la valence de l'ion considéré mais aussi de son degré d'hydratation. Le calcium assure le rôle de pont ionique entre les résidus chargés négativement. Les chaînes pectiques s'associent de manière coopérative en une structure appelée "egg box" (Mc Neil et col,1984 ) (figure 1.12).
En effet, la fixation du premier cation entre les charges de deux chaînes de pectine va provoquer un alignement des séquences qui facilitera l'association des autres ions Ca++ (Vreeland et col,1989).

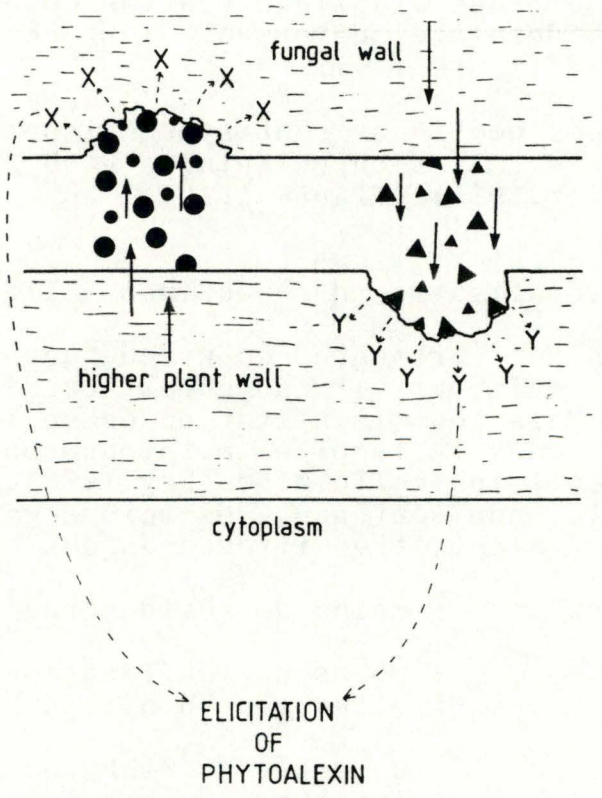



Fig 1.14 Synthèse de phytoalexines sous l'action d'éliciteurs endogènes et exogènes. Les ● représentent les enzymes synthétisés par la plante et les ▲ représentent les enzymes synthétisés par le pathogène. (Brett,1990)

De telles régions continues d'acides galacturoniques se présentent dans les homogalacturonanes et dans le RG I, les liens calciques sont interrompus dans un cas par les groupes méthyl esters et dans l'autre par le rhamnose (Brett,1990) (figure 1.13).

L'aptitude à gélifier est sans doute la propriété la plus remarquable des substances pectiques acides. Cependant la formation d'un gel calcique rigide serait incompatible avec la croissance de la cellule. On sait que lors de l'expansion cellulaire, il y a acidification de la paroi qui déplacerait une partie des ions calcium. Cette acidification est concomittante à la production de pectine méthyl-estérifiée. Cette dernière ne serait pas capable de former un gel rigide mais au contraire serait apte à donner un gel acide beaucoup moins ferme permettant la croissance (Mc Neil,1978).

### 1.2.3.7 Propriétés biologiques des pectines

Les plantes supérieures synthétisent, en cas d'agression ou de stress, des toxines non spécifiques : les phytoalexines.

Cette synthèse est déclenchée par l'action d'éliciteurs:
- éliciteurs exogènes produits par le pathogène
- éliciteurs endogènes produits par la plante (figure 1.14)
- éliciteurs tels les U.V., les métaux lourds...

Une variété de composés sont classés comme éliciteurs, y compris des oligosaccharides:

-les polysaccharides pectiques peuvent éliciter une réponse de défense. Des oligosaccharides formés de résidus $\alpha$-1,4-d'acides galacturoniques sont à l'origine de l'accumulation de phytoalexines chez différentes espèces dont le soja et le pois (Albersheim et col, 1990). Les oligogalacturonanes provoquant une accumulation maximale de phytoalexines ont une taille de 10 à 14 résidus. Certains de ces composés actifs ont été purifiés. Ils n'agissent pas seulement comme agents éliciteurs par eux-mêmes, mais montrent une action synergique lorsqu'ils sont présents avec d'autres éliciteurs comme des oligoglucanes.

La production de phytoalexines n'est pas le seul mécanisme de défense induit par des fragments de la paroi, les oligogalacturonides activent par exemple la lignification chez les cellules de concombres (Brett,1990).

-un second moyen de défense est la réponse d'hypersensibilité, entraînant la mort des cellules infectées avec relarguage éventuel de toxines, qui est aussi induite par des séquences pectiques cytotoxiques.

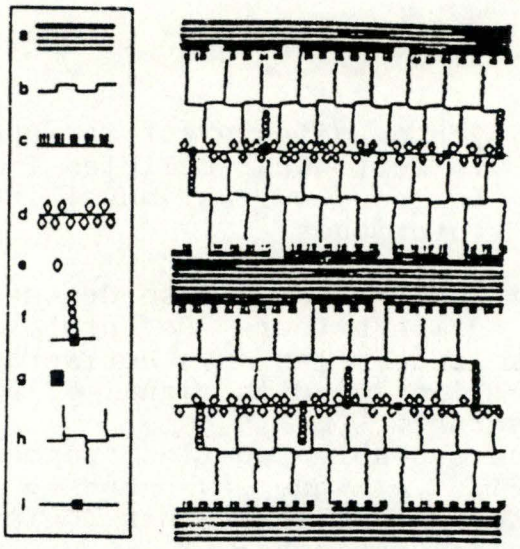
-Un autre mécanisme de défense des cellules végétales est la production d'inhibiteurs de protéinases pathogéniques. Les tissus endommagés synthétiseraient ces inhibiteurs en réponse à l'action d'un signal PIIF (Protéinase Inhibitor Inducing Factor).
Il est très probable que les fragments pectiques aient une activité PIIF et que les composés actifs, tout comme pour la synthèse de phytoalexines, soient de courtes chaînes d'acides galacturoniques $\alpha$-1,4- .

Les oligosaccharides pectiques jouent un rôle important en cas d'agression, mais ils interviennent aussi dans les processus de régulation du taux de croissance et de différenciation des tissus.

-des fragments pectiques sont capables d'inhiber la floraison chez Lemna gibba. Pour étudier ce type d'action des oligosaccharines (oligosaccharides régulateurs), Kiem Tran Thanh Van et ses collègues du laboratoire du Phytotron à Gif-sur-Yvette ont mis au point un bioessai de plant de tabac qui consiste à tester l'effet de différents facteurs sur des couches cellulaires minces excisées dans des ramifications florales de tabac. Ces explants de pédoncules floraux sont placés dans des milieux de culture liquides contenant des sels et du glucose comme source d'énergie. Les fragments pectiques se sont révélés être des inhibiteurs effectifs de la formation de racines dans ce bioessai. Ils pouvaient d'autre part y induire la formation de fleurs (Albersheim, 1990). Il est aujourd'hui clair que les oligogalacturonides de tailles déterminées sont des régulateurs extrêmement importants de la croissance et la différenciation des végétaux. On ne connaît pas encore leur processus d'action mais une hypothèse a été émise quant à l'existence de protéines réceptrices percevant et transmettant un signal, qui se traduirait par une augmentation de l'activité en calcium cytoplasmique qui à son tour déclencherait la phosphorylation de protéines régulatrices (Albersheim,1990).

1.2.3.8 Intérêt général pour les pectines

Outre leur rôle de cohésion des tissus végétaux et de maintien des structures comme la paroi primaire, l'intérêt des pectines dépasse largement le cadre de la physiologie végétale. Dans l'industrie alimentaire,on les utilise comme agents gélifiants Dans le domaine pharmaceutique, elles s'emploient afin de maintenir la viscosité de certains sirops, ou encore afin de de soigner des intoxications par les métaux lourds...



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 résidus sérine
g: résidus sérine des protéines de paroi
h: polyosides pectiques: squelette pectique + chaînes latérales (arabinanes et arabinogalactanes de type I)
i: résidus sérine non substitués

Fig 1.15 Organisation des polyosides de la paroi primaire d'après Keegstra et col (1973) (Saulnier,1987)

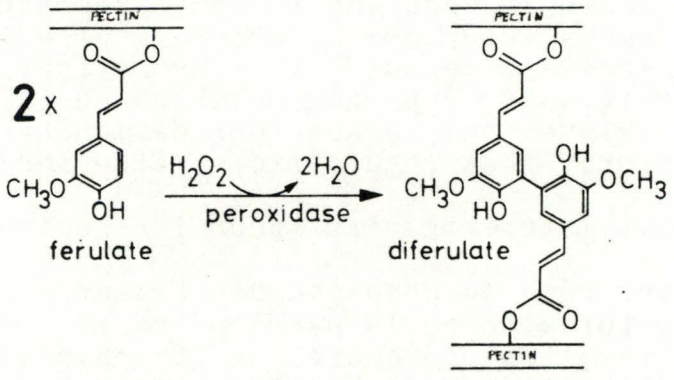



Fig 1.16 Formation de liens diféruliques entre les pectines (Brett,1990)

## 1.3 ORGANISATION GENERALE DES POLYMERES PARIETAUX

Les différentes relations existant entre les polymères de la paroi sont très complexes. Un modèle d'organisation a été proposé par l'équipe d'Albersheim (Keegstra et col,1973). Dans ce modèle, les fibres de cellulose seraient enrobées par des xyloglucanes par l'intermédiaire de ponts hydrogènes. Les xyloglucanes seraient reliées au squelette rhamnogalacturonique par des liaisons covalentes avec les chaînes latérales (Saulnier 1987) (figure 1.15).
Les rhamnogalacturonanes peuvent être reliés aux protéines de la paroi par pontage covalent (Fry,1988). Cependant, ce modèle de base a été critiqué: certaines liaisons covalentes proposées n'ont jamais été clairement établies, comme les liaisons entre les polyosides et les protéines. De plus, d'autres interactions ont été mises en évidence:

- interactions ioniques entre l'extensine (glycoprotéine de la paroi riche en hydroxyproline) possédant des groupes chargés positivement et les galacturonanes chargés négativement,

- interactions ioniques entre les chaînes d'acides galacturoniques via le Ca++, et avec les polyamines,

- des ponts hydrogènes existent entre les hémicelluloses de la matrice (Brett,1990),

- d'autres constituants que les polyosides peuvent participer à la structure: des acides diféruliques forment des liens covalents avec les pectines. Les acides féruliques sont estérifiés aux arabinoses ou aux galactoses des pectines, et deux unités d'acides féruliques peuvent être liées par l'action d'une peroxydase pour former un lien diphényl (figure 1.16).

Actuellement, on ne possède pas encore de modèle tenant compte de tous les composants et de leurs interactions. Il est peut être plus correct de visualiser la paroi comme un ensemble de réseaux qui, superposés, interagissent pour aboutir à une structure complexe (Brett,1990).

## 1.4 ETUDE DES POLYSACCHARIDES PARIETAUX

L'étude biochimique des polysaccharides s'avère particulièrement difficile. Leur chimie est délicate, ils présentent des propriétés de charge, des liaisons peu connues. Leur analyse nécessite des quantités relativement importantes de sucres purifiés et homogènes, ce qui implique le recours à des techniques physico-chimiques sophistiquées comme la GC-MS ou la RMN.

### 1.4.1 Les sources de polysaccharides

Les polysaccharides peuvent être isolés à partir de tissus végétaux subissant d'abord une dégradation mécanique et ensuite une extraction avec de l'eau, des sels, des solvants organiques ou encore la combinaison de ces différents agents (Weissbach,1986). Un des problèmes associés à l'obtention de paroi cellulaire à partir de tissus végétaux est le manque d'homogénéité des préparations obtenues. Les parois peuvent être contaminées par des composants cytoplasmiques qui restent attachés ou qui sédimentent avec la paroi (les grains d'amidons par exemple contaminent les préparations ) (Mc Neil et col,1978).
De plus, les manipulations expérimentales sont souvent longues et entraînent des pertes de rendement non négligeables.

Une deuxième source de polysaccharides sont les milieux de culture de cellules en suspension.

Leurs avantages se situent à plusieurs niveaux:

- ils sont représentatifs des polysaccharides trouvés dans les tissus intacts de la plante,

- leur obtention est rapide et facilement reproductible.

Les cultures de cellules sont réalisées à partir de cals (amas de cellules désorganisées en culture in vitro) mis en culture en milieu liquide.

Le surnageant contenant des polysaccharides extracellulaires est traité par une série de centrifugations et filtrations, concentré et dialysé et ainsi prêt pour les séparations et les déterminations analytiques.

### 1.4.2 Les outils biologiques pour l'étude des sucres

Une famille de protéines, les lectines, est d'une utilité considérable dans l'analyse des sucres complexes. Ces protéines sont surtout isolées à partir de graines. Elles reconnaissent de de façon précise certaines structures saccharidiques présentes à la surface cellulaire (Muratmatsu,1989).

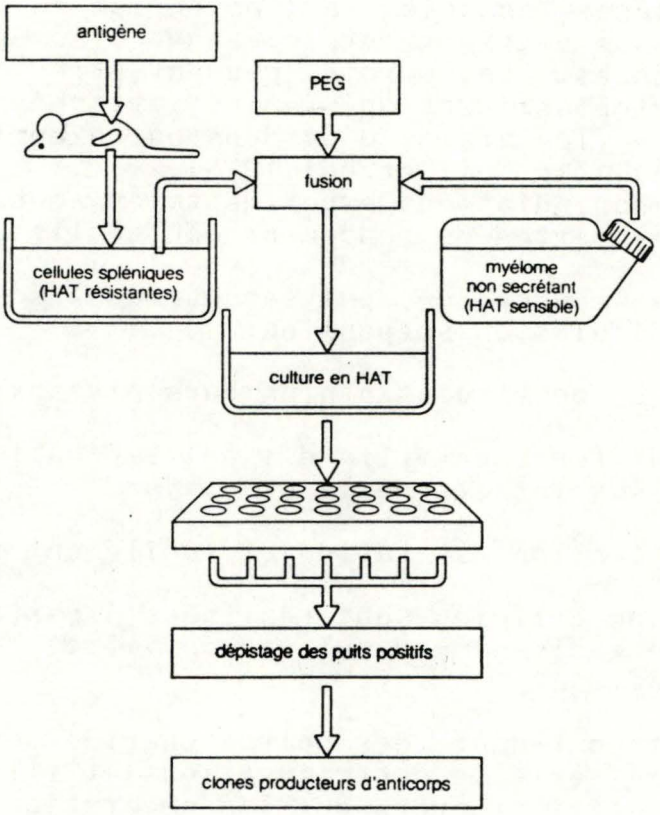



Fig 1.17 Production d'anticorps monoclonaux
(Roitt et col,1985)

Les lectines peuvent être marquées (fluorochrome, or colloïdal..) et servent ainsi pour des localisations histochimiques particulières dans la paroi.

Un deuxième outil disponible sont les enzymes glycosidases qui coupent de manière spécifique les liaisons covalentes des polysaccharides. Ces enzymes permettent une identification assez fine de la structure interne des polysaccharides (McNeil et col,1978).

Un troisième outil à la disposition des biologistes sont les anticorps pouvant reconnaître de manière précise un épitope de la paroi.De part leur spécificité et leur sensibilité, ces outils immunologiques s'avèrent infiniment précieux dans l'analyse pariétale.

#### 1.4.2.1 Les anticorps polyclonaux et monoclonaux

Quand un animal reçoit un immunogène par injection, il y répond en synthétisant une série d'anticorps dirigés contre les différentes molécules de la substance étrangère et contre les différents déterminants d'un même antigène. Comme il est pratiquement impossible de séparer les nombreux anticorps différents générés par l'animal,les antisérums conventionnels contiennent un mélange d'anticorps. Chaque lymphocyte ne peut fabriquer qu'un seul type d'immunoglobuline déterminé.
Une lignée cellulaire développée à partir d'un seul lymphocyte synthétisera le seul et même anticorps monoclonal.
Un lymphocyte est toutefois mortel,il ne perdure pas longtemps en culture cellulaire. Par contre, les cellules d'un myélôme prolifèrent rapidement et sont immortelles. Les anticorps monoclonaux sont le produit d'une hybridation de cellules de myélome de souris avec les lymphocytes issus de la rate d'une souris immunisée avec l'antigène étudié. La cellule née de cette fusion est appelée hybridome et possède les deux caractéristiques des parents:

- l'immortalité du myélôme,

- la production d'anticorps du lymphocyte (Naulaers,1990).

A ce stade, les techniques classiques de cultures cellulaires sont d'application afin de maintenir les clones. On peut également injecter l'hybridome dans la cavité péritonéale d'une souris qui devient une véritable usine de production d'anticorps (figure 1.17).

L'avantage déterminant de ces anticorps monoclonaux est leur haute spécifité: ils ne reconnaissent qu'un seul épitope au sein d'une série d'antigènes, ce qui en fait des outils importants dans le diagnostic de nombreuses maladies humaines, animales et végétales, et dans les applications agro-alimentaires (détection des contaminations de types mycotoxines, pesticides, résidus d'antibiotiques...).

Un avantage majeur de la technique monoclonale réside dans le fait que des anticorps peuvent être obtenus contre des molécules ne constituant qu'un composant mineur d'un mélange complexe. On peut donc, en principe, produire des anticorps monoclonaux contre n'importe quelle protéine, sucre ou autres constituants de la cellule. Malgré un bilan général très positif, leur fabrication reste toutefois onéreuse et difficile, et comprend quelques étapes cruciales:

- l'immunisation de l'animal: cette opération dépend de la forme, de la quantité, du type d'injection (intraveineuse ,intrapéritonéale ,intradermique..), de l'adjuvant utilisé, de l'animal choisi,

- la fusion cellulaire dont le pourcentage de réussite reste malgré tout assez faible (Naulaers,1990),

- le criblage des hybridomes obtenus, particulièrement difficile lorsque les déterminants antigéniques sont de type polysaccharidique.

Ces inconvénients sont, toutefois, compensés par les multiples avantages cités plus haut.

### 1.4.2.2 Utilisation d'anticorps monoclonaux

Dans le cas qui nous intéresse,ils servent à localiser un antigène dans son environnement tissulaire ou membranaire, et ce par des méthodes cytologiques.

Pour ce faire, les anticorps sont marqués :

-soit par un colorant fluorescent (fluorochrome) dont l'observation se fera par microscopie optique par exemple. Pour détecter un antigène sur une coupe tissulaire ou cellulaire , on procède par immunofluorescence directe ou indirecte.

Lorsqu'on veut détecter un antigène présent sur des protoplastes en suspension, on peut utiliser la cytofluorimétrie en flux qui renseigne quantitativement sur la présence de sous-populations de cellule en fonction de deux paramètres de fluorescence, de leur taille relative et de leur granulosité.

-soit par une substance opaque dense aux électrons (particules d'or colloïdal) qui sera révélée en microscopie électronique.

-soit par une enzyme qui réagira avec son substrat. L'enzyme la plus souvent utilisée à cette fin est la peroxydase H2O2 en présence d'ABTS, qui donne un complexe vert lors des tests ELISA (Thomas,1988).

#### 1.4.2.3 Anticorps monoclonaux et étude de la paroi

Au laboratoire, nous disposons d'un anticorps anti-pectine acide (Liners,1988) qui est spécifique d'une conformation tridimensionnelle de la pectine induite par la présence de calcium. Nous disposons également d'un anticorps monoclonal dirigé contre une hémicellulose (Messian,1989).

La littérature ne mentionne que très peu de monoclonaux dans ce domaine :
A Berkeley, une équipe de chercheurs a produit des anticorps monoclonaux contre différents antigènes de la paroi cellulaire d'une algue brune, Fucus distichus. Ces anticorps n'ont toutefois pas été caractérisés (Vreeland et col,1984).

Plus récemment, deux anticorps reconnaissant l'un la pectine méthyl-estérifiée, l'autre la pectine peu estérifiée ont été utilisés par une équipe anglaise afin de localiser ces épitopes in situ (Knox et col,1990).

Ces anticorps ont servi de sondes moléculaires pour localiser les polymères pariétaux par immunofluorescence et par marquage en microscopie électronique.

## 1.5 BUT DU TRAVAIL

L'objectif principal du mémoire était de produire un anticorps monoclonal contre un épitope contenant du rhamnose: ose neutre constitutif de la pectine et porteur de chaînes latérales de sucres neutres, afin de réaliser ultérieurement des marquages électroniques de la pectine in situ.

Cette démarche s'inscrit dans le cadre de l'étude de la paroi au niveau ultrastructural.
Actuellement, le schéma de base de la paroi primaire semble connu mais de nombreux détails manquent encore. C'est pourquoi, afin d'en savoir plus quant à la biosynthèse, la localisation et l'architecture des pectines dans la paroi, nous avons tenté la production d'anticorps monoclonaux contre un épitope pectique contenant du rhamnose au moins.

- Ces anticorps fourniraient un outil de marquage immunocytochimique complémentaire au 2F4 (Liners et col, 1990). Ils seraient particulièrement utiles afin de localiser, et de quantifier le rhamnose par rapport aux séquences homopolygalacturoniques,

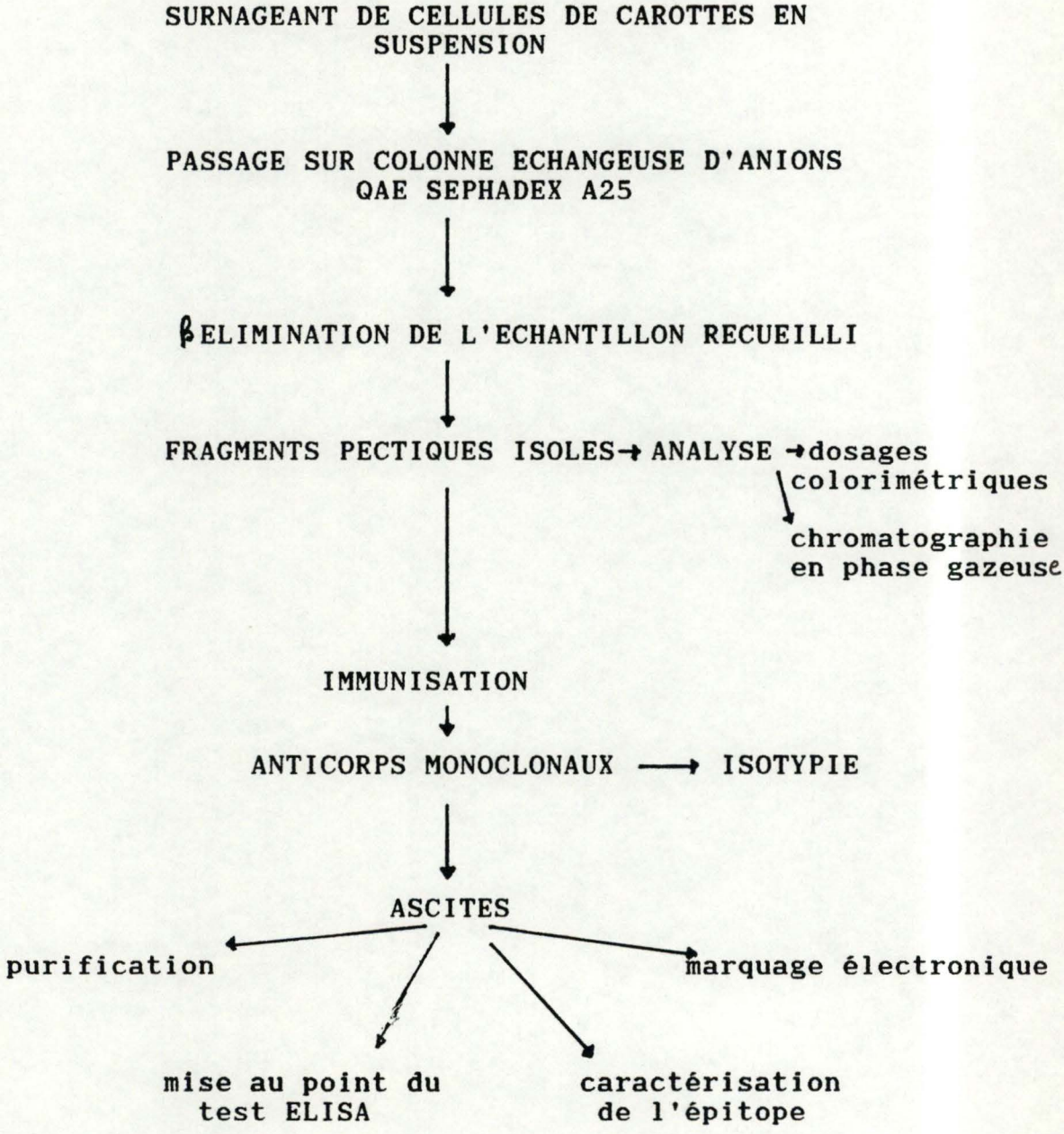
- ils permettraient l'étude de la cinétique de dépôt de polysaccharides pectiques autres que l'homopolygalacturonate lors de la croissance cellulaire,

- on envisage leur utilisation dans l'étude des comportements des pectines lors des interactions hôtes-pathogènes

- enfin, ils pourraient être utilisés pour la séparation de motifs pectiques de type RG I ou RG II par chromatographie d'affinité.

---

## DEMARCHE SUIVIE



# 2 MATERIELS ET METHODES

AVANT PROPOS :

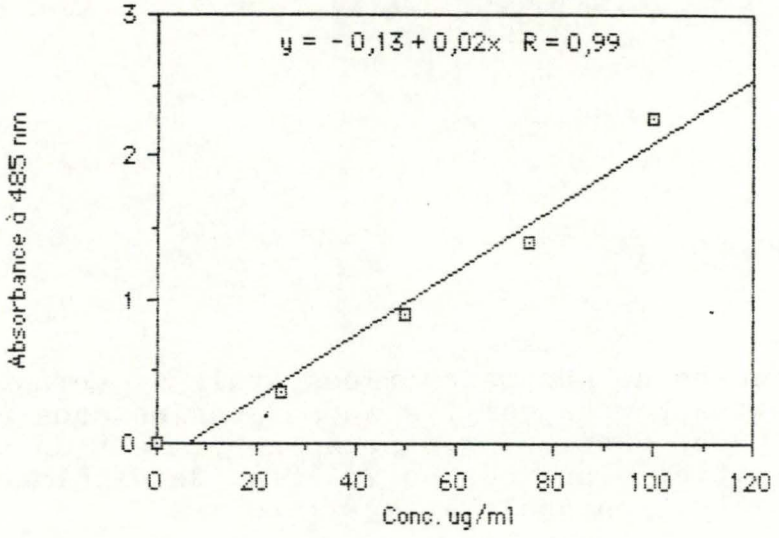
Notre source de polysaccharides était le surnageant de cellules de carottes Daucus carotta en suspension dans un milieu de sels Murashige et Skoog contenant un supplément de sucrose à raison de 30g/litre, ainsi que du 2,4-D(acide dichlorophénoxyacétique) en concentration égale à 1mg/litre.

## 2.1 PURIFICATION DU SURNAGEANT

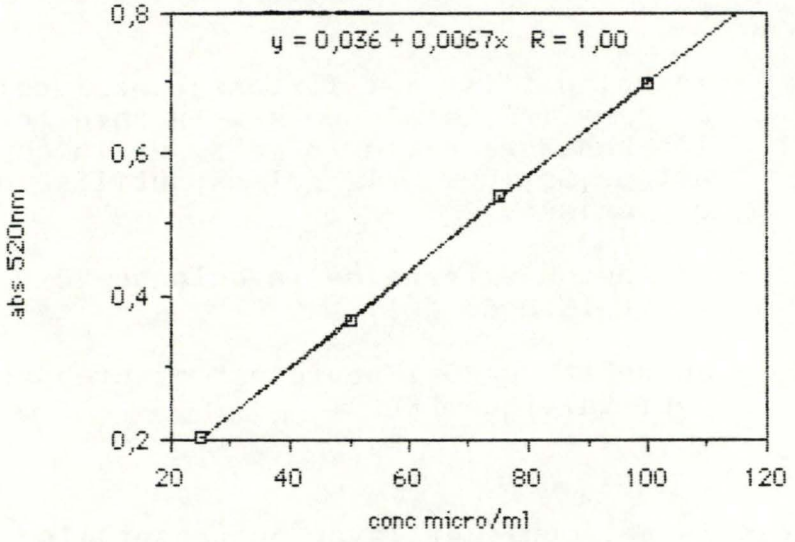
Le surnageant a d'abord été concentré et dialysé au moyen d'un concentrateur AMICON à fibres creuses.Ensuite, pour la purification proprement dite, nous avons utilisé une colonne échangeuse d'anions QAE A25 dont les caractéristiques sont les suivantes :

- le gel utilisé est fortement basique: Sephadex QAE A25; la capacité totale du gel (nombre total de charges de l'échangeur) est de 3 méq/g et la capacité accessible est de 5g/100ml, le gel est utilisé dans de l'eau désionisée,
- dimension externe de la colonne 20x0.75cm (soit 18cm de gel),
- un débit de 25ml/heure est assuré par une pompe péristaltique LKB.

Une fois le gel coulé et lavé, un échantillon de 50ml y est déposé. Les polysaccharides non fixés quittent le gel lors d'un deuxième lavage et l'élution se fait via un gradient d'acétate de sodium CH3COONa allant d'une concentration nulle à 0.8 molaire. Des fractions de 3ml sont récoltées et analysées par différents dosages (Perpete,1990).




**Droite étalon du dosage des oses neutres par la méthode de Dubois.**




**Droite étalon du dosage des acides uroniques par la méthode au MHBP.**

## 2.2 ANALYSE DES POLYSACCHARIDES

Les dosages colorimétriques sont réalisés afin de détecter et de quantifier la présence de polysaccharides dans les fractions éluées.

### 2.2.1 Dosage qualitatif à l'orcinol sulfurique

But du dosage : suivre globalement le profil chromatographique

Principe : sous l'action de l'orcinol à 0.1% dans de l'acide sulfurique à 70%, les polyosides sont hydrolysés en oses neutres et en acides uroniques qui réagissent tous deux avec l'orcinol sulfurique. Les fractions positives apparaissent en brun-jaune.

Mode opératoire : 3 µL de solution sont déposés sur une plaque de silice en couche mince. On laisse sècher.
On vaporise sous hotte à l'orcinol sulfurique.On place ensuite la plaque à 100°C pendant 15 minutes pour permettre la réaction et la révélation.

### 2.2.2 Dosage quantitatif des oses neutres (méthode de Dubois)

Principe : le phénol en présence d'acide sulfurique concentré est utilisé pour la microdétermination quantitative de polysaccharides. La réaction mise en jeu est sensible et donne un complexe de couleur brun-orange lu à 480nm.

Mode opératoire : à 400 µL de solution, on ajoute successivement 10 µL de phénol à 80% fraîchement préparé,ainsi qu'1ml d'$H_2SO_4$ concentré. On laisse reposer les tubes pendant 10 minutes, on les agite afin d'assurer un contenu homogène. On les place dans un bain à 25-30°C pendant 15 minutes avant de lire l'absorbance à 480nm (Dubois,1956).

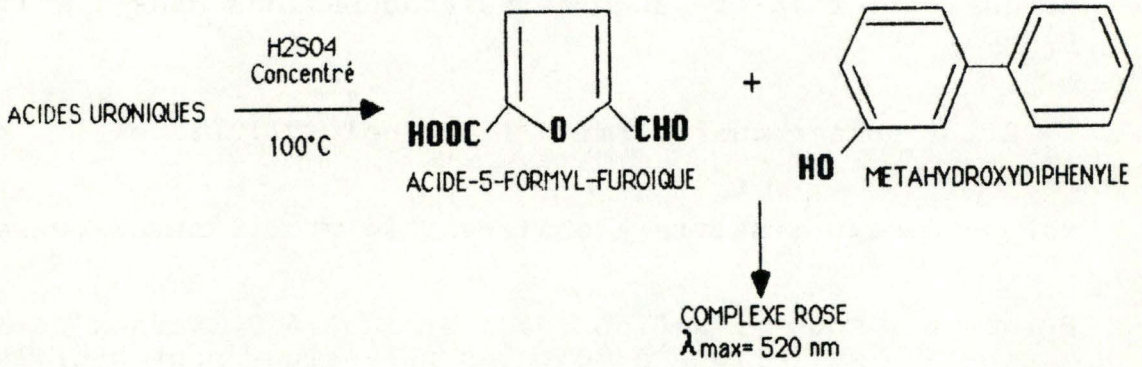



Fig 2.1 Principe du dosage des acides uroniques (Saulnier,1987)

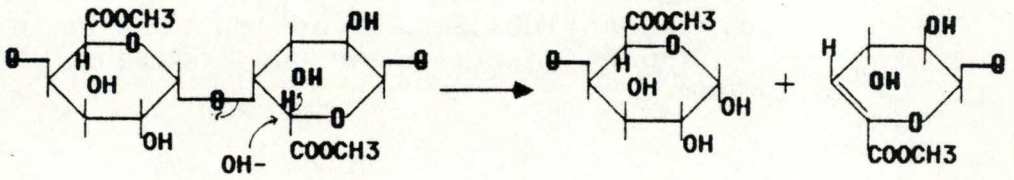



Fig 2.2 Réaction de β élimination en milieu basique (Saulnier, 1987)

2.2.3 Dosage quantitatif des acides uroniques

(MHBP: 3-phényl phénol 90% à 0.15% dans du NaOH 0.05%)

Principe : les monomères d'acide libérés par l'action de l'H2SO4 forment avec le métahydroxybiphényle un complexe de couleur rose présentant un maximum d'absorption à 520nm. Cette méthode est simple, rapide, sensible et hautement spécifique car elle est dépourvue d'interférence de la part des oses neutres, (Blumenkrantz et col,1973) (figure 2.1).

Mode opératoire : on prélève 200µL de solution auxquels on ajoute 1 ml d'H2SO4 dans de la glace. Après avoir mélangé, les tubes sont placés 5 minutes dans un bain à 100°C. Lorsqu'ils sont refroidi, on ajoute 20µL de MHBP. On agite le tout et on place les tubes à l'obscurité pendant 15 minutes, après quoi la lecture d'absorbance peut se faire.

2.2.4 Obtention de fragments pectiques

Ces derniers peuvent s'obtenir d'une part par digestion enzymatique, et d'autre part par ß-élimination. Cette seconde méthode a été appliquée.

Principe : elle consiste en une dégradation chimique du squelette d'acides galacturoniques ne laissant intactes que les chaînes latérales. Pour pouvoir être ß éliminées, les unités d'acides galacturoniques doivent être estérifiées.

Mode opératoire : on utilise du tampon Na2HPO4 0,1molaire pH:5.6 l'échantillon est amené à un volume de 50ml.
On chauffe 2 heures à 85°C. On dialyse ensuite contre de l'eau déminéralisée et on concentre au rotavapor (figure 2.2).

### 2.2.5 Analyse au chromatographe en phase gazeuse

L'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse est de pouvoir quantifier chacun des sucres constitutifs d'un polysaccharide. Nous avons utilisé la méthode des dérivés triméthylsilyls. La méthode des dérivés est basée sur le principe général de volatilisation de la structure d'un ou de composés afin de les entraîner dans une phase gazeuse qui migre dans une colonne chromatographique. Ce procédé améliore leur détection et augmente l'efficacité de leur séparation. Les propriétés des agents de dérivatisation se résument comme suit:

Ils permettent:

- une réaction sélective avec des groupes fonctionnels bien définis,
- une réponse du détecteur à des basses concentrations en dérivés,
- une bonne cinétique de réaction,
- des produits de réaction stables,
- des conditions de réaction douces.

Le dérivé de sylilation que nous avons utilisé était le Deriva Sil, c'est un mélange de réactifs:

- le BSTFA (bis tryméthylsilyl trifluoracétamide) très réactif et entraînant une moindre contamination ainsi que des bruits de fond plus faibles,
- le TMCS (triméthylchlorosilane),
- le TSIM (triméthylsylilimidazole), agent puissant et sélectif réagissant de préférence avec les groupes hydroxyles, des sucres par exemple.

Les avantages de cette technique sont :

-la possibilité de transformer les hydrates de carbone,

- la simplicité de l'utilisation

- les dérivés se forment rapidement et les échantillons sont habituellement prêts pour l'injection en quelques minutes.

Mode opératoire : les polyosides sont hydrolysés par de l'acide trifluoroacétique TFA 3N pendant 3 heures à 120°C libérant ainsi les monomères constitutifs. Le TFA est éliminé par trois évaporation successives avec respectivement 1ml-1ml-0,5ml d'éthanol. On ajoute ensuite 100µL d'une solution d'inositol qui servira d'étalon interne. On évapore à nouveau à sec. Les échantillons sont ensuite dérivatisés en ajoutant 100µL de Dériva Sil. On chauffe 20 minutes à 40°C. Cette étape réalisée, l'échantillon est prêt pour l'injection. On inclut dans les échantillons des standards adéquats afin de pouvoir reconnaître et quantifier les résultats expérimentaux.

## 2.3 IMMUNISATION DE L'ANIMAL

Le polysaccharide pectique isolé est couplé à l'albumine sérique bovine méthylée, qui réagit avec les groupements carboxyliques des acides uroniques qui bordent le rhamnose porteur de chaînes latérales d'oses neutres.Des fractions de notre antigène pectique à une concentration de 0,2mg/ml sont couplées à 0,2mg de BSA méthylée (bovine serum albumine).
Le complexe immunogène est ensuite émulsifié avec 1ml d'adjuvant de Freund incomplet. Environ 500µL sont injectés intrapéritonéalement à un lot de trois souris syngéniques. Des rappels sont effectués 1, 2, et 9 semaines après la première injection (Tyssen,1985).

## 2.4 PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Une à deux semaines après le dernier rappel, la fusion est possible. A ce stade, la réponse immunitaire est en effet satisfaisante.

### 2.4.1 Matériel cellulaire .

Deux composants cellulaires majeurs sont requis, à savoir : d'abord le myélome provenant de la lignée SP2/OAg 14. Il a pour caractéristiques d'être non producteur d'immunoglobulines et d'être déficient pour une enzyme : la phosphoribosyl hypoxanthine guanine transférase (HGPRT) ou encore pour une autre enzyme: la thymidine kinase (TK). Ces cellules sont régulièrement sélectionnées sur un milieu contenant soit du 6 thioguanine, soit du 8 azaguanine. Le principe est le suivant :
les cellules possédant l'enzyme HGPRT incorporent ces bases léthales dans leur DNA et meurent parce que ces analogues interfèrent avec le processus de transcription. Les cellules déficientes HGPRT- quant à elles, n'incorporent pas ces bases et survivent. Le deuxième composant cellulaire sont les lymphocytes spléniques. La rate de l'animal est prélevée stérilement et les cellules en sont extraites. En moyenne, une rate de souris donne 100 millions de cellules dont environ 50% sont des lymphocytes. Le taux de succès de l'opération peut être augmentée par l'inclusion de cellules nourricières comme les cellules intrapéritonéales par exemple qui peuvent avoir un effet bénéfique sur la survie des cellules hybrides tôt après la fusion (Tyssen,1985).

### 2.4.2 Protocole de fusion et sélection des hybridomes

La fusion cellulaire se fait en utilisant comme agent de fusion soit le virus SV40, soit le polyéthylène glycol. Pour la fusion des cellules murines, ce dernier se révèle être plus efficace. Le PEG est préparé comme suit: visqueux, il est d'abord fondu, stérilisé par autoclave et refroidi à 50°C. Il est ensuite combiné avec un volume égal de PBS à pH:7. La concentration optimale de PEG pour la fusion se situe dans la gamme de 30 à 50% . L'efficacité de la fusion est plus grande lorsque la viabilité de la lignée du myélome est élevée (au moins à 90%) et lorsque les cellules connaissent une croissance exponentielle. La fusion terminée, il faut éliminer nombreuses cellules non hybrides. Cette étape se fait par passage sur milieu sélectif HAT (hypoxanthine, aminoptérine et thymidine).

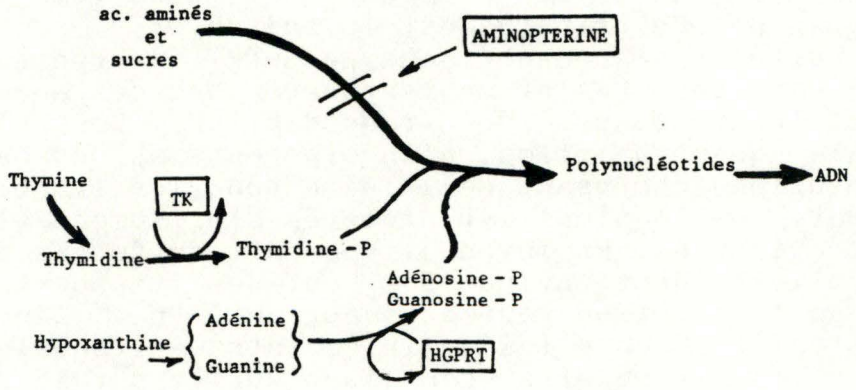



Fig 2.3 Voie principale et voies accessoires de synthèse de l'ADN (Depelchin,1987)

En voici le procédé :(figure 2.3)

L'aminoptérine est une toxine puissante qui bloque les voies métaboliques normales de synthèse de nucléotides. Cette voie peut être court-cicuitée si les cellules sont capables d'utiliser les intermédiaires métaboliques avec lesquels elles sont nourries : hypoxanthine et thymidine. Les cellules du myélome sont incapables d'emprunter cette voie de sauvetage. Les lymphocytes possèdent les enzymes à la fois pour la voie normale et pour le shunt. En présence d'agents bloquants, ils peuvent donc produire leur précurseur d'acide nucléique. Cependant, ils ne résistent pas plus d'une à deux semaines en culture normale. Par la fusion, la cellule du myélome confère aux lymphocytes un élément inconnu permettant sa croissance in vitro, tandis que le lymphocyte lui fournit les enzymes pour le shunt assurant à la cellule hybride seule la possibilité de croître en milieu sélectif.

### 2.4.3 Le criblage

Une méthode sensible de criblage est une condition sine qua non pour la production efficace d'hybridomes. Les opérations de criblage et par la suite de clonage doivent s'effectuer dès que possible afin d'éviter la surcroissance des cellules non productrices.

#### 2.4.3.1 Criblage par test ELISA

Le test ELISA est prodigieusement efficace pour la détection d'antigènes et la caractérisation d'anticorps.
L'usage intensif de ce test est dû à ses nombreux avantages:

- ce test est extrêmement économe dans la consommation des réactifs (particulièrement intéressant pour l'antisérum),
- les manipulations sont relativement simples,
- la quantification est facile : lecture à 405nm,
- un grand nombre de déterminations et d'informations peuvent être obtenues dans des temps relativement courts.

Le protocole général, modifiable et adapté pour chaque anticorps monoclonal, est le suivant :

- une plaque de microdétermination à 96 puits est incubée avec de la poly-L-lysine à raison de 50µL par micropuits pendant 1h à température ambiante. La PLL peut dans certains cas favoriser l'immobilisation de l'antigène

- après avoir évacué la PLL excédentaire, la plaque est sensibilisée avec l'antigène. Dépôt: 50µL, on laisse incuber une nuit à 4°C

- on vide les puits et on les sature avec un excès de protéines étrangères, afin de prévenir toute fixation non-spécifique ultérieure. On dépose 200µL de gélatine à 200µg/mL. On laisse 2 heures à 37°C

- l'anticorps primaire spécifique de l'antigène est déposé (surnageant de clones). On incube 50µL de solution pendant 1 heure à 37°C

- un premier lavage est réalisé dans un tampon adéquat à l'aide d'un laveur NUNC

- l'anticorps primaire de souris sera détecté via un ligand : un anticorps secondaire de cheval anti-souris couplé à une enzyme : la peroxydase de raifort.
  On incube 50µL pendant 1 heure à 37°C

- un deuxième lavage est nécessaire pour éliminer toutes les protéines non fixées

- la révélation se fait par l'addition d'un chromogène ABTS-H2O2 préparé dans du tampon citrate:
  Na2HPO4-2H2O: 20g/litre
  Acide citrique: 8.9g/litre
  pH:5.7

  On utilise 5mg d'ABTS dans 6ml de tampon citrate auxquels on ajoute 20µL d'H2O2. La solution est préparée juste avant l'utilisation. On dépose 50µL de solution et on laisse incuber 15 minutes à 37°C

- l'absorbance des micropuits est mesurée par un lecteur ELISA Titertek à 405nm .

Le protocole général, modifiable et adapté pour chaque anticorps monoclonal, est le suivant :

- une plaque de microdétermination à 96 puits est incubée avec de la poly-L-lysine à raison de 50µL par micropuits pendant 1h à température ambiante. La PLL peut dans certains cas favoriser l'immobilisation de l'antigène

- après avoir évacué la PLL excédentaire, la plaque est sensibilisée avec l'antigène. Dépôt: 50µL, on laisse incuber une nuit à 4°C

- on vide les puits et on les sature avec un excès de protéines étrangères, afin de prévenir toute fixation non-spécifique ultérieure. On dépose 200µL de gélatine à 200µg/mL. On laisse 2 heures à 37°C

- l'anticorps primaire spécifique de l'antigène est déposé (surnageant de clones). On incube 50µL de solution pendant 1 heure à 37°C

- un premier lavage est réalisé dans un tampon adéquat à l'aide d'un laveur NUNC

- l'anticorps primaire de souris sera détecté via un ligand : un anticorps secondaire de cheval anti-souris couplé à une enzyme : la peroxydase de raifort.
  On incube 50µL pendant 1 heure à 37°C

- un deuxième lavage est nécessaire pour éliminer toutes les protéines non fixées

- la révélation se fait par l'addition d'un chromogène ABTS-H2O2 préparé dans du tampon citrate:
  Na2HPO4-2H2O: 20g/litre
  Acide citrique: 8.9g/litre
  pH:5.7

  On utilise 5mg d'ABTS dans 6ml de tampon citrate auxquels on ajoute 20µL d'H2O2. La solution est préparée juste avant l'utilisation. On dépose 50µL de solution et on laisse incuber 15 minutes à 37°C

- l'absorbance des micropuits est mesurée par un lecteur ELISA Titertek à 405nm .

Une variante du test ELISA direct est celui utilisé pour la la caractérisation isotypique d'anticorps. Le principe de ce test dit sandwich est de bloquer entre deux anticorps connus et spécifiques un échantillon à caractériser.

Les étapes sont les suivantes:

- dépôt du premier anticorps spécifique anti souris RAM (rabbit anti mouse), 50µL sont incubés une nuit à 4°C

- saturation afin de minimiser l'adsorption non spécifique 200µL de gélatine à 200µg/mL sont incubés 1heure à 37°C

- dépôt de l'échantillon à tester: 50µL sont incubés 1 heure à 37°C

- lavage en tampon PBS $Na_2HPO_4-2H_2O$ : 1.44g/litre

  $KH_2PO_4$ : 0.2g/litre

  KCl : 0.2g/litre

  NaCl : 8g/litre

  Tween 0.1% pH:7.4

- dépôt du second anticorps connu, dilué 100 fois, on utilise les anticorps suivants: anticorps anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b et anti-IgM. On incube 50µL pendant 1 heure à 37°C

- lavage en PBS pH:7.4

- dépôt de 50µL du complexe streptavidine-biotine-peroxydase dilué 1500 fois, on laisse incuber 30 minutes à 37°C

- lavage en PBS pH:7.4

- révélation par la solution ABTS $H_2O_2$ préparée dans le tampon citrate pH:5.7

- l'absorbance des micropuits est mesurée par un lecteur ELISA Titertek à 405nm

### 2.4.3.2 Criblage par Dot Blot

Un autre moyen de criblage des clones est le Dot Blot ou fixation de l'antigène sur une membrane de nitrocellulose Un avantage de cette technique est la faible quantité d'immunoréactants requise. Le procédé est semblable au test ELISA. La révélation immunoenzymatique du complexe anticorps -antigène donne un coloré insoluble qui précipite et est visible sur fonds blanc (résultat qualitatif).

On procède comme suit:

- dépôser 4µL de la solution antigénique et laisser pénétrer l'échantillon jusqu'à disparition du dépôt
- saturer avec du sérum de cheval à 10% pendant 2h à 37°C
- incuber l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante
- laver sous agitation dans un tampon approprié contenant 0.1% de Tween
- incuber l'anticorps secondaire, Ig de cheval anti-souris couplé à la peroxydase, pendant 1h à 37°C
- effectuer trois lavages de 10 minutes sous agitation dans un tampon approprié
- révéler par du Tris 50mN pH: 7.5
  H2O2: 0.03%
  DAB :0.05%
- arrêter la réaction par du HCl 0.1N

Il existe différents Dot blot.Le principe de base reste le même, mais les supports utilisés varient :

-sur bandelettes de nitrocellulose

-sur une feuille de nitrocellulose placée dans un dispositif Bio rad ...

### 2.4.4 Le clonage

Lorsque des puits de microplaques de culture contiennent un anticorps intéressant, révélé lors du criblage, les cellules de ces micropuits sont clonées. Elles sont réparties dans des plaques de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits. On obtient un clone cellulaire provenant d'une seule cellule souche (Roitt et col,1985). La méthode la plus courante pour l'obtention de clones est celle des dilutions limites. Le principe consiste à diluer les cellules dans un grand nombre de puits jusqu'à ce que certains puits ne montrent plus de croissance cellulaire.

Après environ un mois, les clones sont transférés de micropuits en macropuits et ensuite en flacons où ils peuvent se développer progressivement.

### 2.4.5 Les ascites

Définition générale : liquide intrapéritonéal

#### 2.4.5.1 Production des ascites

Environ 1 million cellules issues d'un hybridome stable sont inoculées dans le péritoine d'une souris histocompatible ayant reçu 1 à 2 semaines auparavant 500µL de pristane, intrapéritonéalement aussi.
Dans ce cas une ascite se développera avec sécrétion d'anticorps. Lorsque la cavité péritonéale est gonflée et distendue, les ascites sont récoltées par ponction.

#### 2.4.5.2 Purification des ascites

Les ascites peuvent contenir un faible pourcentage de protéines sans rapport avec l'anticorps. Une purification est donc nécessaire.

Protocole:

- les ascites sont préalablement centrifugées et débarrassées des cellules subsistantes

- le surnageant est d'abord dilué dans du tampon phosphate de sodium $Na_2HPO_4$ 20mN pH: 7 $NaHPO_4$

- l'étape suivante consiste à filtrer les échantillons sur filtre 0.22µ .Si l'ascite est trop concentrée, la filtration peut se faire d'abord sur 0.45µ et sur 0.22µ ensuite

- à ce stade, l'échantillon est déposé sur une colonne de protéines A

- on lave la colonne avec du tampon phosphate afin d'éliminer toutes les substances non fixées

- l'élution des anticorps se fait par du tampon glycine HCl 0.1molaire pH: 2.8. On détecte les anticorps par mesure de l'absorbance à 280nm. Les anticorps sont recueillis dans un tampon Tris HCL 1 molaire à pH:8.9.

L'échantillon est dialysé contre du PBS et concentré. On estime la concentration en anticorps dans les ascites par lecture de la densité optique au spectrophotomètre, sachant qu'1mg d'anticorps/ml correspond à 1.4 unité d'absorbance.

### 2.4.6 Stockage des hybridomes

Les hybridomes ont tendance à perdre leurs chromosomes et finalement, nombre de clones qui s'étaient avérés positifs au départ, peuvent perdre leur capacité à produire des immunoglobulines. La surcroissance dans les puits ou flacons est évitée par le subclonage périodique. La congélation des clones permet leur maintien à long terme. Les cellules sont distribuées dans des cryotubes et progressivement congelées en les plaçant d'abord dans un container à -80°C. Par la suite, elles seront transférées dans l'azote liquide où elles peuvent séjourner des années durant.

## 2.5 DEMARCHE SUIVIE POUR LA CARACTERISATION DE L'EPITOPE

Nous avons inhibé nos anticorps avec un antigène contenant du rhamnose, les complexes anticorps-antigène formés ont été soumis à l'action d'une endoenzyme qui dégraderait les sites non protégés par l'anticorps. Après précipitation des protéines, l'épitope a été analysé par la chromatographie en phase gazeuse.

### 2.5.1 Inhibition anticorps-antigène

Il s'agit de mettre en contact l'anticorps et la substance antigénique. L'ensemble incube une nuit à 4°C. Si l'épitope reconnu est présent, l'anticorps sera inhibé et donnera un résultat négatif dans un test ELISA ou lors d'un marquage.

### 2.5.2 Digestion enzymatique

Nous avons utilisé une enzyme pour détacher tous les sites non protégés par l'anticorps.Il s'agit d'une pectate lyase qui hydrolyse des séquences d'acides galacturoniques. L'activité maximale de l'enzyme à pH:8.5 est suivie au spectrophotomètre à 285nm. On effectue finalement une dialyse contre du tampon Tris 20mN afin d'éliminer les oligomères détachés.

### 2.5.3 Précipitation des anticorps

Nous avons donc en solution les complexes anticorps-antigènes. L'étape suivante consiste à décrocher l'antigène. Pour précipiter les protéines, nous avons employé le TFA à 25% .

Ses avantages sont les suivants:

- il précipite efficacement les protéines,
- il est volatil et facilement évaporable à 30°C , l'avantage de travailler à de basses températures est la non dégradation des polysaccharides,
- le TFA est l'acide organique utilisé ultérieurement pour l'hydrolyse des polyosides. En utilisant le TFA au lieu d'un autre agent précipitant, on diminue les risques de contamination.

### 2.5.4 Analyse en phase gazeuse

Le surnageant est prélevé, le TFA est évaporé sous hotte. Les échantillons sont alors soit d'abord réduits, soit directement hydrolysés, dérivatisés et injectés.

## 2.6 MARQUAGE DE COUPES PAR LA MICROSCOPIE

Matériel: grilles Nickel de cellules de carottes Daucus carotta

Principe:

- étape de saturation : les grilles sont déposées dans 200µL de poudre de lait à 5% préparée dans le tampon adéquat

- dépôt de l'anticorps primaire dilué dans le tampon contenant de la poudre de lait à 1% et du Tween à 0.1% . Les grilles sont incubées 1 nuit à 4°C

- lavage de 4 fois 5 minutes dans 200µL de tampon, poudre de lait 1% et Tween 0.1%

- dépôt de l'anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal et dilué 20 fois, on laisse incuber 1h à température ambiante,

- lavage de 2 fois 5 minutes dans le tampon contenant de la poudre de lait à 1% et du Tween à 0.1% . Les lavages suivants se font dans le tampon filtré, on laisse d'abord les grilles 2 fois 5 minutes par goutte de tampon, ensuite les grilles sont lavées à la pissette par 50ml de tampon filtré à 0.22µ

- fixation dans la glutaraldéhyde 3% pendant 5 minutes

- lavage de 6 fois 5 minutes par goutte d'eau filtrée, les grilles sont ensuite lavées à la pissette par 150ml d'eau

- une étape de déesterification des pectines peut être faite juste avant la saturation, elle se réalise dans du NaOH 0.05 molaire pendant 30 minutes.

Les grilles sont séchées, colorées à l'acétate d'uranyle 2% en eau pendant 20 minutes et puis observées au microscope.

# 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

## 3.1 ANALYSE DE L'ANTIGENE

Par la chromatographie anionique, nous avons séparé les parties hérissées des pectines des parties lisses sans chaînes latérales. Nous avons ensuite déterminé la composition chimique de notre antigène. Pour ce faire, nous avons procédé :

- à une microdétermination quantitative des sucres neutres et des acides galacturoniques dans les fractions recueillies,
- à une chromatographie en phase gazeuse des fractions.

### 3.1.1 Analyse colorimétrique

Le surnageant de cellules de carotte en suspension a été dialysé contre de l'eau désionisée et élué d'une colonne chromatographique échangeuse d'anions QAE A25 par un gradient d'acétate de sodium de concentration comprise entre 0 et 0.8 molaire à pH:8.5. Les fractions en sortie de colonne ont été dosées pour connaître leur contenu en sucres neutres et en acides galacturoniques.

Les profils chromatographiques se présentent de la manière suivante: on observe entre 35ml et 55ml d'élution un grand pic qui correspond aux sucres neutres (fig 3.1a) coïncidant avec un pic d'acides galacturoniques (fig 3.1b).

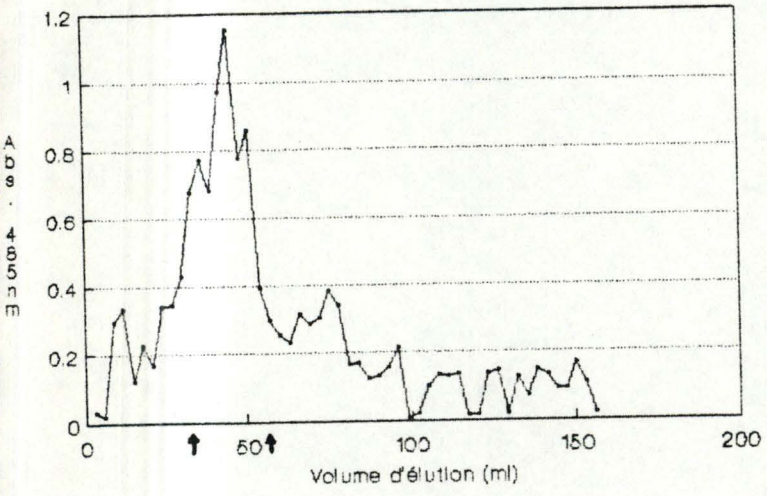



Fig 3.1a Dosage des oses neutres par la méthode de Dubois

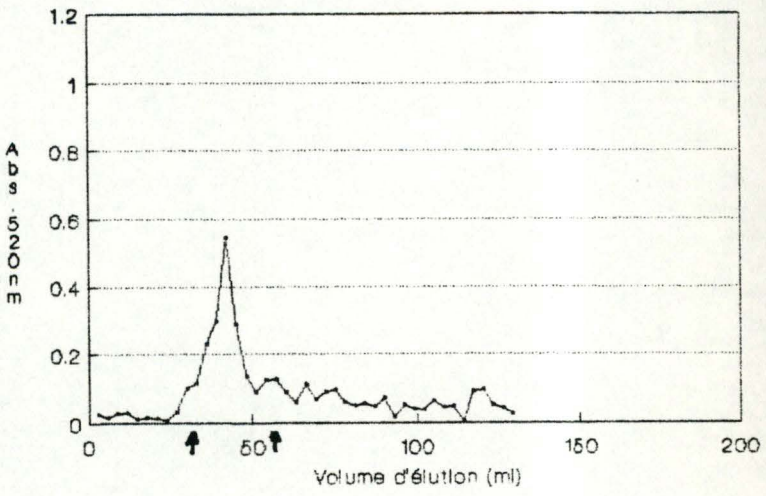



Fig 3.1b Dosage des acides uroniques par le MHBP

Les pics de sucres neutres et d'acides galacturoniques se présentent tôt en début de gradient. Les acides galacturoniques porteurs de chaînes latérales via le rhamnose constitutif se décrochent les premiers. Les autres galacturonates non ramifiés sont plus fortement fixés sur le gel et ne s'en détachent qu'à des concentrations en tampon plus élevées. Nous n'observons pas ce second pic de galacturonates car les pectines faiblement estérifiées forment des agrégats en présence de cations métalliques et peuvent précipiter en présence d'acétate de sodium concentré. Seules les pectines hérissées, à haut taux d'estérification, sont ainsi décrochées.

Par les droites d'étalonnage, les concentrations en sucres neutres et acides galacturoniques ont été estimées, dans la fraction comprise entre 35ml et 55ml d'élution, à :
200µg/ml de sucres neutres et à 50 µg/ml de galacturonates.

### 3.1.2 Analyse par chromatographie gazeuse

Après avoir dosé notre antigène, les fractions ont été ß éliminées et les polysaccharides ont été hydrolysés en leurs monomères pour l'analyse gazeuse. Nous avons détecté les sucres neutres suivants

- galactose: 41%
- arabinose: 40%
- rhamnose: 9.4%
- glucose: 4.7%
- xylose: 3%
- fucose: 2%
- mannose: 1.0%

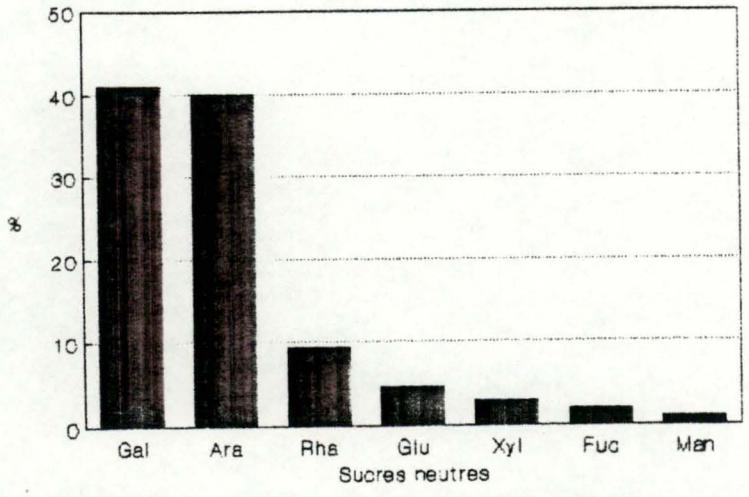



Fig 3.2 Analyse de l'antigène pectique par la chromatographie gazeuse. Notre antigène contient 41% de galactose, 40% d'arabinose, 9.4% de rhamnose, 4.7% de glucose ainsi que quelques traces de xylose, fucose et mannose.

L'isolement effectué à partir du surnageant de cellules de carottes nous a permis d'obtenir des polysaccharides décrits comme étant des chaînes d'oses neutres portées par le rhamnose. Les fractions rassemblées en un échantillon ont été β éliminées. Toutefois, des acides galacturoniques déestérifiés peuvent subsister à la base de l'antigène. Ces galacturonates permettent le couplage de l'antigène avec la BSA méthylée. En immunisant les souris avec ce polysaccharide, nous avions des chances d'obtenir des anticorps dirigés contre un épitope contenant du rhamnose, du fait même que ce dernier est bordé de galacturonates immunodominants.

## 3.2 LES ANTICORPS POLYCLONAUX

### 3.2.1 Reconnaissance de l'antigène

Dès que le sérum fut disponible, nous l'avons dilué 20 fois et testé en ELISA contre notre antigène (fig. 3.3). Les tampons utilisés pour ces premiers tests étaient d'une part le PBS à pH:7.4 et d'autre part le tampon Tris20mN/Ca1mN/Na150mN à pH: 7.4 requis pour le 2F4: anticorps monoclonal anti-pectine acide qui nous a servi de contrôle négatif tout au long de nos essais. Le support utilisé était les modules NUNC rigides. La saturation a été faite avec de la gélatine à 200µg/ml. Pour tous les tests, nous avons calculé les moyennes, les écarts types et les valeurs des blancs ont été soustraites des mesures.

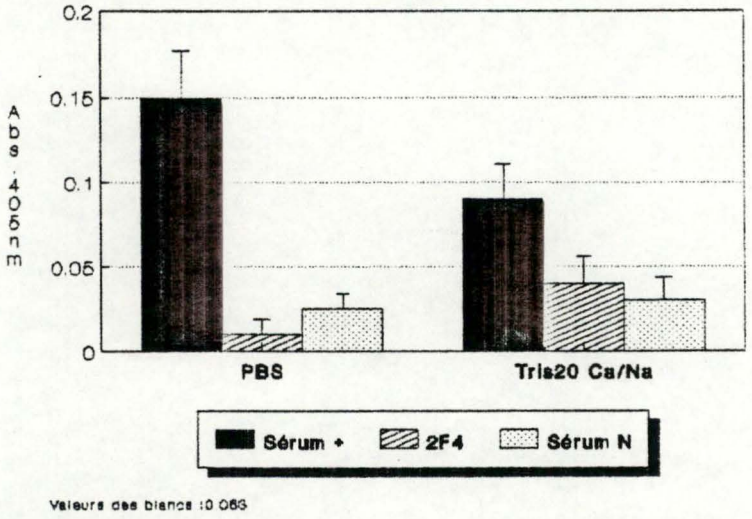



Fig 3.3 Test ELISA montrant la reconnaissance de notre antigène par le sérum de souris immunisées.Ce test a été réalisé dans le tampon PBS pH:7.4 et dans le tampon Tris Ca/Na pH:7.4. Les contrôles négatifs sont le 2F4 Ac anti-pectine acide et un sérum normal. Les moyennes ont été calculées sur 8 valeurs.

On constate d'abord que la réponse du sérum positif contre l'antigène est plus importante en PBS qu'en Tris Ca/Na. De plus, on observe que dans les conditions ioniques optimales de réponse du sérum positif (PBS) ainsi qu'en Tris 20/Ca/Na, nos contrôles négatifs sont corrects: le 2F4 et le sérum normal ne répondent que faiblement contre notre antigène pectique.

### 3.2.2 Dilution du sérum

Un test de dilution du sérum a été effectué. La fin du plateau de la courbe de réponse se situant à peu près à une dilution de 40 fois en PBS, nous avons adopté cette valeur pour nos tests ultérieurs.

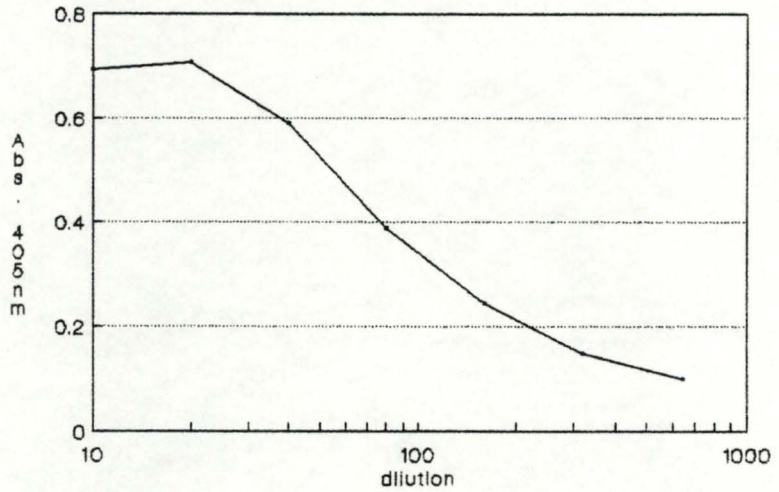



Fig 3.4 Courbe de dilution du sérum positif dans le tampon PBS. La fin du plateau de la courbe de réponse nous indique la dilution à laquelle nous pouvons travailler.

### 3.2.3 Optimalisation de la saturation

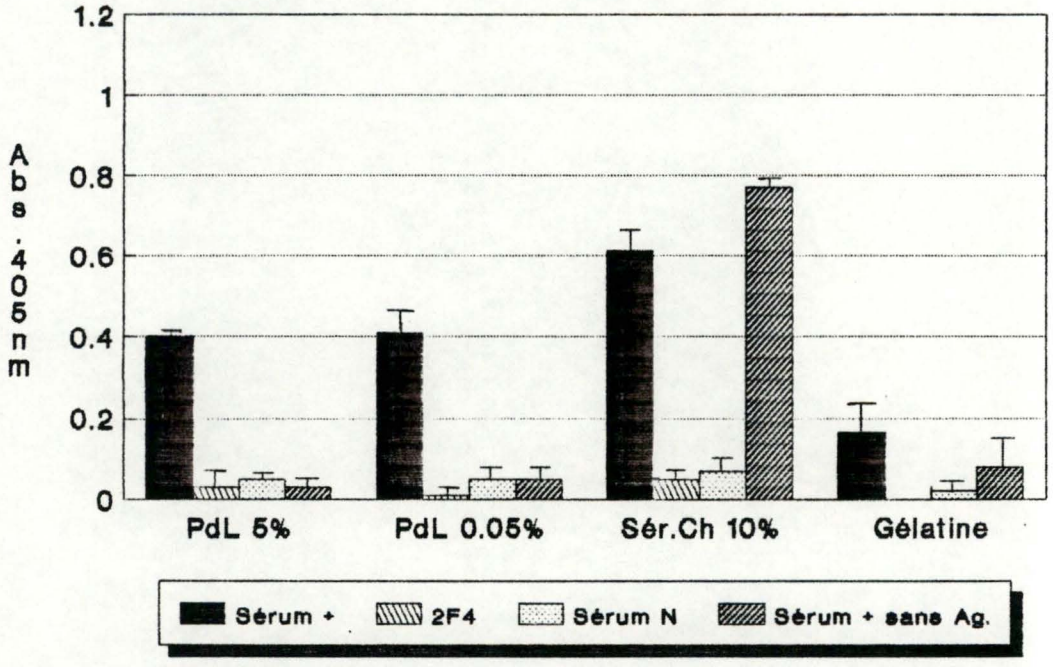
Au cours des tests, la gélatine s'est avérée peu efficace pour la saturation, nous avons constaté des problèmes d'adsorptions non spécifiques pour nos blancs, nos témoins négatifs et des écarts relativement importants entre les répétitions.

C'est pourquoi, nous avons envisagé l'utilisation d'autres agents saturants comme :

| | absorbance des blancs: |
|---|---|
| -la poudre de lait 5% | 0.08 |
| -la poudre de lait 0.05% | 0.11 |
| -l'ovalbumine 2% | 0.879 |
| -le sérum de cheval 10% | 0.09 |
| -la gélatine | 0.124 |

Nous avons également testé les possibilités de fixation non spécifique des anticorps sur les protéines de saturation ou encore les possibilités de réactions croisées. Le sérum positif a ainsi été testé contre les protéines de saturation adsorbées au fond des puits et contre l'antigène, en utilisant les protéines comme agent saturants (fig.3.5).

NB: les résultats obtenus avec l'ovalbumine n'ont pas été représentés graphiquement, les réactions croisées étant trop importantes.




Les blancs ont été soustraits des valeurs

Fig 3.5 Effet de différentes protéines de saturation sur la reconnaissance de l'antigène par le sérum des souris immunisées. Les anticorps testés contre l'antigène sont: le sérum positif et les anticorps contrôles 2F4 et sérum normal. Les 4 $\Sigma$ colonnes de chaque essai de saturation présentent les résultats de tests effectués en absence de l'antigène au fond du micropuits. Les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

On peut comparer les résultats obtenus avec les différents agents saturants. Le sérum de cheval 10% ne convient pas car la fixation non spécifique est élevée. En saturant avec la gélatine, on observe des écarts relativement importants entre les répétitions et une réponse du sérum positif plus faible. C'est donc avec la poudre de lait 5% que nous avons les meilleurs résultats:

-la poudre de lait sature suffisamment les sites non-spécifiques tout en permettant la reconnaissance de l'antigène par les anticorps,

-les réactions croisées sont faibles,

-on observe des réponses du sérum positif plus élevées avec un coefficient de variation plus faible.

Nous avons donc décidé de continuer les tests en saturant avec la poudre de lait à 5% afin d'être certain d'avoir une saturation fiable et suffisante.

Nous disposions donc d'un sérum positif contre notre antigène, il nous fallait alors obtenir des anticorps monoclonaux et préciser la nature des épitopes reconnus.

## 3.3 LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Après fusion avec un myélome, les clones obtenus ont été criblés par test ELISA et par Dot blot. Le criblage a permis d'obtenir huit clones. L'étape de criblage est l'opération la plus délicate dans la production d'anticorps monoclonaux contre des polysaccharides de végétaux.
Il faut en effet détecter les hybridomes par des tests pour lesquels les conditions ioniques exigées pour la reconnaissance de l'antigène par le monoclonal ne sont pas encore connues.

### 3.3.1 Détermination isotypique

On distingue chez les mammifères 5 classes d'immunoglobulines(Ig): IgG-IgM-IgA-IgE-IgD qui diffèrent par leurs poids moléculaires, leurs charges, leurs compositions en acides aminés et en sucres. A ces différences entre classes, s'ajoute une hétérogénéité des Ig à l'intérieur de chaque classe.

Nous avons testé la présence d' -IgM

-IgG1 -IgG2a -IgG2b

Nous avons obtenu:

| IgM | IgG1 | IgG2b |
|---|---|---|
| 3 | 3 | 2 |

Les cinq clones producteurs d'IgG ont été retenus pour une étude plus détailée mais par la suite trois d'entre eux ont cessé de produire des anticorps. Les clones producteurs d'IgM n'ont pas été retenus en raison de la mise en oeuvre difficile de ces anticorps:

- leur masse moléculaire élevée pose des problèmes en immunocytochimie,

- de plus leur faible affinité empêche leur application dans des chromatographies d'affinité.

Nous avons donc continué à travailler avec deux clones :

- une IgG1 = le 8G11

- une IgG2b = le 10H1

### 3.3.2 Mise au point du test ELISA pour optimaliser les réponses du 10H1 et du 8G11.

Le test ELISA de base décrit dans la partie "Matériels et Méthodes" s'est avéré inefficace pour nos anticorps monoclonaux. Nous y avons donc introduit des modifications afin d'optimaliser les réponses du 10H1 et 8G11. Nous avons succesivement modifié:

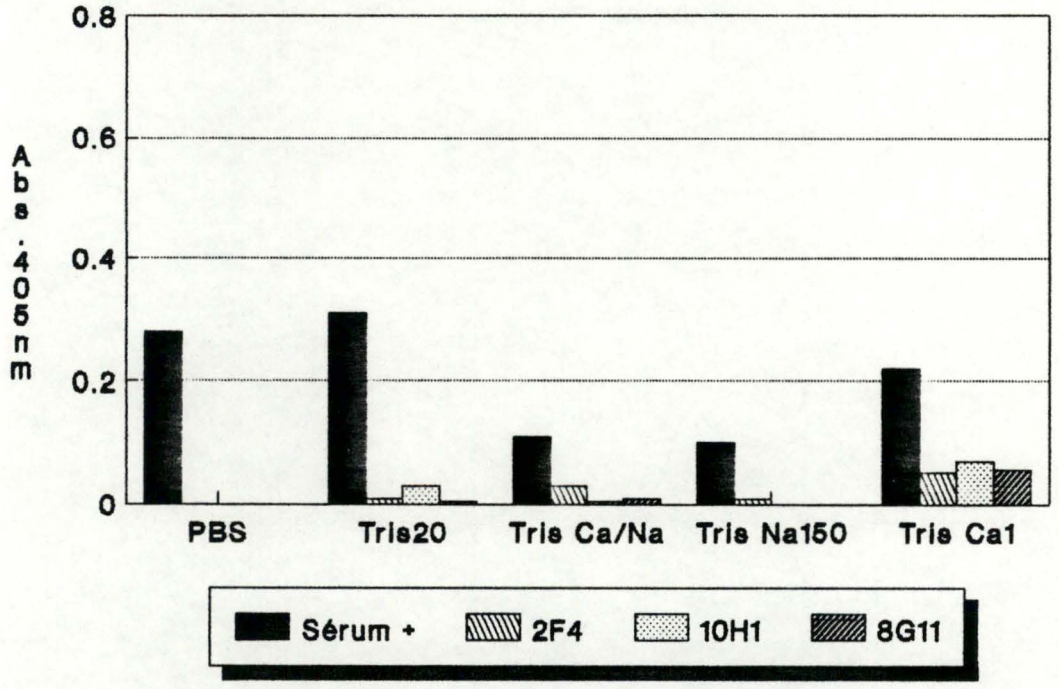
- les agents saturants ( cfr fig. 3.5)

- le type de support : les premiers tests ont été réalisés sur des languettes NUNC rigides et sur boîtes souples PVC. Les réponses des monoclonaux sur les languettes NUNC étaient nulles. Nous avons donc poursuivi nos tests en utilisant comme support les boîtes souples.

- le tampon utilisé : nous avons testé les tampons suivants: le PBS, le Tris 20mN, le Tris 20mN/Ca1mN/Na150mN, le Tris 20mN/Na150mN et le Tris 20mN/Ca1mN.

### 3.3.2.1 Effet des différents tampons dans la reconnaissance de notre antigène par les anticorps 10H1 et 8G11

Les ascites diluées 20 fois ont été testées contre l'antigène dans les différents tampons mentionnés plus haut.
La saturation a été faite par la poudre de lait à 5% . Les résultats sont présentés à la figure 3.8 ci-dessous.




les blancs ont été soustraits des valeurs:0.109

Fig. 3.8 Effet des différents tampons dans la reconnaissance de l'antigène par les monoclonaux 10H1 et 8G11. Le contrôle négatif est le 2F4: Ac monoclonal anti-pectine acide. Le sérum nous a servi de contrôle positif. Les moyennes ont été calculées sur deux valeurs.

Malgrè la très faible absorbance, on constate que la meilleure réponse des anticorps contre l'antigène s'obtient dans le tampon Tris 20mN/Ca1mN. En effet, dans les autres conditions ioniques, la reconnaissance de notre antigène pectique par les anticorps 10H1 et 8G11 est nulle (PBS, Tris Ca/Na, Tris Na) ou presque nulle (Tris20).

Nous avons décidé de tester nos anticorps dans les différents tampons contre la pectine sigma déposée au fond des micropuits d'une plaque souple PVC (Fig. 3.9).

### 3.3.2.2 Effet des différents tampons dans la reconnaissance de la pectine sigma par les anticorps 10H1 et 8G11

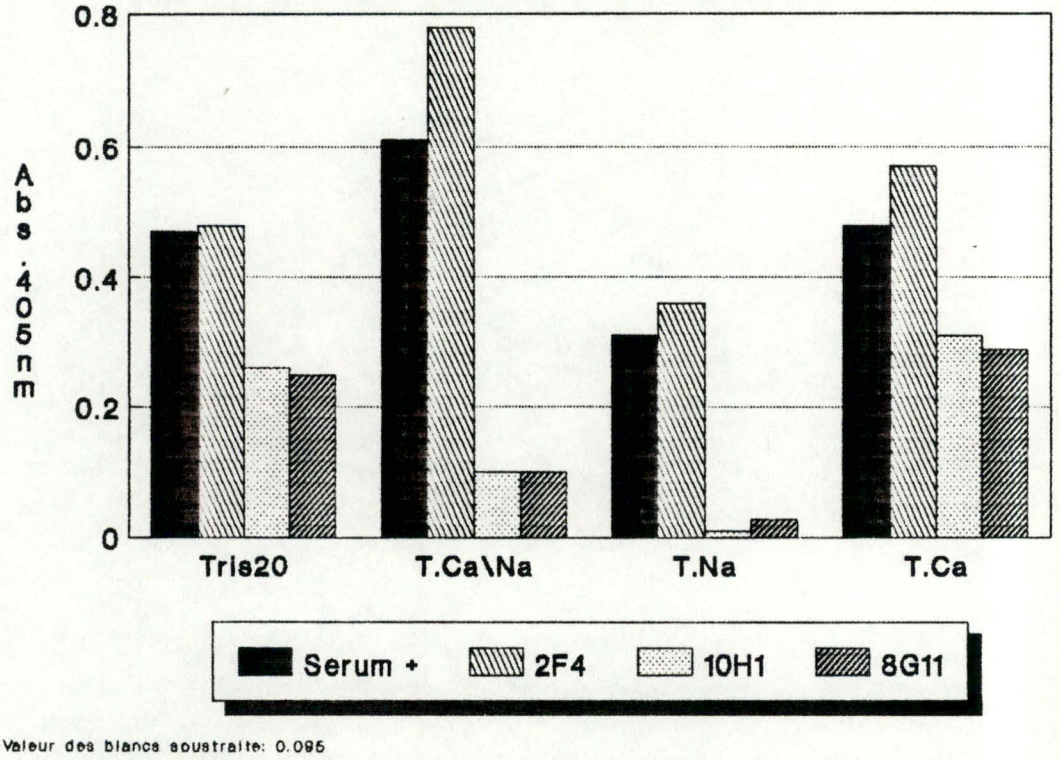



Fig. 3.9 Test ELISA montrant l'effet de différents tampons dans la reconnaissance de la pectine sigma par les anticorps 10H1 et 8G11. Le contrôle positif est le 2F4 . Les moyennes ont été calculées sur deux valeurs.

On observe qu'en présence de Na+, la réponse des anticorps 10H1 et 8G11 est faible. Elle est plus élevée en Tris 20mN et est meilleure encore en Tris 20mN/Ca1mN. L'effet des différents ions monovalents et bivalents sur la reconnaissance de l'épitope par les anticorps 10H1 et 8G11 sera discuté ultérieurement. On constate également que le sérum positif répond à la fois contre la pectine sigma (fig. 3.9) et contre notre antigène pectique (fig. 3.8). La caractéristique commune à la pectine et à notre antigène est la présence de rhamnose bordé de quelques acides galacturoniques. Il nous fallait donc mettre en évidence que nous avions bien produit des anticorps monoclonaux dirigés contre la partie rhamnose de la pectine sigma et non contre les séquences d'acides galacturoniques reconnues par le 2F4. Nous devions aussi comprendre pourquoi la reconnaissance de notre antigène au fond des micropuits était si faible. Mais avant cela, une détermination de la dilution des ascites à laquelle nous pouvions travailler était nécessaire.

Nous avons donc procédé, tout comme pour le sérum, à l'établissement de courbes de dilutions.

### 3.3.3 Courbe de dilutions des ascites

Par ce test, nous avons mis en évidence la dilution optimale à employer pour déterminer la réponse du 10H1 et du 8G11. Ce test a été fait à la fois contre notre antigène pectique et contre la pectine sigma, dans le tampon Tris20mN/CaImN (Fig.3.10).

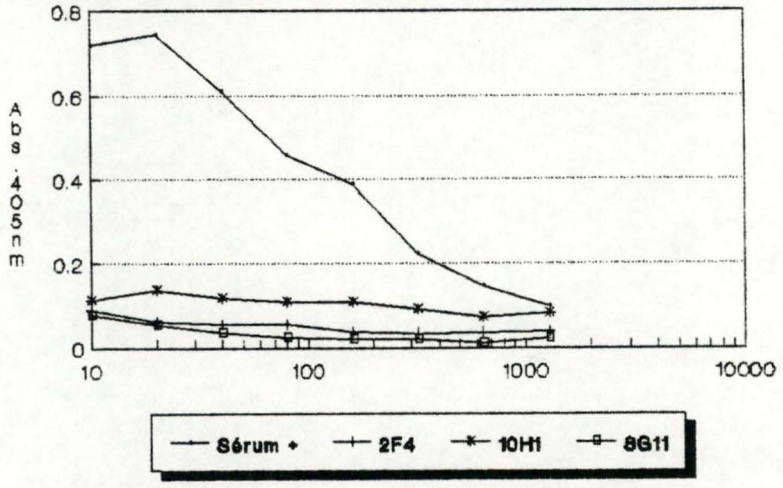



Fig. 3.10 Courbe de dilutions des ascites contre notre antigène pectique

Nous avons constaté une réponse faible lors de la dilution des ascites contre notre antigène, nous avons recommencé la gamme de dilution de nos anticorps contre la pectine sigma (Fig. 3.11)

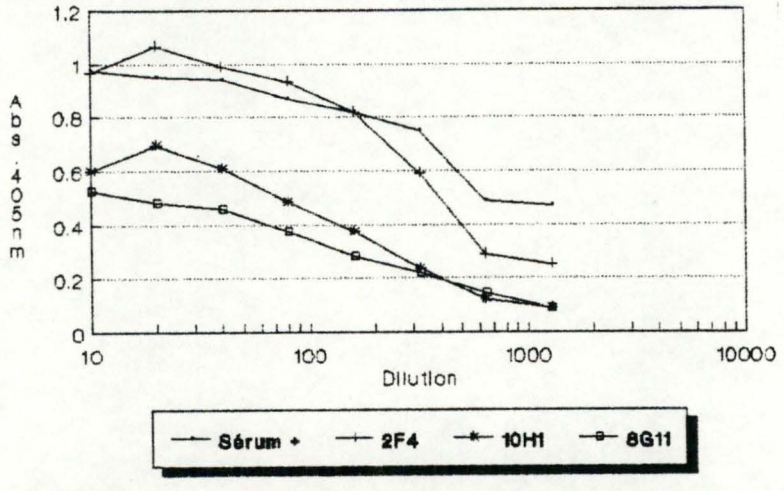
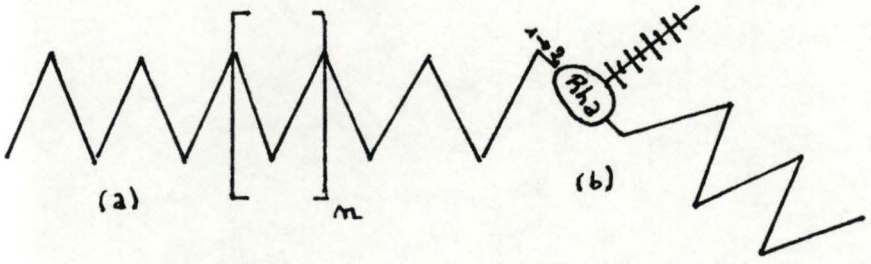


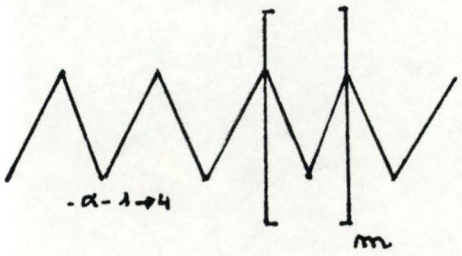

Fig. 3.11 Courbe de dilution de nos ascites contre la pectine sigma

On constate que la fin du plateau de la courbe de réponse des anticorps 10H1 et 8G11 contre la pectine sigma se situe à peu près à une dilution de 40 fois. Nous avons donc adopté cette dilution pour nos tests ultérieurs.

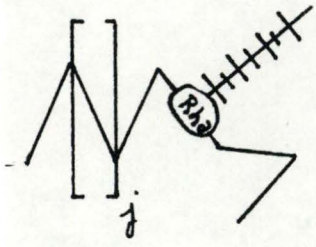
REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PECTINE AVEC:

a) Zone lisse
b) Zone hérissée




ZONE HOMOGALACTURONANE




FRACTIONS ANTIGENIQUES OBTENUES
APRES β ELIMINATION

j: petit= unités d'acides
galacturoniques restant
après β élimination

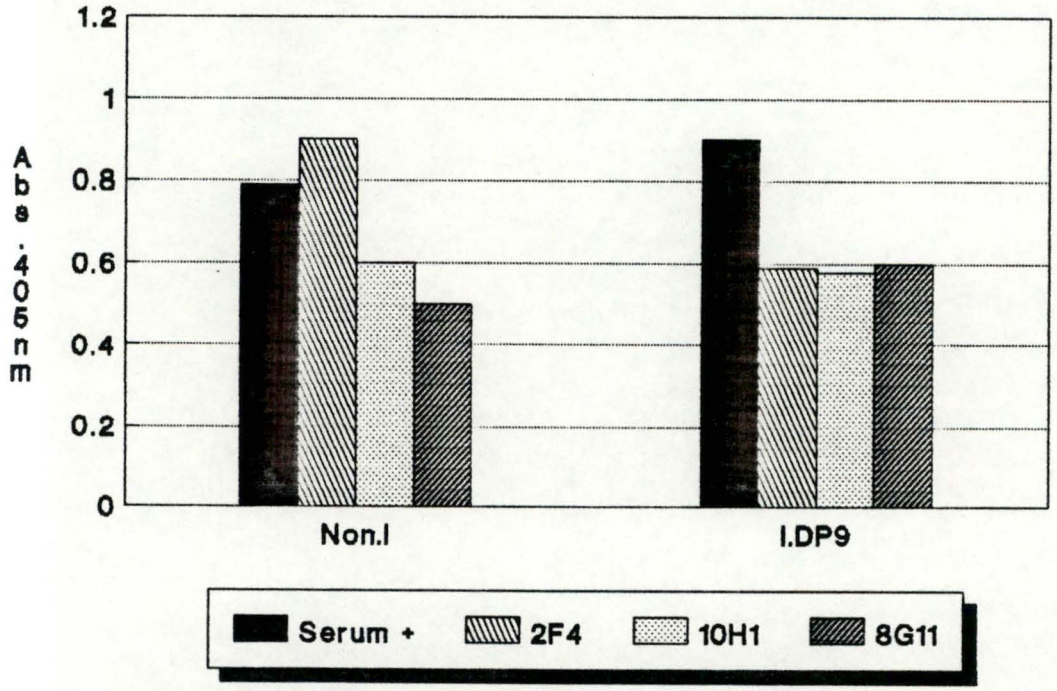
Chaînes latérales : Arabinanes
Arabinogalactanes
Galactanes

ON REMARQUE QUE LE RHAMNOSE EST PRESENT A LA FOIS SUR LA PECTINE SIGMA ET SUR NOTRE ANTIGENE PECTIQUE.

### 3.3.4 Inhibition des anticorps par un fragment homogalacturonique de DP égal à neuf

Il nous fallait prouver que nous disposions bien d'anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope de la pectine contenant du rhamnose et non contre une séquence d'acides homogalacturoniques (motif reconnu par le 2F4).
Pour cela, nous avons procédé à un test par inhibition: nous avons mis en contact les anticorps 8G11,10H1,2F4 avec un fragment homogalacturonique de degré de polymérisation égal à neuf (DP9 : degré de polymérisation minimal des chaînes pectiques reconnu par le 2F4) (Liners et col,1991). Le principe du test par inhibition est le suivant: si l'anticorps reconnait un épitope sur le fragment pectique de DP9, il va s'y fixer. Il ne sera donc plus disponible par la suite pour se fixer sur la pectine acide adsorbée au fond des micropuits, ce qui se traduira par une réponse négative en ELISA.

Nous avons déposé la pectine au fond des puits et nous avons testé la réponse de nos anticorps non inhibés et inhibés par le DP9 sur cette pectine (Fig. 3.12).



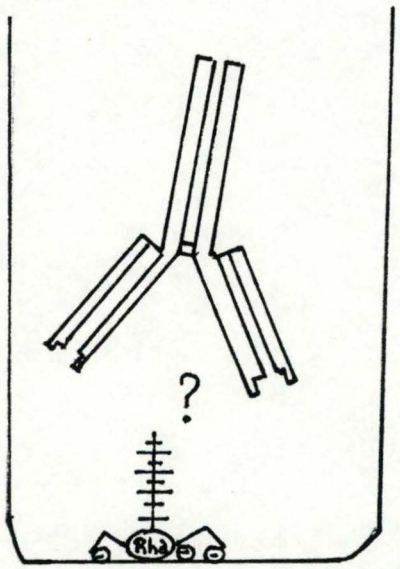

les blancs ont été soustraits des valeurs:0.131

Fig. 3.12 Test ELISA par inhibition des anticorps avec un fragment homogalacturonique de DP neuf.De la pectine sigma à 200µg/ml a été déposée au fond des puits. Les moyennes ont été calculées sur deux valeurs.

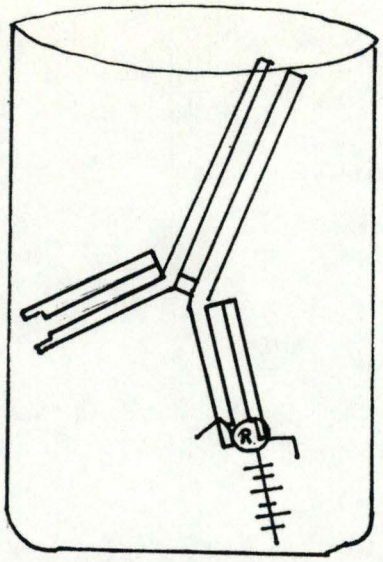
On constate que le fragment homogalacturonique n'inhibe pas du tout nos anticorps 10H1, 8G11 ni le sérum positif, par contre on observe son effet inhibiteur à 40% sur le 2F4 (anticorps anti-pectine acide). Nos anticorps ne sont donc pas dirigés contre une séquence d'acides galacturoniques tel le DP9: nous avons à faire à des anticorps monoclonaux différents du 2F4.
Nous avons ensuite tenté de comprendre pourquoi nos anticorps 10H1 et 8G11 reconnaissaient faiblement notre antigène pectique déposé au fond des micropuits. Les hypothèses émises étaient:

- d'une part la trop faible densité d'antigènes dans les puits, (ce qui est peu probable étant donné que nos anticorps 10H1 et 8G11 réagissent bien contre la pectine sigma qui est adsorbée au fond des puits à la même concentration que notre antigène)

- d'autre part l'empêchement stérique des antigènes adsorbés au fond des micropuits, comme schématisé ci- dessous.

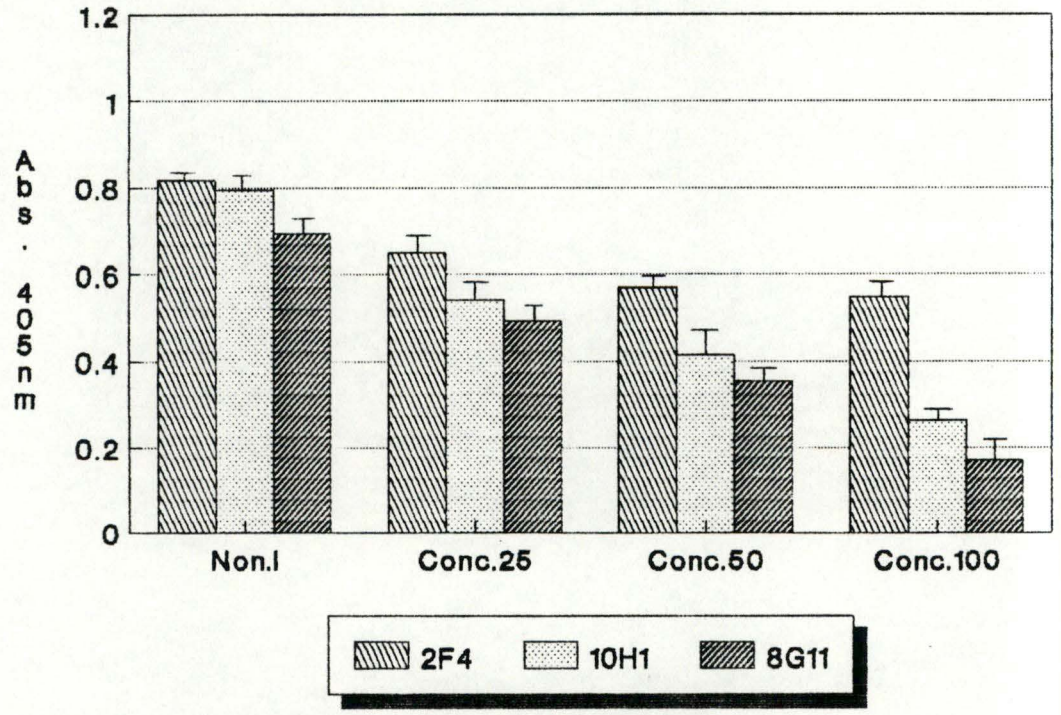



Les acides galacturoniques en position -2 et en ∝ -1, se fixent dans le fond du micropuits, les chaînes latérales sur le carbone 4 du rhamnose empêchent l'accès de l'anticorps au rhamnose au moins.
Par contre, en solution, l'épitope est totalement accessible, c'est pourquoi nous avons réalisé un test d'inhibition de nos anticorps par notre antigène: si l'épitope reconnu est présent, l'anticorps pourra s'y fixer et donnera une réponse négative en test ELISA.



### 3.3.5 Inhibition des anticorps 10H1 et 8G11 par différentes concentrations antigéniques

Les anticorps ont été inhibés par différentes concentrations en antigène à savoir: 100µg/ml, 50µg/ml et 25µg/ml et ont été testés la pectine acide déposée au fond des puits. Un contrôle avec les anticorps non inhibés a été fait en parallèle. Le tampon utilisé est le Tris20mN/Ca1mN (Fig.3.13).



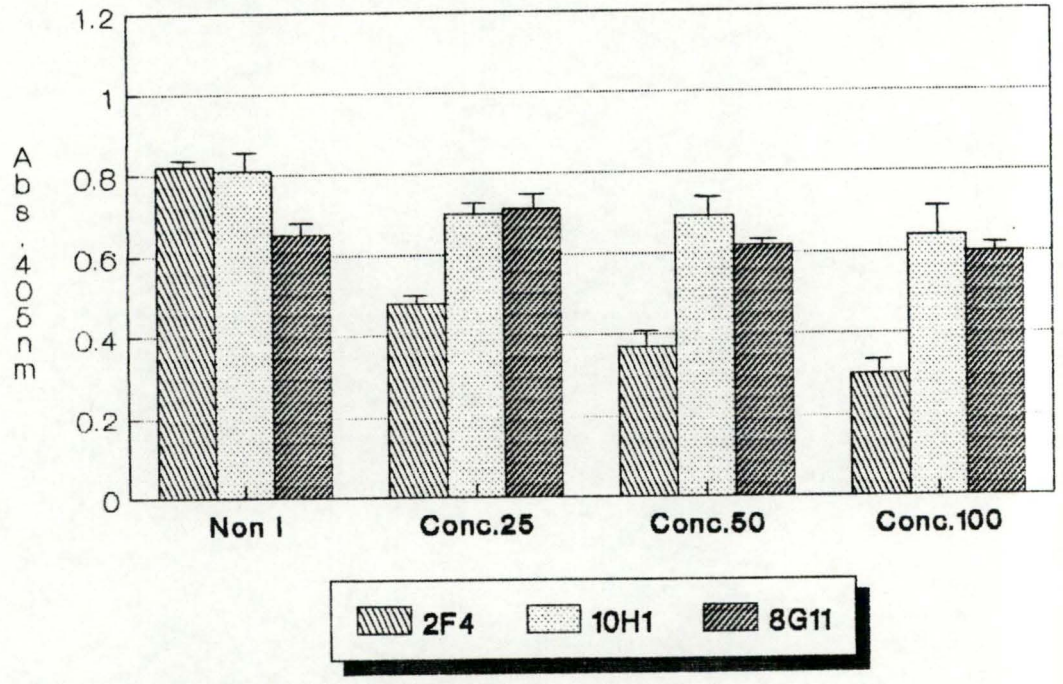

les blancs ont été soustraits des valeurs:0.114

Fig. 3.13 Test ELISA d'inhibition des anticorps par différentes concentrations en antigène. La pectine acide a été déposée au fonds des puits, les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

Nous pouvons comparer la réponse des anticorps non inhibés et leur réponse après inhibition par l'antigène. On constate qu'à une concentration de 100µg/ml, notre antigène pectique inhibe les anticorps 10H1 et 8G11 à raison de 75%, mais n'annule qu'un quart de la réponse du 2F4. L'épitope reconnu est donc bien commun à notre antigène de départ et à la pectine acide. De plus, nous avons la confirmation que la non reconnaissance de l'antigène au fond des puits était dû à un empêchement stérique (cfr schémas précédents).

Sachant que l'épitope reconnu par nos deux anticorps 10H1 et 8G11 est partagé par notre antigène pectique et par la pectine acide, nous avons testé la capacité de cette pectine acide à réellement inhiber nos anticorps. Les anticorps 10H1, 8G11 et le 2F4 ont été inhibés par différentes concentrations en pectine acide et testés ensuite en ELISA contre cette même pectine déposée au fond des puits.

### 3.3.6 Inhibition des anticorps 10H1 et 8G11 par différentes concentrations de pectine acide




Les blancs ont été soustraits des valeurs: 0.114

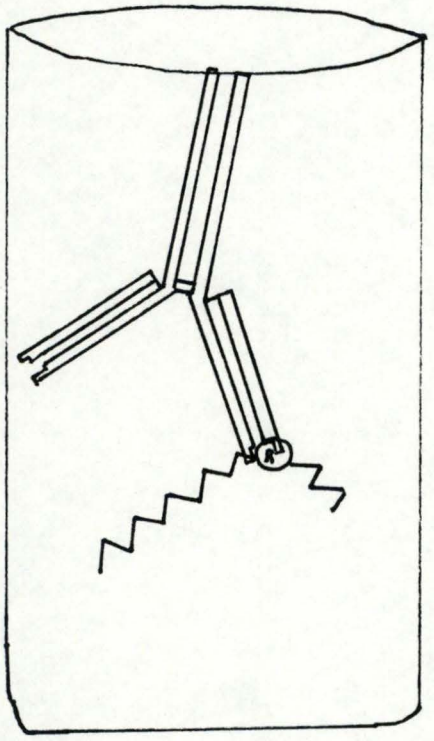
Fig.3.14 Test ELISA d'inhibition des anticorps par différentes concentrations de pectine acide. Le contrôle est le 2F4 (anticorps monclonal anti-pectine acide). Le test est réalisé dans le tampon Tris20mN/CalmN. Les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

Le résultat du test s'est avéré étonnant: alors que les anticorps 10H1 et 8G11 répondent correctement contre la pectine acide déposée au fond des puits, ils ne semblent pas être inhibés , ou très peu par cette dernière en solution. Le 2F4 par contre réagit bien contre la pectine acide déposée au fond des puits et est également inhibé par cette pectine en solution.

Nous avons supposé que l'épitope reconnu par les anticorps 10H1 et 8G11 contenait du rhamnose et quelques unités d'acides galacturoniques. L'absence d'inhibition de nos deux anticorps serait due à une réassociation intermoléculaire des chaînes pectiques contiguës au rhamnose: ces chaînes s'associeraient par les ions Ca++ à la pectine immobilisée au fond des micropuits. Le 2F4 quant à lui réagissant contre ces chaînes pectiques, exclurait toute réassociation intermoléculaire.

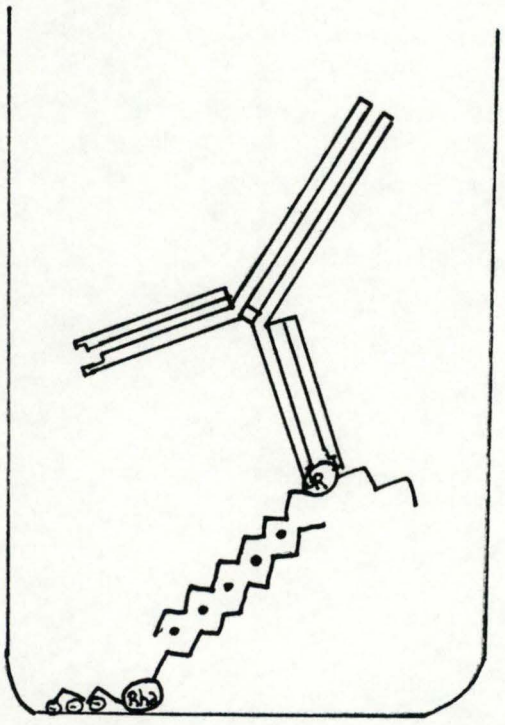
Hypothèse de la réassociation intermoléculaire entre les pectines via les ions calcium :

1)Première étape : incubation de l'anticorps et de la pectine en solution



En solution, l'anticorps peut se fixer librement sur son épitope.

2) Deuxième étape : transfert des anticorps inhibés dans les micropuits, en contact avec la pectine immobilisée.



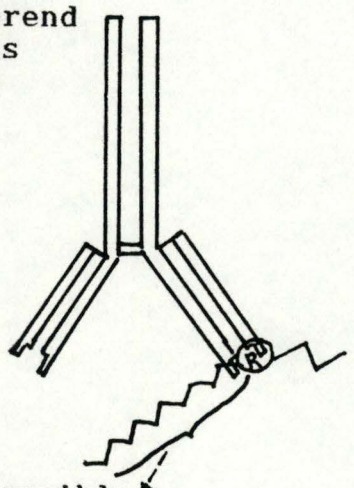
Le complexe anticorps-antigène se réassocie par le calcium à la pectine acide immobilisée au fond des puits. Nos anticorps sont donc retenus et sont détectés par l'anticorps secondaire anti-souris,quoiqu'ils soient effectivement inhibés par leur antigène.

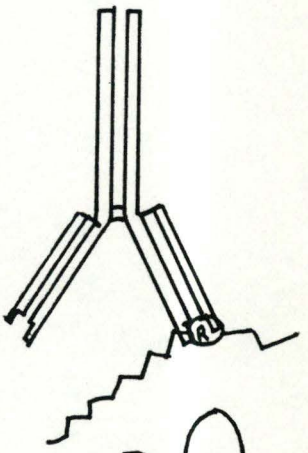
### 3.3.7 Mise en évidence de la réassociation intermoléculaire

Afin d'empêcher cette réassociation pectique, nous avons soumis les complexes anticorps-antigène à l'action d'une endoenzyme: une pectate lyase qui éliminerait les carboxylates non protégés par l'anticorps, c'est à dire les zones homogalacturoniques.L'activité de l'enzyme est suivie par la formation d'oligomères insaturés détectables au spectrophotomètre à 235nm.

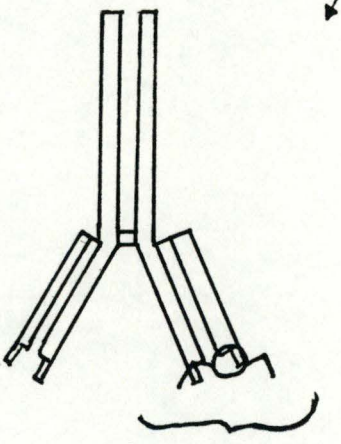
Inhibition des anticorps par la pectine acide, l'épitope reconnu comprend du rhamnose et quelques acides galacturoniques bordant le rhamnose.

action de l'enzyme



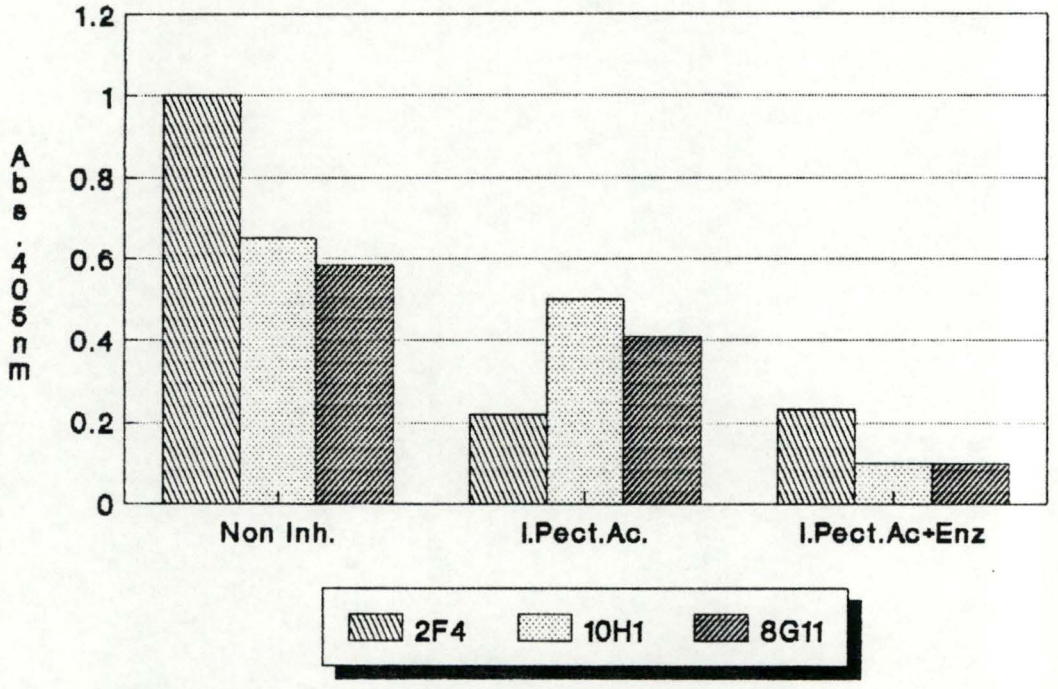


réassociation possible au fond des micropuits



plus de réassociation possible au fond des micropuits.

On constate qu'avant l'incubation de l'enzyme, l'inhibition des anticorps 10H1 et 8G11 par la pectine acide ne paraît pas très importante. Mais après avoir soumis les complexes Ac-Ag à l'action de la pectate lyase, nous avons effectivement observé une inhibition quasiment complète. Malgré l'effet enzymatique, les anticorps anti-pectine acide (2F4) sont restés associés à leur épitope, comme en témoigne la faible absorbance du test par inhibition présenté à la figure 3.15 (I.P.Ac+Enz).




Blancs soustraits des valeurs:0.121

Fig.3.15 Mise en évidence de l'association intermoléculaire des pectines. Les anticorps 10H1 et 8G11 ont été inhibés par la pectine acide, les complexes anticorps-pectine ont été soumis à l'action d'une endoenzyme qui élimine les carboxylates non protégés par les anticorps. Les moyennes ont été calculées sur deux valeurs.

Nous avons voulu vérifier que l'inhibition de la réponse n'était pas due à une dégradation de l'anticorps par des protéases éventuellement présentes dans la solution enzymatique.

C'est pourquoi, nous avons immobilisé dans les puits d'une plaque ELISA les complexes anticorps-antigène digérés ou non par l'endo-pectate lyase. Nous avons testé leur reconnaissance par l'anti-corps secondaire.On observe, après action de l'enzyme, une recon-naissance identique à celle du témoin (Fig.3.16).

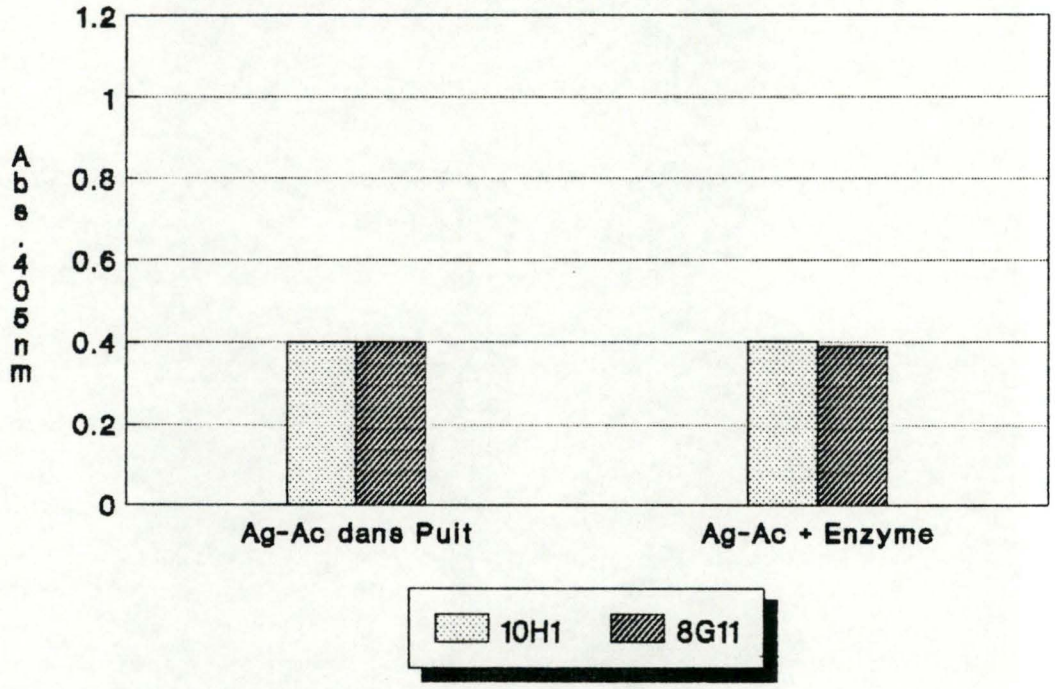



Fig. 3.16 Test ELISA contrôle montrant la non dégradation de nos anticorps par la solution enzymatique. Les moyennes ont été calculées sur deux valeurs.

Tous les tests confirment nos hypothèses à savoir:

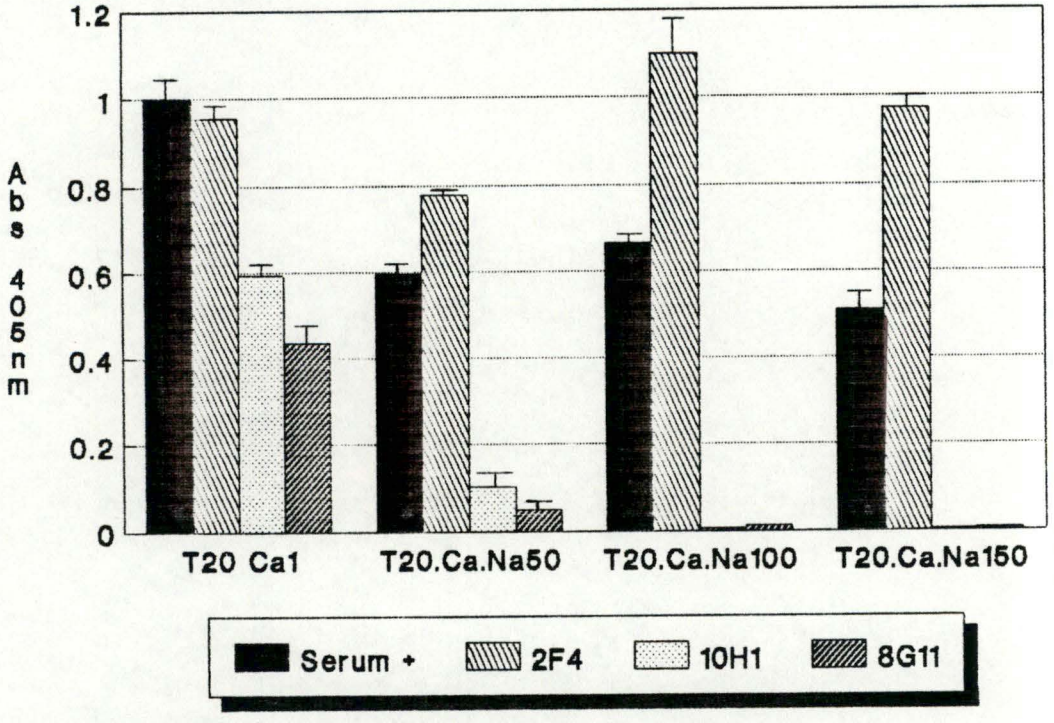
- que nous disposons d'anticorps différents du 2F4,
- que l'épitope reconnu est commun à la pectine acide et à notre antigène pectique et que cet épitope contient du rhamnose,
- que la non reconnaissance de notre antigène au fond des micropuits est due à la non accessibilité de l'épitope à l'anticorps,
- enfin que la non inhibition des anticorps par la pectine sigma en solution est due à la réassociation via le calcium des pectines liées à l'anticorps avec les pectines au fond des micropuits.

### 3.3.8 Optimalisation des conditions ioniques

Nous avons déterminé d'une manière générale que le tampon Tris20mN/Ca1mN permettait une bonne réponse des anticorps 10H1 et 8G11. Cependant, nous avons voulu tester toutes les possibilités ioniques et voir si en partant du Tris20mN/Ca1mN, l'effet d'autres monovalents ou bivalents à des concentrations différentes pouvait être bénéfique. Comme nous n'avions qu'une faible réponse de nos anticorps contre notre antigène immobilisé dans des micropuits, nous avons réalisé ces tests contre la pectine qui contient l'épitope reconnu par nos anticorps. Nous avons testé l'effet de cations monovalents sur la réponse de nos anticorps en maintenant la concentration en calcium constante à 1mN.

#### 3.3.8.1 effet d'un monovalent: le Na+

Nous avons progressivement augmenté la concentration en Na+ de 0 à 0,150 molaire. Nous avons constaté une chute importante de la réponse en présence de Na+ (Fig. 3.17).
Les interactions ioniques avec les polysaccharides pectiques sont complexes, il est possible que le NaCl ait un effet sur la conformation du polysaccharide et facilite son détachement du support, ou encore modifie la conformation de l'épitope reconnu par nos anticorps.

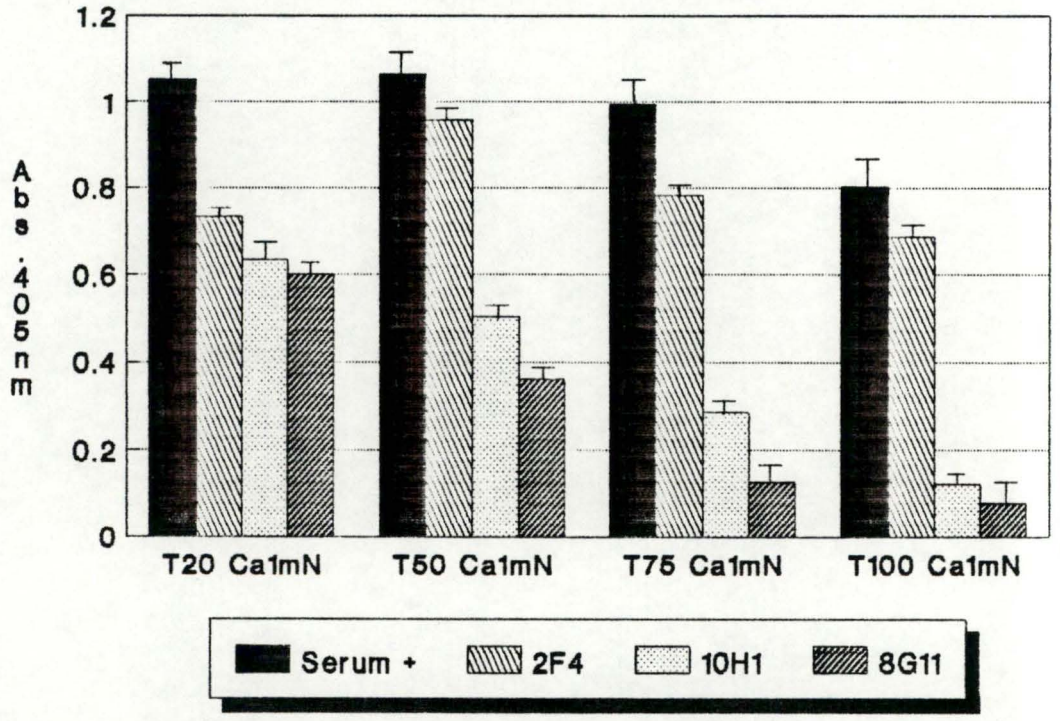



Valeurs des blancs soustraites: 0.109-0.098-0.094-0.098

Fig. 3.17 Effet de la concentration en Na+ sur la réponse de nos anticorps 10H1 et 8G11 contre la pectine déposée au fond des micropuits d'une plaque ELISA. Les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

### 3.3.8.2 effet d'un autre monovalent : le Tris

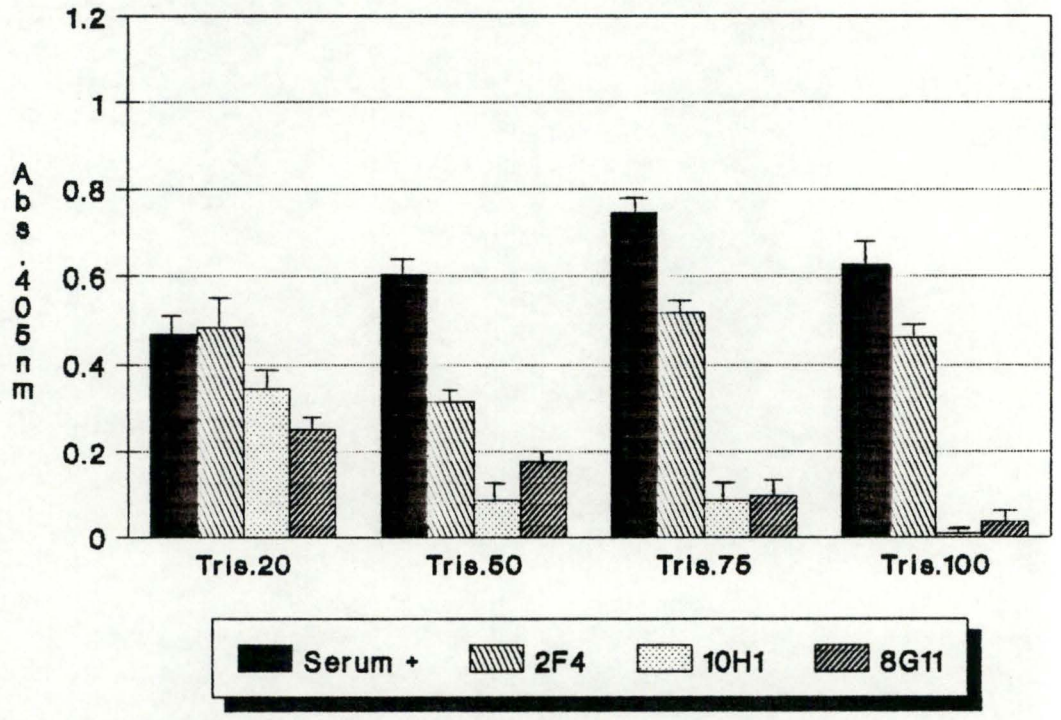
Comme pour le test précédent, nous sommes partis du Tris20mN/Ca1mN jusqu'au Tris100mN/Ca1mN. Nous avons observé progressivement une diminution de la réponse des anticorps 10H1 et 8G11 (Fig. 3.18). La reconnaissance obtenue est meilleure en en Tri20mN/Ca1mN, et diminue à mesure que la concentration en Tris augmente. Nous n'avons pas testé de concentration en Tris inférieure à 20mN pour conserver un pouvoir tampon minimum.




Valeurs des blancs soustraites: 0.157-0.124-0.129-0.112

Fig. 3.18 Effet de la concentration en Tris sur la réponse des anticorps 10H1 et 8G11. Ce test a été réalisé en présence de calcium à une concentration constante de 1mN.La meilleure réponse est obtenue en Tris20mN/Ca1mN Les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

Nous nous sommes interrogés sur la nécessité du calcium, c'est pourquoi le même test a été fait en absence de calcium. Nous avons constaté que sans le Ca++, la réponse des anticorps était pratiquement diminuée de moitié. On peut imaginer l'action du Ca++ pour l'accrochage de l'antigène au fond des puits, cependant cette action est peu probable puisque nous constatons une réponse constante du 2F4 alors que la réponse du sérum sur la même substance antigénique augmente.
Le calcium pourrait encore agir sur la conformation de l'antigène et permettre l'exposition de l'épitope à la surface de l'antigène, enfin il pourrait être utile à la conformation de l'anticorps en se fixant à un site spécifique de l'anticorps induisant un complexe de haute affinité pour l'antigène.

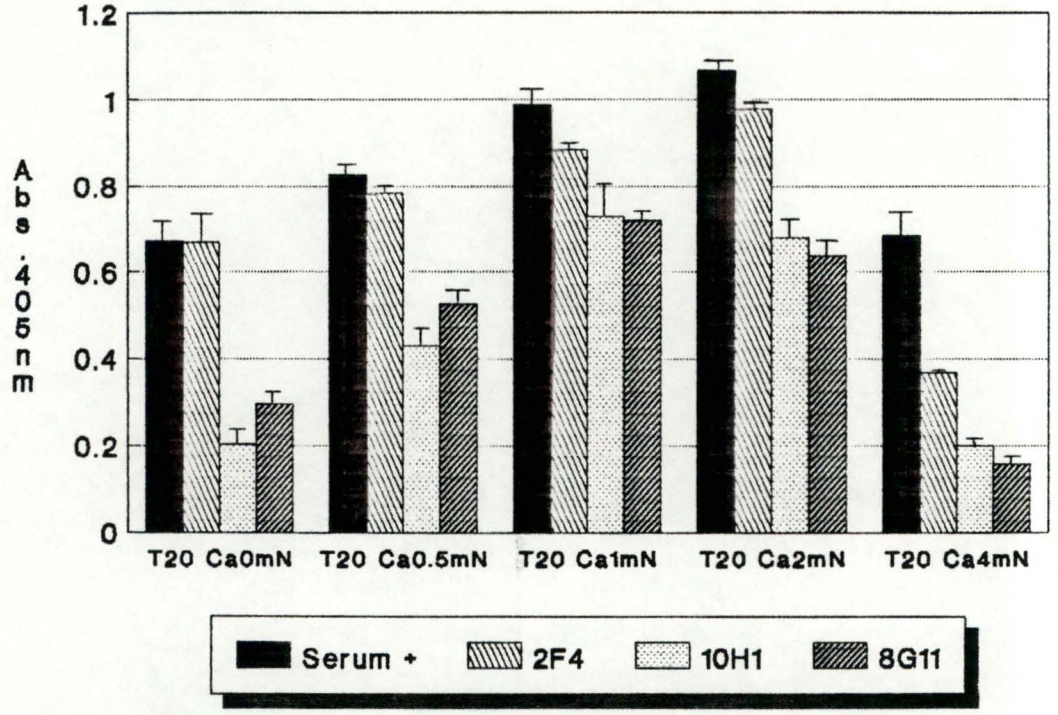



Valeurs des blancs soustraites: 0.14-0.135-0.126-0.144

Fig.3.19 Effet de la concentration du monovalent Tris en absence d'ions calcium sur la réponse des anticorps 10H1 et 8G11 contre la pectine immobilisée dans les micropuits. Les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

### 3.3.8.3 Effet de la concentration en Ca++

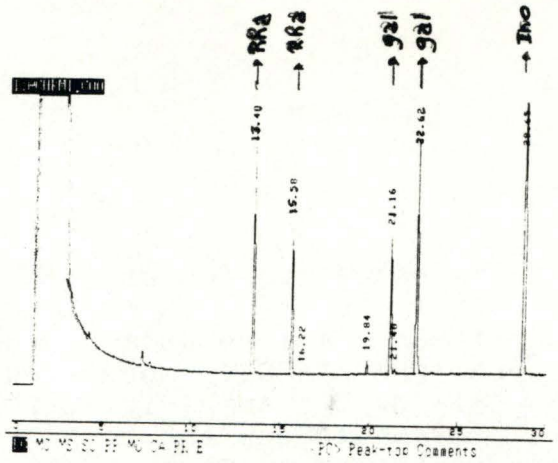
Nous savons donc que le Ca++ est nécessaire pour une réponse correcte des anticorps 10H1 et 8G11. Nous avons testé la contration optimale en Ca++ de 0 à 4mN (Fig. 3.20) : nous avons observé une réponse croissante des anticorps contre l'épitope parralèlement à l'augmentation en Ca++. La reconnaissance par les anticorps 10H1 et 8G11 atteint le maximum pour une concentration en Ca++ de 1mN et décroît une fois ce seuil dépassé.



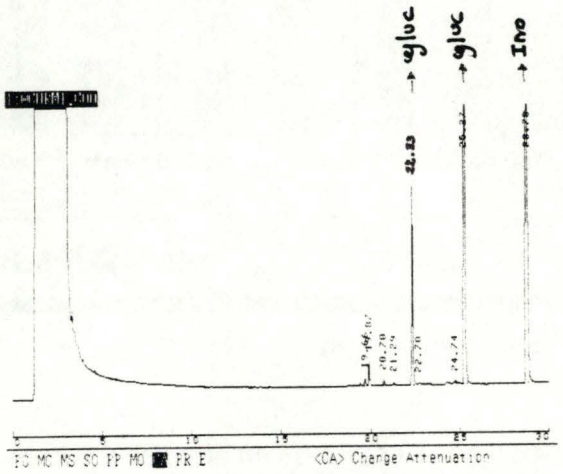

Valeurs des blancs soustraites: 0.139-0.137-0.129-0.131

Fig. 3.20 Effet de la concentration en calcium sur la réponse des anticorps 10H1 et 8G11 contre la pectine. Les moyennes ont été calculées sur 4 valeurs.

Nous avons donc déterminé les conditions ioniques optimales pour la réponse en ELISA des anticorps 10H1 et 8G11 contre l'épitope contenant du rhamnose et probablement quelques unités d'acides galacturoniques. Le tampon adéquat est le Tris20mN/Ca1mN pH:7.4 , les supports sont les boîtes PVC souples et la saturation optimale est obtenue avec la poudre de lait à 5% .




**Chromatogramme standard du rhamnose**
**et du galactose**



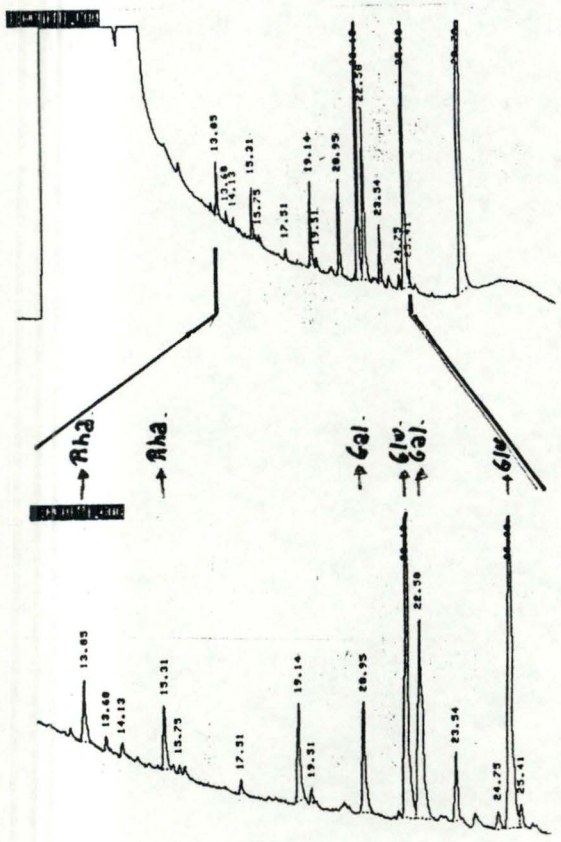

**Chromatogramme standard du glucose**

### 3.3.9 Analyse en chromatographie gazeuse de l'épitope reconnu par le monoclonal 10H1

Par les différents tests ELISA, nous avons montré la présence de rhamnose au moins dans les épitopes reconnus par le 8G11 et le 10H1. Nous avons réalisé une analyse plus fine d'un des deux épitopes au chromatographe en phase gazeuse. Nous avons inhibé l'anticorps 10H1 avec la pectine sigma, nous avons ensuite soumis les complexes anticorps-pectine à l'action d'une endoenzyme afin d'éliminer les groupes carboxyles non protégés par l'anticorps. Nous avons séparé l'anticorps de son épitope par précipitation des protéines au TFA, l'épitope a été hydrolysé en monomères, dérivatisé et analysé en chromatographie gazeuse.

Les pics principaux ont été identifiés par les standards de rhamnose, de galactose et de glucose.

Les monomères présents dans la fraction contenant l'épitope sont les suivants (Fig. 3.21):

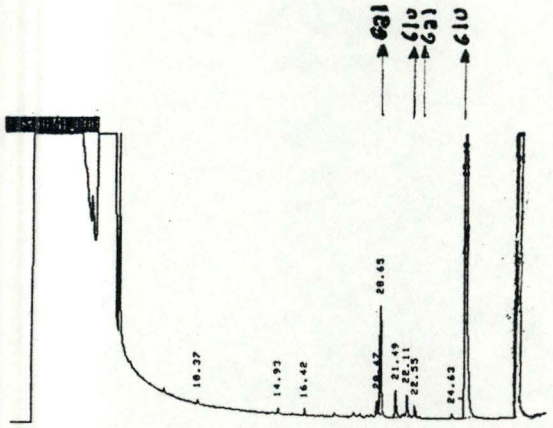



| | temps | surface |
|---|---|---|
| le rhamnose | 13.059 | 7956 |
| | 15.319 | 8269 |
| le galactose | 20.95 | 15670 |
| | 22.5 | 42810 |
| le glucose | 22.135 | 59583 |
| | 25.081 | 79157 |
| l'inositol | 28.735 | |

Fig. 3.21 chromatogramme par la méthode des triméthylsilyls de l'épitope reconnu par le monoclonal 10H1. Nous y avons détecté la présence de rhamnose, de galactose et de glucose.

Nous avons comparé cette analyse avec la composition des monomères constitutifs de l'anticorps 10H1,il se peut en effet que la précipitation n'ait pas été totale et que la fraction glycosyl de l'anticorps interfère avec nos résultats.

Les monomères constitufifs de l'anticorps sont les suivants (Fig. 3.22) :



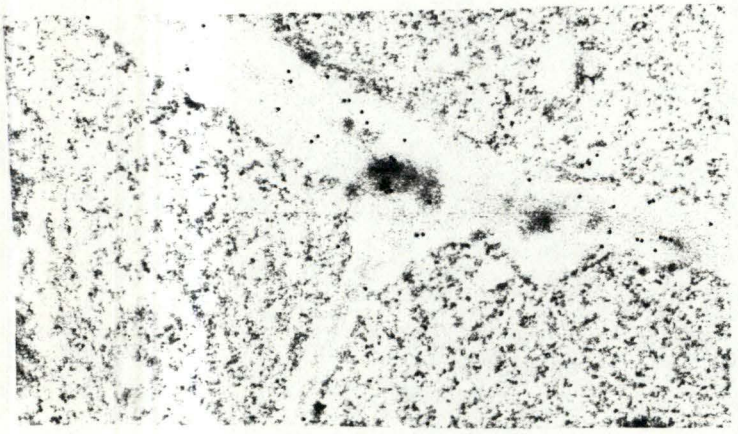

| | temps | surface |
|---|---|---|
| le galactose | 20.651 | 62197 |
| | 22.557 | 6067 |
| le glucose | 22.119 | 14748 |
| | 25.405 | 76757 |
| l'inositol | 28.45 | |

Fig. 3.22 analyse en chromatographie gazeuse par la méthode des tryméthylsilyls de la composition de l'anticorps 10H1

On constate que la différence principale entre ces deux chromatogrammes (fig. 3.21 et fig. 3.22) est la présence de rhamnose dans l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal. Cette information vient donc confirmer nos résultats précédents obtenus par les différents tests ELISA.

### 3.3.10 Marquage de coupes par la microscopie électronique

Un marquage sur des cellules de carottes a été réalisé avec l'anticorps monoclonal 10H1 dilué 40 fois dans le tampon Tris 20mN Ca1mN. Nous avons observé un marquage spécifique entre les cellules ainsi qu'aux jonctions intercellulaires. Cette localisation est toutefois différente de celle obtenue lors de marquages avec le 2F4. En effet, nous observons avec l'anticorps monoclonal 10H1 un marquage plus latéral des parois (fig. 3.23 et fig 3.24) tandis qu'avec le 2F4, la lamelle mitoyenne ainsi que les jonctions intercellulaires sont fortement marquées (fig 3.25). Ce premier résultat confirme le fait que nous disposons d'anticorps monoclonaux différents du 2F4.
De plus, le marquage a été réalisé sur des grilles déestérifiées et non déestérifiées. Nous n'observons pas avec l'anticorps 10H1 de différences importantes après l'étape de déestérification (fig 3.23 et fig 3.24). Cette observation est en accord avec nos nos précédents résultats et suggère que la fonction carboxylate des galacturonates ne fait pas partie de l'épitope reconnu par le 10H1. Nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenu lors des marquages du 2F4 sur le même matériel cellulaire. Dans ce cas, on observe un nette différence dans le marquage de la paroi avant et après la déesterification (fig 3.25a et b) (Résultats non publiés de F.Liners communication personnelle).



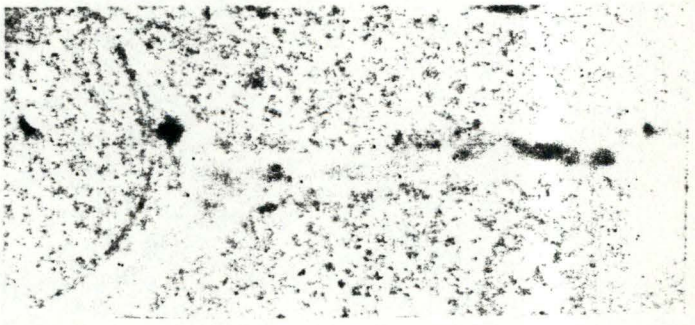
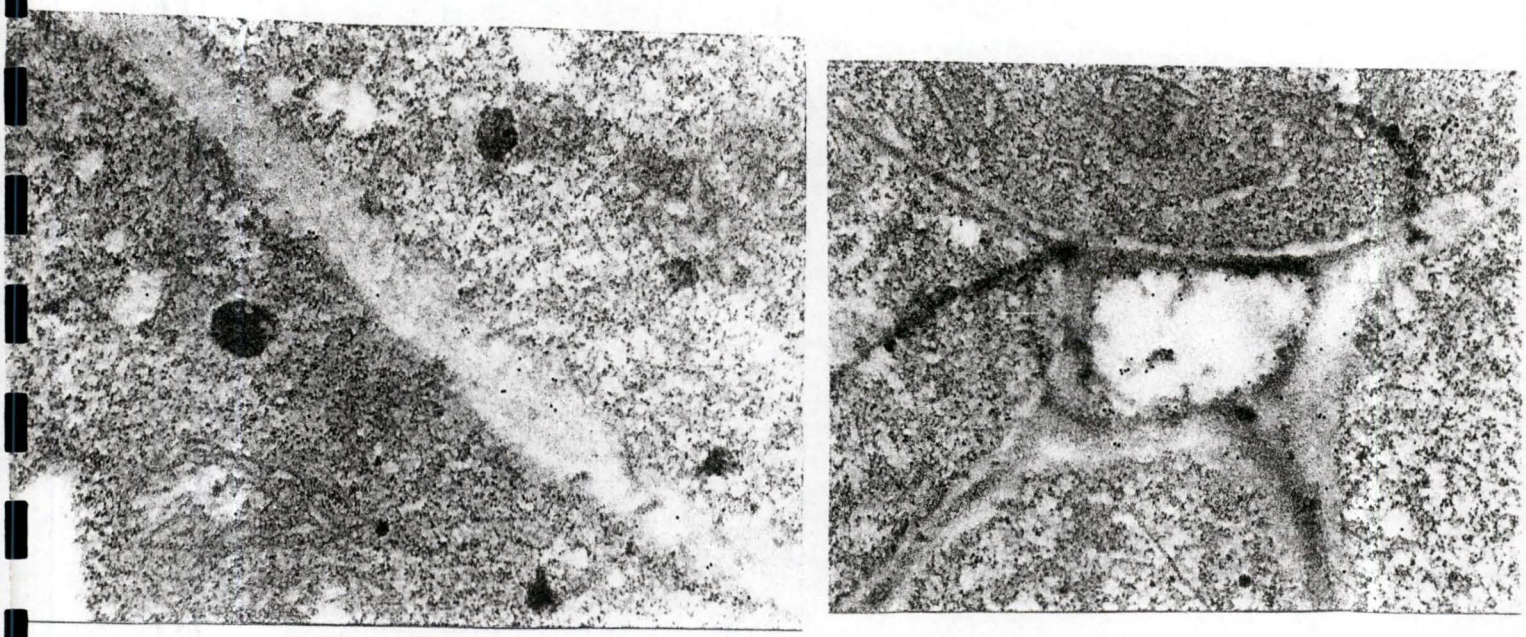
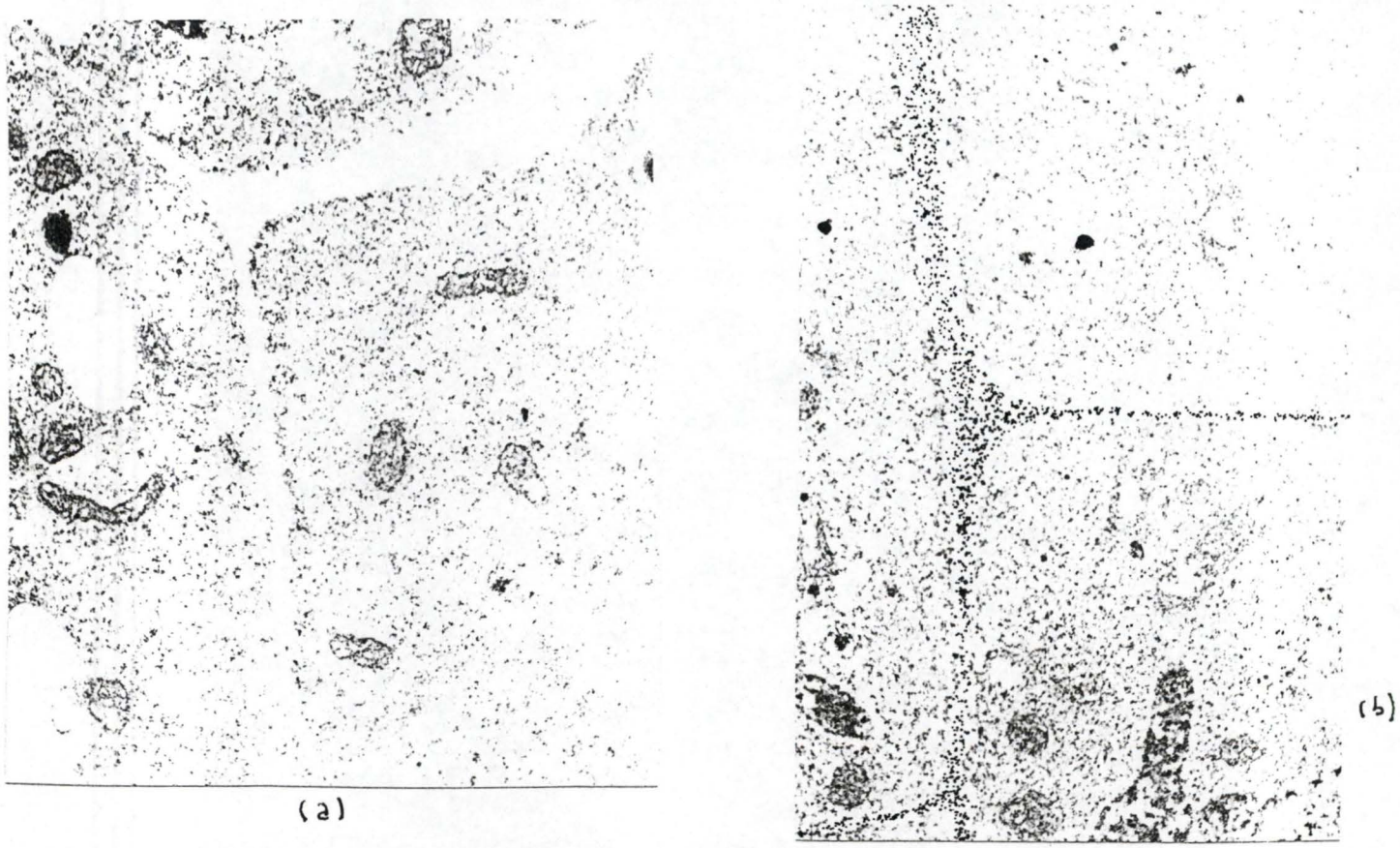


Fig. 3.23 Marquage électronique sur des cellule de méristèmes de carottes par le 10H1 avant l'étape de déestérification. On observe un marquage spécifique au niveau de la paroi ainsi qu'au niveau des jonctions intercellulaires. Grossissement 4200fois



(a) (b)

Fig. 3.24 Marquage sur des cellules de méristèmes de carottes par le 10H1 après la déestérification. On observe un marquage au niveau de la paroi (a) ainsi qu'aux jonctions intercellulaires (b). Grossissement: 4200 fois



(a) (b)

Fig 3.25 Marquage de cellules de méristèmes de carottes par le 2F4 avant la déestérification (a) et après l'étape de déestérification (b). Grossissement: 2600 fois

# 4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au laboratoire, nous disposons d'un anticorps monoclonal anti-pectine acide (le 2F4) dirigé contre les motifs homogalacturoniques qui permet de localiser et de quantifier les zones pectiques lisses (Liners,1988). Il était intéressant d'obtenir un outil complémentaire au 2F4 : un anticorps dirigé contre le rhamnose lié aux acides galacturoniques et souvent porteur de chaînes d'oses neutres constituant ainsi les zones pectiques hérissées. Cet anticorps serait particulièrement utile afin de localiser et de quantifier le rhamnose par rapport aux séquences homopolygalacturoniques. Pour ce faire, nous avons isolé des fragments pectiques par chromatographie échangeuse d'anions, l'analyse en chromatographie gazeuse nous a révélé que notre antigène contenait bien du rhamnose.
Nous avons ensuite suivi les procédures d'immunisation,de fusion, et de criblage des anticorps monoclonaux qui nous ont permis d'obtenir deux anticorps d'isotypie différente: une IgG1, le 8G11, et une IgG2b, le 10H1. Les différentes techniques utilisées pour la caractérisation de l'épitope étaient: les tests ELISA adaptés à nos monoclonaux, et la chromatographie en phase gazeuse.

Les résultats des tests ELISA à savoir : la non inhibition des anticorps 10H1 et 8G11 par un fragment homopolygalacturonique de DP égal à neuf, la reconnaissance par nos anticorps 10H1 et 8G11 d'un épitope commun à l'antigène pectique et à la pectine sigma, la mise en évidence de la réassociation intermoléculaire des chaînes pectiques par le calcium et la disparition de cette réassociation dès l'action d'une enzyme pectate lyase rongant les unités d'acides galacturoniques non protégées par l'anticorps, nous ont permis de conclure que l'épitope reconnu contient bien du rhamnose. Par la chromatographie en phase gazeuse, nous avons confirmé la présence de rhamnose dans l'épitope protégé par l'anticorps monoclonal 10H1. Enfin, un marquage en microscopie électronique par le 10H1 sur des cellules de carotte déesterifiées et non déesterifiées nous a montré d'une part que l'étape de déesterification ne modifiait pas fortement l'intensité du marquage et d'autre part une localisation spécifique de nos anticorps au niveau de la paroi, différente toutefois de celle obtenue avec le 2F4. Ces résultats sont en accord avec les informations déjà obtenues par les tests ELISA.

Pour préciser la nature des épitopes reconnus, il faudrait dans un premier temps, par un test ELISA sur la pectine méthylésterifiée, vérifier si ces derniers comprennent, en plus du rhamnose, des unités d'acides galacturoniques. Ensuite, il serait possible d'utiliser ces anticorps dans des chromatographies d'affinité afin d'isoler les fragments pectiques, et les analyser par des techniques physico-chimiques telles la GC-MS ou la RMN.

Il serait intéressant d'exploiter la haute spécificité de ces anticorps monoclonaux pour des marquages électroniques complémentaires à ceux réalisés avec les anticorps déjà disponibles. Ces marquages pourraient être faits sur des cellules à différents stades de développement et ainsi approfondir les connaissances quant à la synthèse, la sécrétion, la localisation et le turnover des pectines.

En technologie des glucides, plus particulièrement dans l'étude des propriétés industrielles des pectines, cet anticorps qui reconnait le rhamnose porteur de chaînes latérales d'oses neutres permettrait, conjointement à l'anticorps 2F4 dirigé contre des régions lisses, de caractériser rapidement des pectines extraites de différentes origines. De plus, cet anticorps servirait aussi à étudier la co-distibution du rhamnose et des séquences homopolygalacturoniques ou bien encore à estimer les teneurs en rhamnose dans différentes pectines.

# 5 BIBLIOGRAPHIE


- Albersheim P. and A. Darvill (1985)
  Les oligosaccharines
  Pour la science 11 : 18-26

- Albersheim P. and A Darvill (1990)
  The commercial potential of plants cell walls
  polysaccharides and oligosaccharins.
  Biological science 8 : 180-193

- Alberts B.,D.Bray,J.Lewis,M.Raff,K.Roberts et J.Watson (1986)
  In Biologie moléculaire de la cellule,p.1102
  Flammarion Médecine Sciences

- Azamizu T.,N.Nakayama,A.Nishi (1984)
  Pectic polysaccharides in carrot cells growing
  in suspension culture
  Planta 160 : 469-473

- Bacic A.,Harris PJ and Stone B.A (1988)
  Structure and function of the plant cell walls
  The Biochemistry of plant 14 : 297-305

- Brett C and J Hillman (1985)
  Biochemistry of plant cell walls p. 39-41

- Brett and Waldron (1990)
  Physiology and biochemistry of plant cell walls
  Cell wall structure and the skeletal function
  of the wall 2 : 22-25

- Blumenkrantz N.,G Asboe,Hansen (1973)
  New method for quantitative determination of
  uronic acids
  Analytical biochemistry 54 : 484-489

- Cartier N.,G.Chambat et J.P Joseleau (1987)
  An arabinogalactan from the culture medium of
  Rubus fructicosus cells in suspension
  Carbohydrate Research 168 : 275-283

- Chambat G.,F.Barnoud et J.P Joseleau (1984)
Structure of the primary cell walls of suspension cultured Rosa glauca cells
Plant physiology 74 : 687-683

- Darvill A.G.,McNeil M.,Albersheim P (1978)
Structure of Plant Cell Walls
A new pectic polysaccharide
Plant Physiology 62 : 418-422

- Depelchin A (1987)
Les anticorps monoclonaux, p. 158-161
Immunologie fondamentale

- Dubois M.,K.A Gilles,JK.Hamilton,P.A Rebers et F.Smith (1956)
Colorimetric method for determination of sugars and related subtances
Analytical chemistry 28 : 350-356

- French.D,E.Fischberg,S.Buhl et M.D Scharff (1986)
The production of more useful monoclonal antibodies
Immunology Today 7 : 344-346

- Fry.S (1988)
The growing plant cell wall : chemical and metabolic analysis
Longman scientific-technical

- Knox JP et K.Roberts (1989)
Carbohydrate antigens and lectins receptors of the plasma membrane of carrot cells
Protoplasma 152 : 123-129

- Knox JP,P.Linstead,J.King,C.Cooper,K.Roberts (1990)
Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices
Planta 181 : 512-521

- Kohn R.,Luknar O (1977)
Intermolecular calcium ion binding on polyuronates polygalacturonate and polyguluronate
Collection Czechoslov. Chem.Communication 42 : 731-743

- Konno H.,Yamasaki Y,Katoh K (1986)
Enzymatic degradation of pectic substances and cell walls purified from carrot cell cultures
Phytochemistry 25 : 623-627

- Liners F (1988)
Production et caractérisation d'anticorps poly-monoclonaux contre l'acide $\alpha$-1,4- homopolygalacturonique
Mémoire de seconde Licence en Sciences Biologique, FUNDP

- Liners F,J.J Letesson, C.Didembourg et P.Van Cutsem (1989)
Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium
Plant physiol. 91 : 1419-1424

- McNeil M.,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

- McNeil M.,A.G.Darvill,P.Albersheim (1979)
The strustural polymers of the primary cell walls of dicots
In Progress in the chemistry of organic natural products, ed.W..Heiz,H.Grisebach,G.W Kirby 37 : 191-249
Vienna/New-York : Springer-Verlag 367pp

- Massiot P.,X.Rouau,J.F.Thibault (1988)
Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of carrot
Carbohydrate Research 172 : 229-242

- Massiot P and J.F Thibault (1989)
Enzymatic analysis of carrot cell-wall polysaccharides
Carbohydrate Research 190 : 121-136

- Massiot P.,X.Rouau,J.F.Thibault (1987)
Characterisation of cell-wall polysaccharides of carrot
Food hydrocolloids 1 : 541-544

- May D.C (1990)
industrial pectins : Sources, production and application
Carbohydrates polymers 12 : 79-99

- Morvan O,A.Jauneau,C.Morvan,H.Voreux,M.Dermorty
Biosynthèse des pectines et différenciation des fibres cellulosiques au cours de la croissance du lin
Can.J.Bot. 67 : 135-139

- Muratmatsu T (1989)
Les sucres de la membrane cellulaire
La recherche 210 : 625-634

- Naulaers (1990)
Les anticorps monoclonaux
Le journal du médecin 506 : 13-24

- Perpete P (1990)
Stratégie de couplage de polysaccharides pectiques en vue de la production d'anticorps monoclonaux.
Mémoire de seconde Licence en Sciences Biologiques,FUNDP

- Roitt I,J.Brostoff,D.Male(1985)
Analyses immunochimiques p.25.7
Immunologie fondamentale et appliquée
Médecine et Sciences Internationales

- Sasaky K.,Nagahashi G
Autolysis-like release pectic polysaccharides from the regions of cell walls other than the middle lamella
Plant cell physiol. 30 : 1159-1169

- Saulnier (1987)
Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin
Thèse à l'université P.Sabatier

- Shols H.A,C.J.M C Geraeds,M.F.Searle-van Leeuwen,F.J.M Kormelink et A.G.J Voragen
Rhamogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins

- Stoddart R.W,Barrett A and D.H.Northcote (1966)
Pectic polysaccharides of growing plant tissues
Biochem.J 102 : 194-204

- Thomas J.E (1988)
The use of ELISA to detect viruses of crop plants
Animal and plants sciences 137-142

- Tyssen P (1985)
In Practice and theory of enzyme immunoassays.
Vol.15:laboratory techniques in biochemistry and molecular biology
Ed.by R.H Burdon and P.H. Van Knippenberg,Elsevier

- Vreeland V.,M.Slomich and W.M.Laetsch (1984)
Monoclonal antibodies as molecular probes for cell wall antigens of the brown alga, Fucus
Planta 162 : 506-517

- Vreeland S.,S.R.Morse,R.H.Robichaux,K.L.Miller,S.T.Hua and W.M.Laetsch (1989)
Pectate distribution and esterification in Dubautia leaves and soybean nodules, studied with a fluorescent hybridation probe.
Planta 177 : 435-446

- Weissbach (1986)
Plant molecular biology
Methods in enzymology 118 : 3-9