



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre une xylane du surnageant de culture en suspension de *Silene alba*

Messiaen, Johan

Award date:
1989

[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.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

Faculté des Sciences

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

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

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre une xylane du surnageant de culture de cellules en suspension de *Silene alba*.

Johan Messiaen

Résumé.

Nous avons isolé une hémicellulose de type xylane du surnageant de culture de *Silene alba* contre laquelle nous avons produit un anticorps monoclonal d'isotypie IgM (clone 6G3).

Un test ELISA a été mis au point pour optimiser les réponses de cet anticorps monoclonal.

Par hydrolyse enzymatique partielle à l'hémicellulase, différentes fractions oligosaccharidiques reconnues par l'anticorps monoclonal ont été isolées. Ces fractions correspondent à des oligomères ayant un degré de polymérisation entre 2 et 4 et une composition en oses neutres où glucose et galactose sont majoritaires et présents dans des rapports compris entre 1,2 et 1,6.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1989

Laboratoire de Biotechnologie Théorique

Promoteur : P. Van Cutsem

Remerciements.

Je remercie Monsieur le Professeur Van Cutsem pour l'accueil dans son laboratoire et pour les conseils judicieux qu'il m'a donné durant ce travail.

Je tiens également à remercier plus particulièrement tous les membres du laboratoire de Biotechnologie Théorique et d'Immunologie pour leur bonne collaboration.

Je remercie plus particulièrement Monsieur Christian Didembourg pour la réalisation des fusions et l'entretien des clones.

Finalement, je m'en voudrai d'oublier mes parents pour leur soutien moral tout au long de ce travail.

1. Introduction.

1.1.- La paroi végétale.....	1
1.1.1.- Structure, rôle et composition.....	1
1.1.2.- Les polysaccharides	1
1.1.2.1.- La cellulose.....	1
1.1.2.2.- Les pectines.....	2
1.1.2.3.- Les hémicelluloses.....	3
1.1.2.3.1.- Composition chimique.....	3
a. les xyloglucanes.....	3
b. les xylanes.....	4
1- les glucuronoxylanes.....	5
2- les glucuronoarabinoxylanes.....	5
3- les arabinoxylanes.....	5
c. les β -glucanes.....	5
d. les galactoglucomannanes.....	6
e. les arabinogalactanes.....	6
1.1.2.3.2.- Les hémicelluloses et l'architecture pariétale.....	6
1.1.2.3.3.- Les hémicelluloses et la physiologie pariétale.....	8
1.1.2.3.4.- Synthèse des polysaccharides.....	9
1.2.- Etude des polysaccharides pariétaux.....	10
1.2.1.- Sources de polysaccharides.....	10
1.2.2.- Méthodes d'analyse classique des polysaccharides.....	10
1.2.3.- Identification et localisation ultrastructurales des polysaccharides.....	12
1.2.3.1.- La cytochimie classique des polysaccharides.....	12
1.2.3.2.- Les lectines.....	12
1.2.3.3.- Enzymes couplées à l'or colloïdal.....	13
1.2.4.- Utilisation d'anticorps.....	13
1.3.- But du travail.....	14

2. Matériels et méthodes.

2.1.- Culture en suspension de cellules de <i>Silene alba</i>.....	15
2.1.1.- Mode de culture.....	15
2.1.2.- Mode de repiquage.....	15
2.1.3.- Composition du milieu de culture.....	15
2.2.- Purification et caractérisation des polysaccharides.....	16
2.2.1.- Protocole de purification.....	16
2.2.2.- Etude chimique et enzymatique.....	17
2.2.2.1.- Dosage des protéines par la méthode de Folin.....	17
2.2.2.2.- Dosage des sucres neutres.....	17
2.2.2.3.- Dosage des sucres réducteurs.....	18
2.2.2.4.- Dosage des acides uroniques.....	18
2.2.2.5.- Dosage qualitatif et étude enzymatique par chromatographie en couche mince.....	19
2.2.2.6.- Analyse chimique du polysaccharide en chromatographie en phase gazeuse.....	20
2.3.- Production d'anticorps monoclonaux (AcMo).....	23
2.3.1.- Immunisation des souris.....	23
2.3.2.- Dot-blot sur nitrocellulose.....	23
2.3.3.- Fusion et obtention des hybridomes.....	24
2.3.3.1.- Principe et technique de fusion.....	24
2.3.3.2.- Animal et myélome utilisés.....	24
2.3.3.3.- Les milieux de culture.....	24
2.3.4.- Criblage des hybridomes.....	25
2.3.4.1.- Principe.....	25
2.3.4.2.- Technique ELISA.....	25
2.3.4.3.- Protocole expérimental.....	27
2.3.5.- Détermination de l'isotypie.....	28
2.3.5.1.- Principe.....	28
2.3.5.2.- Protocole expérimental.....	28
2.3.6.- Production de l'ascite.....	29
2.3.7.- Hydrolyse des ascites à la trypsine.....	29
2.4.- Contribution à l'identification de l'épitope reconnu par l'AcMo.....	30
2.4.1.- Digestion enzymatique.....	30
2.4.2.- Etude des produits d'hydrolyse.....	30

3.-Résultats et discussions.

3.1.- Purification des polysaccharides.....	32
3.2.- Analyse des polysérums.....	35
3.3.- Analyse sommaire de la composition glycosidique du polysaccharide Fa.....	36
3.3.1.- Dosage des sucres neutres.....	36
3.3.2.- Dosage des acides uroniques.....	36
3.3.3.- Dosage des sucres réducteurs.....	36
3.3.4.- Chromatographie sur couche mince.....	36
- Hydrolyse au TFA.....	36
- Sensibilité aux enzymes.....	37
3.3.5.- Chromatographie en phase gazeuse.....	37
3.4.- Le criblage.....	39
- Dot-blot sur nitrocellulose avec l'AcMo.....	39
- Détermination de l'isotypie.....	39
3.5.- Mise au point d'un test ELISA pour optimaliser les réponses du 6G3.....	40
3.5.1.- Effet du type de plaque de microtitration.....	40
3.5.2.- Effet de la protéine de saturation.....	41
3.5.3.- Effet de la poly-L-lysine.....	42
3.5.4.- Effet de la composition ionique du tampon de lavage.....	44
3.5.5.- Influence du nombre de lavage.....	46
3.5.6.- Variation de la concentration en antigène.....	47
3.5.7.- Dilution du 6G3.....	48
3.6.- Production des ascites.....	49
3.7.- Hydrolyse des IgM.....	49
3.8.- Contribution à l'identification de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal.....	52
3.8.1.- Chromatographie sur Bio-Gel P6 de la fraction polysaccharidique totale éluée de la colonne de Séphadex DEAE A-50.....	52
3.8.2.- Hydrolyse enzymatique.....	54
A.- Digestion à la pectinase.....	54
B. - Digestion à l'hémicellulase.....	56
3.8.3.- Détermination du degré de polymérisation approximatif de l'épitope.....	64
3.9.- Discussion générale.....	66

INTRODUCTION.

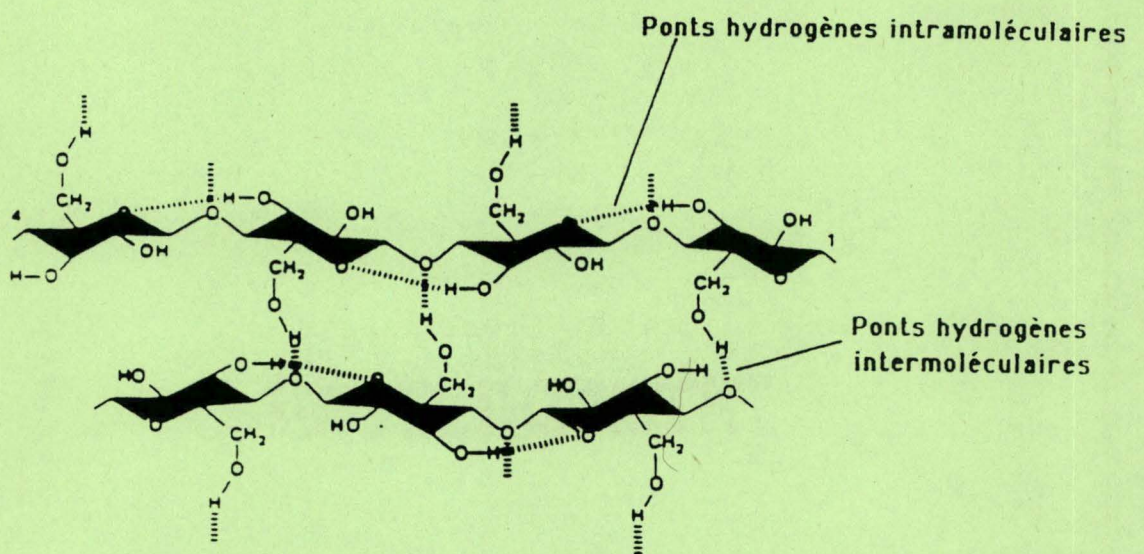


Fig. 1: Structure de la cellulose montrant les ponts hydrogènes inter-et intramoléculaires (55).

1.1.- La paroi végétale.

1.1.1.- Structure, rôle et composition de la paroi.

Un végétal est un édifice relativement rigide, destiné à capter l'énergie solaire pour alimenter la photosynthèse. Cette rigidité est due à la présence, autour du plasmalemme, d'une paroi cellulaire. Parmi les rôles de cette paroi, on peut citer:

- Résistance mécanique pour empêcher l'éclatement des cellules sous l'action de la pression de turgescence (1).
- Ensemble d'informations chimiques et rôle possible dans la régulation hormonale (2).
- Barrière contre l'attaque de pathogènes (3,4).

Cette paroi est subdivisée en paroi primaire et paroi secondaire. La paroi primaire est caractéristique des cellules en croissance et la paroi secondaire se dépose quand la cellule ne manifeste plus d'activité de croissance. Ces deux parois ont des propriétés physiques et chimiques différentes. La paroi primaire est une structure dynamique alors que la paroi secondaire est une structure mécaniquement statique définissant la taille et la forme d'une cellule mature (1).

Sur le plan de la composition chimique, la paroi primaire est composée de microfibrilles de cellulose enchassées dans une matrice amorphe de polysaccharides et de glycoprotéines (90 et 10 % respectivement dans une paroi primaire) (3). Dans la paroi secondaire, la composante cellulosique est dominante et on peut y observer de la lignification (1).

1.1.2.- Les polysaccharides.

1.1.2.1.- La cellulose.

Il s'agit d'un polysaccharide résultant d'une polymérisation β -1,4- de D-glucose (fig.1). Ces chaînes de glucose s'associent par ponts hydrogènes pour former des microfibrilles. On peut distinguer différentes celluloses essentiellement par leur degré de polymérisation et leur état plus ou moins cristallin. Le degré de polymérisation est de 14000 dans la paroi secondaire alors que dans la paroi primaire le degré de polymérisation varie entre 500 et 2500 -4500. Le degré de cristallinité est également supérieur dans la paroi secondaire (3). Les microfibrilles de cellulose y sont disposées parallèlement les unes aux autres et reliées par des ponts hydrogènes.

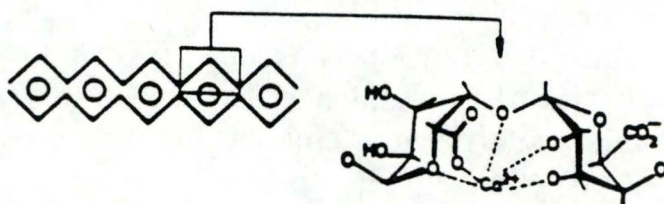


Fig. 2: Schéma présumé d'association des polyuronates avec le Ca^{2+} . A gauche, les chaînes de polyuronates sont représentées par une ligne brisée et les ions Ca^{2+} par des cercles. A droite, représentation détaillée de la coordination possible d'un cation par une chaîne (54).

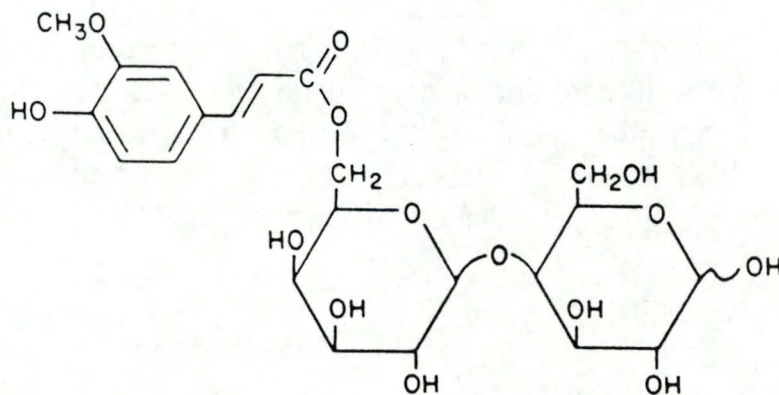


Fig. 3 : Exemple de substitution d'un disaccharide par un ester feruloyl (3).

1.1.2.2.- Les pectines.

Les pectines comprennent essentiellement le rhamnogalacturonane I, un polymère dont la chaîne principale résulte d'une polymérisation α -1,4-d'acide D-galacturonique interrompue par des α -L-rhamno-pyranosyle (26). La moitié des résidus rhamnosés servent de point de branchement de chaînes latérales composées d'arabinoses terminaux et galactoses en liaison 4 ou 6 (27) et du D-xylose et L-fucose.

Des études enzymatiques ont révélé que les chaînes latérales sont localisées sur une longueur de chaîne qui ne correspond qu'à une très petite fraction de la chaîne complète.

On distingue des régions 'smooth' (lisses, homopolygalacturoniques) qui représentent environ 90 % de la chaîne, caractérisées par un degré d'estérification de 70 %; et des régions 'hairy' (hérissées, hétéropolygalacturoniques) où le degré d'estérification est proche de 100 % (28).

Les régions homopolygalacturoniques des pectines sont capables de former des associations coopératives en présence de cations Ca^{2+} formant ainsi des jonctions intermoléculaires. Ces jonctions définissent l'état de gel calcique (fig. 2). Si la pectine est estérifiée, cette structure sera moins stable et s'il y a des chaînes latérales, l'association coopérative est impossible (29). Les chaînes latérales des pectines contiennent des groupements feruloyls (fig. 3) (26). Les groupements feruloyls sont présents au niveau des résidus terminaux non réducteurs d'arabinopyranose et galactopyranose. Ces sites sont très exposés aux peroxydases de la paroi qui peuvent catalyser par couplage oxydatif la liaison des molécules de pectines entre elles par des ponts diferulates (30). Ce phénomène aurait pour effet un renforcement de la rigidité de la paroi. On observe en effet une corrélation négative entre le taux de croissance des cellules et l'activité peroxydasique. Il se pourrait également que les acides feruliques servent de point d'ancrage pour la polymérisation d'alcool hydroxycinamique en lignine.

Moins connu, parce que moins abondant dans la paroi, le rhamnogalacturonane II (3) appartient également à la famille des pectines. Ce polysaccharide est surtout caractérisé par une composition en sucre atypique : 2-O-méthylfucose, 2-O-méthylxylose, apiose, 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose, acide 3-C-deoxy-manno octulosonique. Ce polysaccharide est extrait de la paroi suite à un traitement à l'endo- α -1,4-galacturonase. Il s'agit d'un polymère de taille relativement constante d'un degré de polymérisation compris entre 25 et 50.

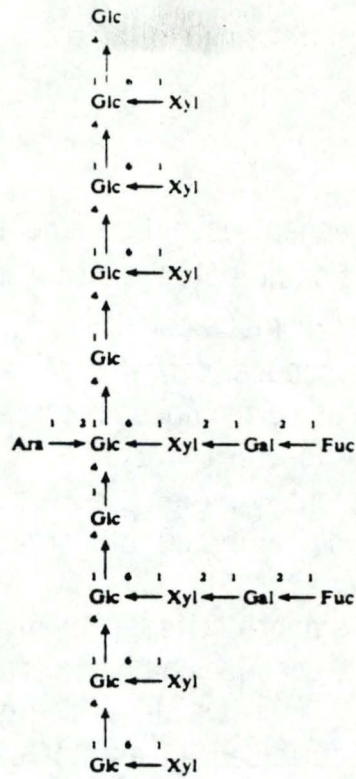


Fig.4 : Structure probable d'une portion de xyloglucane (7).

1.1.2.3.- Les hémicelluloses.

1.1.2.3.1.- Composition chimique.

Sous le terme d'hémicelluloses, on regroupe généralement les polysaccharides pariétaux qui ne sont ni de la pectine, ni de la cellulose. Ce sont des polysaccharides qui le plus souvent sont extraits de la paroi au moyen de solutions alcalines à basse température (6). La famille des hémicelluloses regroupe divers polymères qui diffèrent par leur structure et par leur composition. On retrouve dans cette famille:

- les xyloglucanes (7,8)
- les xylanes (7) comprenant
 - les glucuronoxylanes (9)
 - les glucuronoarabinoxylanes (10)
 - les arabinoxylanes (11)
- les β -glucanes (7,12)
- les arabinogalactanes (13)
- les galactoglucomannanes (21)

a. Les xyloglucanes.

En 1969, Aspinall et al. (15) démontraient pour la première fois la présence de xyloglucanes dans une culture en suspension d' *Acer pseudoplatanus* . En 1979, McNeil et al. (7) isolèrent la même xyloglucane directement à partir de la paroi de la même espèce . Les xyloglucanes sont aussi bien présentes chez les dicotylées que chez les monocotylées. Ce sont des polymères branchés dont la chaîne principale résulte d'une polymérisation β -1,4- de D-glucose.

Chez *Phaseolus aureus* , 75 % des résidus glucoses sont branchés en C₆ par du α -D-xylopyranose, L-fucopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- α -D-xylopyranosyl et β -D-galactopyranosyl-(1-2)- α -D xylopyranosyl (8) (fig. 4).

Chez l'avoine, on retrouve la répétition Xyl- (1,6)- Glc-(1,4) - Glc et Xyl- (1,6)- Glc (1,4) -(Xyl-(1,6))- Glc (1,4)- Glc (8).

Dans l'endosperme de riz, en plus de la répétition précédente, on relève une deuxième séquence répétée: β -D- Gal (1,2)- D-Xyl- (1,6)- β -D-Glc-(D-Xyl-(1,6))- β -D-Glc-(1,4)-(D-Xyl-(1,6))- β -D-Glc-(1,4)-D-Glc (8).

En résumé, on peut dire que 30 à 40 % des résidus glucoses de la chaîne principale sont substitués en C₆ par du xylose (8)

Glycosyl Residue	Tamarindus ^a	Nasturtium ^b	Rape Seed I ^c	Rape Seed II ^d	BEPS ^e	REPS ^f	SEPS ^g	Sycamore ^h cell wall
Glucose	48	55	64	48	46	51	46	31
Xylose	36	27	24	34	36	30	37	36
Galactose	16	18	12	10	10	10	7	14
Fucose	0	0	0	7	8	7	6	7

^a Isolated from *Tamarindus indica* seeds (41, 79).

^b Isolated from nasturtium (*Tropaeolum majus*) seeds (41, 67).

^c Isolated from *Brassica campestris* seeds (115).

^d Isolated from *Brassica campestris* seeds (21, 119).

^e BEPS = Bean extracellular polysaccharides. Isolated from the medium of suspension-cultured true bean (*Phaseolus vulgaris*) cells (calculated from data presented in ref. 133).

^f REPS = Rose extracellular polysaccharides. Isolated from the medium of suspension-cultured Rose (*Rosa glauca*) cells (29).

^g SEPS = Sycamore extracellular polysaccharides. Isolated from the medium of suspension-cultured (*Acer pseudoplatanus*) cells (24, 31).

^h Isolated from the cell walls of suspension-cultured sycamore *Acer pseudoplatanus* (calculated from the data presented in ref. 31).

ⁱ For these sources of xyloglucan or amyloids, the glucosyl, galactosyl and xylosyl residues were shown to be in the D-configuration.

^j This preparation is known to be contaminated with pectic polysaccharides.

Fig. 5: Composition en oses neutres de différents xyloglucanes (7).

Chez *Acer pseudoplatanus*, on trouve des xyloglucanes dont la composition typique est donnée à la figure 5 (7). Par rapport aux monocotylées, la structure et la composition des xyloglucanes sont quasi identiques, bien que 50 % des xyloglucanes, chez le sycomore, sont dépourvues de fucose. Quand il est présent, le fucose se trouve toujours en position terminale sur le C₂ d'un résidu glucose. On admet généralement l'hypothèse que toutes les xyloglucanes sont synthétisées tout en contenant du fucose mais qu'*in situ*, certaines molécules perdraient ce fucose durant des processus de maturation au sein de la paroi (7). Le poids moléculaire des xyloglucanes d'*Acer pseudoplatanus* est estimé à 7600, soit environ 50 monomères (7).

Chez les dicotylées, les xyloglucanes constituent avec les polymères pectiques une proportion importante des polysaccharides pariétaux.

Chez les monocotylées, par contre, la paroi est pauvre en polymères pectiques, mais subit un enrichissement hémicellulosique surtout en β -glucanes et glucuronoarabinoxylanes (16).

Les xyloglucanes de monocotylées ne sont solubles que dans des solutions alcalines, alors que celles provenant des dicotylées sont solubles dans l'eau (8). Cette différence de solubilité est liée à la différence de taille des chaînes latérales qui sont plus courtes dans le premier cas. Parmi les xyloglucanes, celles des graminées sont les plus simples, les moins branchées et elles sont dépourvues de fucose et de galactose (17).

On signale également une certaine hétérogénéité dans la composition des xyloglucanes (15). Cette hétérogénéité dans la composition macromoléculaire est une caractéristique générale des polysaccharides pariétaux pas seulement entre différents tissus mais également au sein d'un même organe.

b. Les xylanes.

Les xylanes sont des polysaccharides résultant d'une polymérisation β -1,4- de D-xylose. Les xylanes sont fortement liées à la cellulose (18). Ce sont des polysaccharides particulièrement abondants chez les monocotylées (3) et dans la paroi secondaire des espèces dicotylées (7).

La distinction faite entre les différentes xylanes provenant d'espèces différentes se base essentiellement sur la nature et le mode de liaison des chaînes latérales.

Une manière élégante de distinguer les xylanes des xyloglucanes est une digestion avec la "driselase" (Sigma) qui se base sur le fait que l' α -xylose est propre aux xyloglucanes tandis que le β -xylose

se retrouve dans les xylanes. La digestion enzymatique donne des produits différents suivant la nature du polymère et facilement séparables par simple chromatographie sur papier (40).

On distingue :

-1. Les glucuronoxylanes.

Ce sont des polysaccharides hémicellulosiques très abondants dans la paroi secondaire chez les espèces ligneuses (9).

Certains résidus xyloses de la chaîne centrale sont substitués en C₂ par de l'acide 4-O-méthyl-glucuronique et ce, tous les 7 à 10 résidus de xylose en moyenne. Le poids moléculaire de ces molécules varie entre 25000 et 40000 daltons (soit entre 150 et 200 monomères) (7).

-2. Les glucuronoarabinoxylanes.

Chez *Acer pseudoplatanus*, ce polysaccharide représente environ 5 % des polymères pariétaux (10). La chaîne principale de xylose porte des chaînes latérales d'arabinose ou de xylose et parfois d'acide glucuronique. La plupart des chaînes latérales neutres sont rattachées au C₂ du xylose par une liaison 2,4. Tous les acides uroniques sont terminaux et tous les résidus neutres terminaux appartiennent à une chaîne latérale neutre (7,10).

-3. Les arabinoxylanes.

Ce sont des polymères plus ou moins branchés (6), relativement abondant dans les parois primaires (11). Ces molécules sont souvent désignées sous le nom de feraxanes à cause de leur association avec des composés phénoliques ou acides feruliques (6,11). Les substitutions se font le plus souvent au niveau des branchements 2-0 et non 3-0 de l'arabinose avec la chaîne principale de xylose. La feruloylation des xylanes est suspectée d'avoir un effet sur la structure quaternaire du polysaccharide et d'être à la base de la synthèse de composés aromatiques plus complexes.

c. Les β -glucanes.

Ce sont des polysaccharides résultant d'une polymérisation β -1,3- et β -1,4- de D-glucose dans un rapport de 1 à 1,7 (7).

Ce polymère est caractérisé par une alternance d'unités tri- et tétrasaccharidiques (8). Ceci est justifié par

l'action d'une β -D-glucanase qui libère le trisaccharide 3-O- β -cellobiosyl-D-glucose et le tétrasaccharide 3-O- β -cellotriosyl-D-glucose. Ces deux unités seraient reliées par une liaison β -1,4- (20). Les β -glucanes ont un poids moléculaire pouvant dépasser 200.000 daltons (20).

Les β -glucanes sont très abondantes chez les monocotylées; on pense que leur structure est identique chez les dicotylées (20).

d. Les galactoglucomannanes (21).

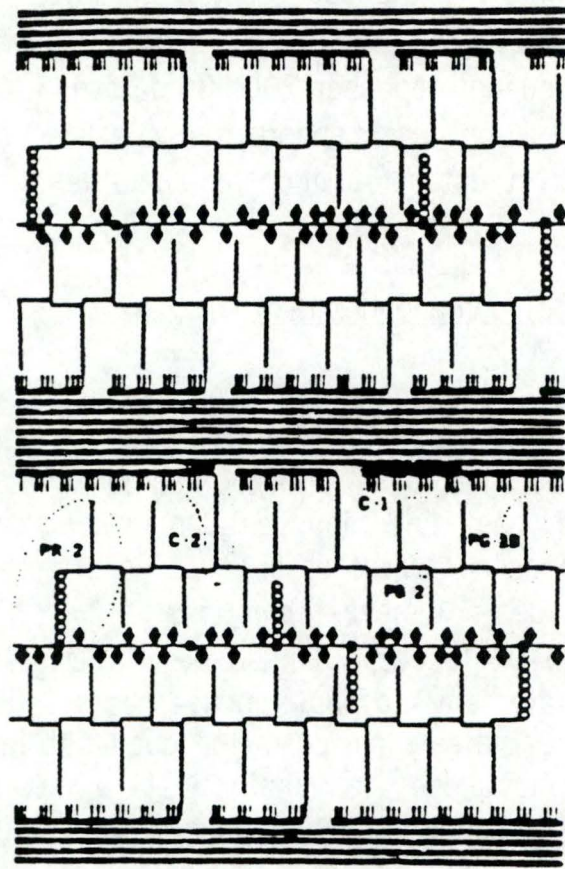
Ce sont des polysaccharides très répandus dans les tissus lignifiés chez les gymnospermes et chez les angiospermes. On a également retrouvé des galactoglucomannanes chez certaines légumineuses, chez une mousse aquatique, chez une fougère et dans les graines de certaines espèces de Liliaceae et d'Iridaceae (21). Ce sont des polymères composés de β -D-mannose en liaison -1,4- et de β -D-glucose auxquels de l' α -D-galactose peut être associé latéralement. La position des résidus galactoses le long de la chaîne est aléatoire, de même que l'est la distribution des hexoses le long de la chaîne. Il existe également des galactoglucomannanes où mannose et glucose alternent régulièrement au sein de la chaîne principale et où le galactose est exclusivement lié au mannose.

e. Les arabinogalactanes.(13)

C'est un polymère dont la chaîne principale comprend du galactose en liaison -1,3- et -1,6- avec un taux de branchement élevé. La plupart des branchements se terminent par un résidu arabinose. Dans certains cas, la chaîne latérale est réduite à un seul monomère d'arabinose lié au C₃ d'un résidu galactose en liaison -1,6-.

1.1.2.3.2.- Les hémicelluloses et l'architecture pariétale.

Les xyloglucanes sont des hémicelluloses capables de se lier fortement à la cellulose purifiée de même qu'à la cellulose *in situ* (7,22) via une multitude de ponts hydrogènes. La liaison des xyloglucanes à la cellulose se fait de manière spontanée et réversible, sans l'intervention d'enzymes ni de catalyseurs (7). La paroi contient suffisamment de xyloglucanes pour former autour des fibres de cellulose une monocouche



— cellulose elementary fibril —

— xyloglucan —

— wall protein with arabinosyl tetrasaccharides glycosidically attached to the hydroxyproline residues —

— total pectic polysaccharide —

— rhamnogalacturonan main chain of the pectic polysaccharide —

— arabinan and 4-linked galactan side chains of the pectic polymer —

— 3,6-linked arabinogalactan attached to serine of the wall protein —

— unsubstituted seryl residues of the wall protein —

Fig. 6: Modèle de la paroi montrant la position intermédiaire des hémicelluloses entre les microfibrilles de cellulose et les pectines (22).

moléculaire les empêchant ainsi de former des agrégats de trop grande taille (7,23). Les molécules de xyloglucane, d'une longueur de 0,25 micromètre, seraient capables individuellement de se lier par leurs deux extrémités à deux microfibrilles de cellulose différentes (41). Ce système de liaison servirait à maintenir les microfibrilles de cellulose parallèlement les unes aux autres (40).

La quantité importante de ponts hydrogènes entre cellulose et xyloglucane rend la liaison intermoléculaire aussi solide que la liaison covalente (22). Des études par diffraction aux rayons X ont montré que les ponts hydrogènes entre cellulose et xyloglucane se formaient entre un oxygène appartenant à un sucre d'une chaîne avec un groupement hydroxyle primaire en position 6 d'un résidu glucose de l'autre chaîne (23). Cependant, il n'existe que 25 % de résidus glucoses possédant des groupements hydroxyles primaires en position 6 dans une xyloglucane. Cette caractéristique va être à la base d'une limitation des associations latérales entre molécules. La présence de chaînes latérales fucose-(1,2)-galactose-(1,2)-xylose aura les mêmes conséquences : ces chaînes latérales ont la propriété de se recourber soit vers le bas soit vers le haut par rapport à la chaîne principale. Ainsi, les chaînes latérales d'une xyloglucane associée à la cellulose feront obstacle à l'approche d'autres molécules de xyloglucanes (23).

Les xyloglucanes ne sont pas les seuls polymères pouvant se lier à la cellulose : les glucuronoarabinoxylanes en sont également capables (7).

Les xyloglucanes et les glucuronoarabinoxylanes peuvent également réaliser des liens entre elles et avec elle-même donnant ainsi des gels (7).

Les xyloglucanes ne réalisent pas uniquement des liens avec la cellulose mais également avec les substances pectiques via leurs extrémités réductrices rattachées aux chaînes galactanes des rhamnogalacturonanes.

On a ainsi proposé un modèle d'organisation de la paroi où, en résumé, les microfibrilles de cellulose sont reliées aux polymères pectiques par des hémicelluloses (fig. 6).

La paroi secondaire des espèces dicotylées ligneuses se subdivise en 3 couches (S_1 , S_2 et S_3 ; fig. 7). La transition d'une couche à l'autre se marque par une modification de l'orientation des microfibrilles de cellulose donnant à la paroi une structure hélicoïdale (fig. 8). Des marquages cytochimiques avec une xylanase couplée à de l'or colloïdal ont démontré une concentration importante en glucuronoxylanes entre S_1 et S_2 . Connaissant la faculté de ces molécules à former des hélices lévogyres et à s'associer à la cellulose, elles sont suspectées d'amorcer la rotation des microfibrilles de cellulose entre S_1 et S_2 .

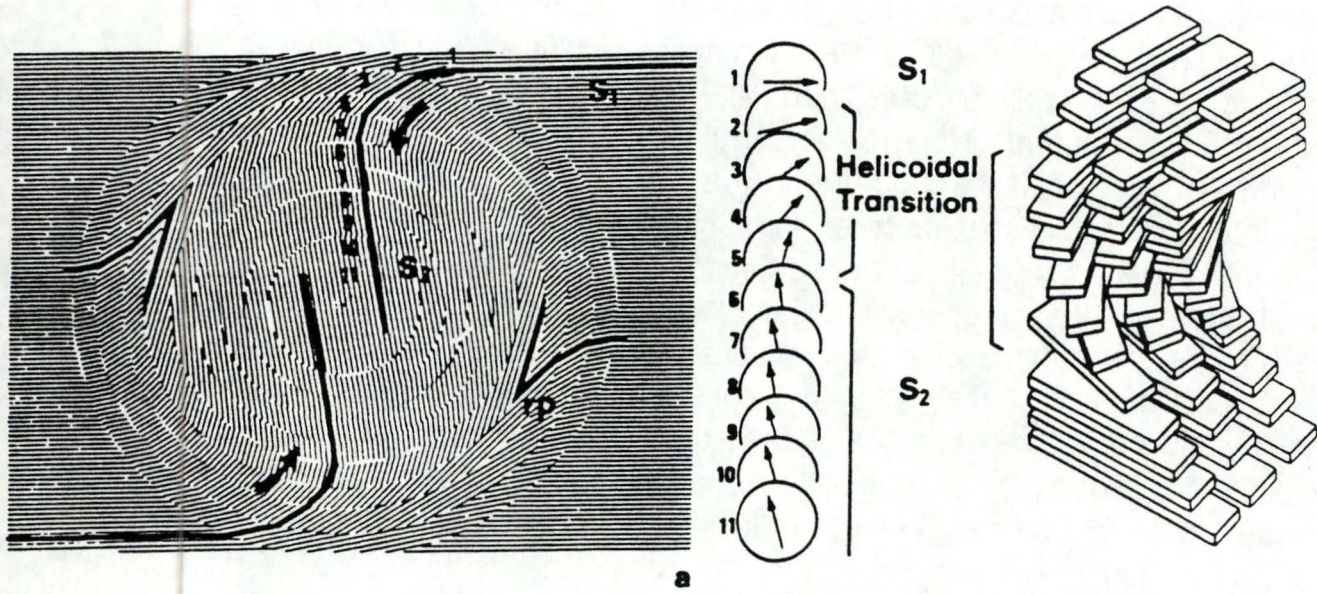


Fig. 7: Diagramme montrant la transition hélicoïdale S_1-S_2 . (a) Modèle illustrant la rotation des microfibrilles entre S_1 et S_2 au moyen de couches intermédiaires (numérotées de 1 à 11). La rotation régulière est limitée à la zone de transition hélicoïdale entre S_1 et S_2 (couches 2 à 5)(flèches). Un arrêt dans la rotation a lieu (couches 6 à 11) donnant naissance à l'épaisse couche S_2 . Les horloges permettent de visualiser les changements successifs de l'orientation des microfibrilles (9).

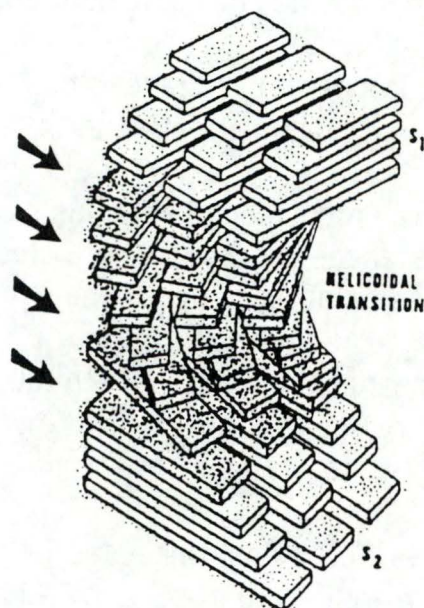


Fig. 8: Diagramme montrant la différence de distribution des glucuronoxylanes. Les flèches indiquent la localisation massive des glucuronoxylanes accessibles aux xylanases couplées à de l'or colloïdal associées à la rotation des microfibrilles de cellulose (9).

1.1.2.3.3.- Les hémicelluloses et la physiologie pariétale.

Croissance et plasticité de la paroi.

Les xyloglucanes reliant la cellulose aux pectines et étant absentes des parois secondaires, on pense que ces molécules doivent avoir un rôle dans le processus de croissance (15). L'effet de l'acide indole acétique (AIA), une hormone végétale qui provoque une perte de rigidité de la paroi permettant à la cellule d'augmenter sa taille sous l'effet de la pression de turgescence, se traduit entre autres, chez le pois, par une solubilisation partielle des xyloglucanes. Cette solubilisation est à mettre en corrélation avec une diminution du pH suite à l'action de l'AIA (15). L'effet de l'AIA étant très rapide, il semble qu'il faille exclure l'intervention d'une synthèse de *novo* de protéines ou de polysaccharides et plutôt considérer une réorganisation des polymères pariétaux déjà existants. En effet, la rupture de certaines liaisons entre constituants de la paroi se traduit par une perte de rigidité: rupture des liaisons entre le rhamnogalacturonane et les protéines ou rupture des liaisons entre la cellulose et les xyloglucanes.

Keegstra et al. (12) conçoivent que l'extension cellulaire puisse se concevoir par glissement des xyloglucanes le long des fibres de cellulose. La rupture des ponts hydrogènes serait favorisée par une concentration élevée en protons (22).

D'autres auteurs (42) suggèrent l'intervention d'endo-glucanases qui dégraderaient les xyloglucanes, permettant à la cellule de croître sous l'effet de la force de turgescence. Cette idée est soutenue par la disparition rapide de xyloglucanes marquées au ^{14}C sous l'effet de l'AIA et par le fait qu'il est alors possible d'extraire les xyloglucanes avec de l'eau.

Les β -glucanes ont également des rôles importants à remplir. Chez le coton, la synthèse de β -1,3-glucane coïncide avec le premier dépôt de cellulose de la paroi secondaire. On pense que le β -1,3-glucane joue un rôle primordial dans la détermination de la plasticité de la paroi à ce stade du développement. Ce polysaccharide possède la propriété d'incorporer très rapidement le glucose par rapport à la cellulose ce qui suppose un turn-over rapide (12).

Il semblerait que les auxines soient également capables d'agir sur les facteurs régulant la synthèse et la dégradation de β -glucanes. Chez le maïs, on observe au niveau des graines une réduction de la quantité de β -glucanes après un traitement à la gibberelline GA_3 (une hormone végétale) et on note une perte importante de β -glucanes lors de la croissance cellulaire (16).

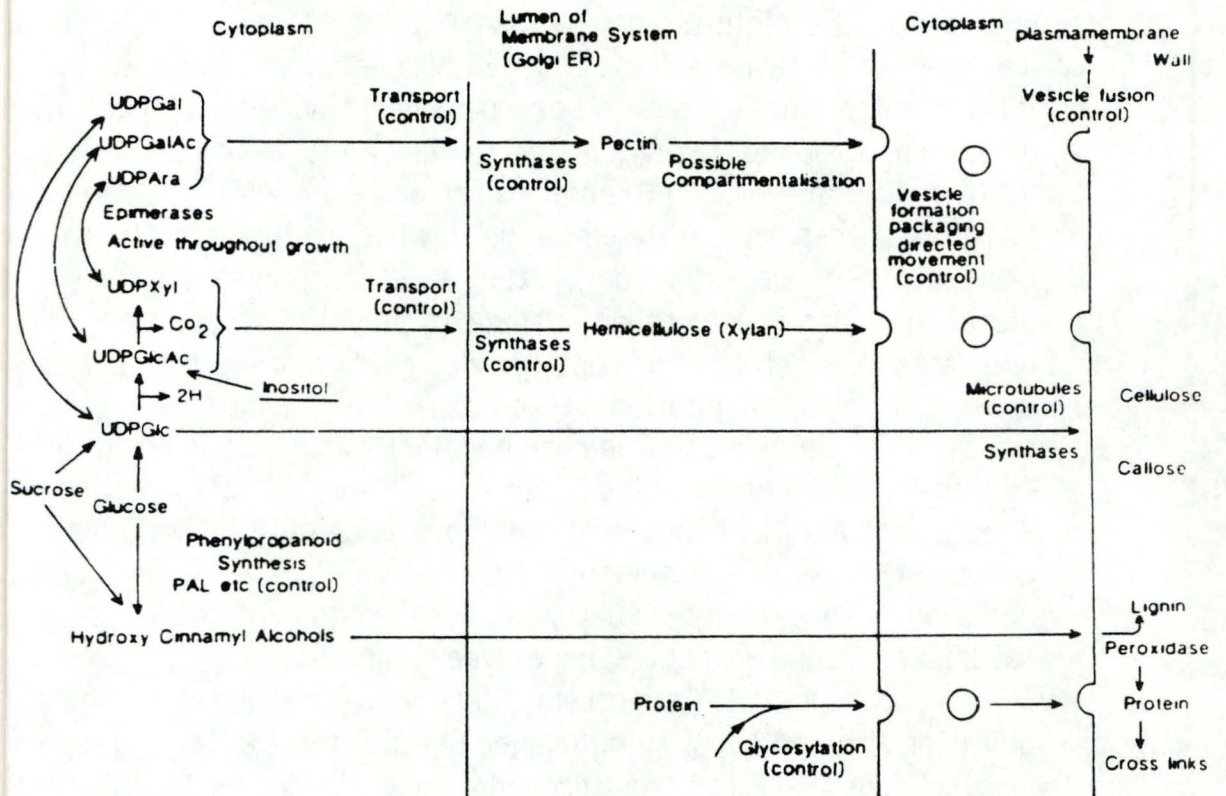


Fig. 9 : Schéma représentant les voies de synthèse principales des polysaccharides pariétaux (50).

Lors du mûrissement des fruits, on a démontré que les glucanes non cellulosiques et les polymères de type xylane n'étaient pas hydrolysés (24). On observe cependant une perte importante en galactose et une solubilisation des polygalacturonides de haut poids moléculaire (24).

Rôles annexes.

En 1984, York et al. ont démontré qu'un nonasaccharide libéré d'une xyloglucane au moyen d'une cellulase avait un puissant effet anti-auxinique (43).

Les xyloglucanes sont également des polysaccharides de réserve au niveau des graines (40). Des enzymes contenues dans la graine digèrent le polymère en monomères au moment de la germination.

1.1.2.3.4.- Synthèse des polysaccharides (25).

La synthèse de polysaccharides pariétaux en général, débute à partir de sucres diphospho-nucléosidiques. Ces précurseurs sont formés soit à partir d'un sucre phosphaté et d'un nucléoside triphosphate via une pyrophosphorylase, soit par un phénomène d'interconversion à partir des sucres diphospho-nucléosidiques. Les sucres proviennent essentiellement du glucose, du sucrose et du myoinositol (fig. 9) (50).

Les précurseurs sont synthétisés au niveau du cytoplasme via des enzymes solubles. La grande majorité des réactions de transglycosylation ont lieu dans l'appareil de Golgi. Les polysaccharides sont ensuite transportés dans des vésicules vers le plasmalemme avant leur intégration dans la paroi sauf pour la cellulose où c'est le complexe enzymatique lui-même qui est transporté dans le plasmalemme où se fera la synthèse. Durant les différents stades de développement de la cellule, les polysaccharides pariétaux subissent des changements quantitatifs et qualitatifs. On constate, par exemple lors du dépôt de la paroi secondaire, une fin de la synthèse de pectine et une synthèse accrue de cellulose et d'hémicellulose. Ces changements sont dus à une modulation du flux de précurseurs du cytoplasme vers l'appareil de Golgi et à un contrôle s'exerçant au niveau de l'activité synthase. En effet, on constate chez *Acer pseudoplatanus* qu'une augmentation de la synthèse de xylane s'accompagne d'une augmentation du transfert de D-xylose de l'UDP- α -D-xylose vers une xylane. Par opposition, la fin de la synthèse de pectine est corrélée avec une perte de l'activité synthase, autrement dominante en période de croissance et de division cellulaire.

1.2.- Etude des polysaccharides pariétaux.

L'étude de la signification physiologique des polysaccharides pariétaux de la cellule végétale implique préalablement l'isolement et l'identification de ces polysaccharides.

L'isolement des polysaccharides peut se faire au départ du surnageant de cultures de cellules en suspension ou par extraction sélective des polymères de la paroi. L'identification des polysaccharides se fait classiquement par des dosages colorimétriques, par la chromatographie en phase gazeuse et par la spectrométrie de masse.

1.2.1.- Sources de polysaccharides.

La paroi cellulaire a été souvent étudiée via des polysaccharides libérés dans le milieu de culture de cellules végétales cultivées en suspension; ceux-ci sont, en effet, le reflet des polymères se trouvant au sein même de la paroi. Des exemples récents ont été publiés par l'équipe d'Albersheim et Darvill (14,27) qui a travaillé sur *Acer pseudoplatanus* ou par l'équipe de Thibault (32) qui a étudié les polysaccharides de *Daucus carotta*.

Les polysaccharides pariétaux peuvent également être étudiés via une extraction directe de la paroi:

- Extraction au NaOH pour l'isolement des hémicelluloses.
- Extraction des substances pectiques via l'utilisation d'enzymes telle l'endopolygalacturonase fongique ou bactérienne.
- Extraction par des agents chélateurs.
- Extraction via des solvants organiques.

Qu'ils proviennent d'un surnageant de culture ou de la paroi, les polysaccharides sont alors purifiés essentiellement par

- précipitation fractionnée (à l'alcool, à l'acétate de Cu^{2+} , au cétavlon, à l'acétone...).
- chromatographies échangeuses d'ions.
- chromatographie sur tamis moléculaire.
- chromatographie d'affinité (colonne de cellulose).

1.2.2.- Méthodes d'analyse classiques des polysaccharides

La structure des polysaccharides est d'une complexité qui dépasse l'imagination. Si on compare la structure d'une protéine à celle d'un polysaccharide, on comprend facilement cet aspect du problème. Les

protéines sont en effet composées d'un agencement séquentiel d'acides aminés pris parmi les 20 acides aminés constitutifs des protéines. Un polysaccharide est un agencement de sucres où chaque sucre peut exister sous différentes formes isomériques. Un agencement de 3 sucres différents peut ainsi donner naissance à plus de 1000 combinaisons possibles puisqu'il existe 64 types de liaisons glycosidiques différentes entre 2 sucres à 6 atomes de carbone (2).

Malgré cette complexité, il existe cependant des méthodes d'analyse de ces polysaccharides permettant d'en préciser au moins la structure primaire.

La première étape d'analyse d'un polysaccharide fait appel à des dosages colorimétriques qui permettent de quantifier les acides uroniques, les pentoses, les oses neutres, les longueurs de chaînes et d'ainsi se faire une première idée de la nature du polysaccharide en présence.

Ensuite, l'analyse de la composition en substances glycosylées (1) réalisée par la méthode des acétates d'alditols ou par la méthode des triméthylsilyl éthers de méthyl glycosides permet de distinguer et de quantifier les monomères constitutifs des polysaccharides. Le principe de ces deux méthodes est de former des composés volatils pour chaque sucre qui seront ensuite séparés par chromatographie gazeuse et comparés avec des standards.

Finalement, l'analyse du mode de liaison entre les sucres (1) fait appel à des méthodes de méthylation, d'hydrolyse et d'acétylation des polysaccharides. Les dérivés méthylés et acétylés sont analysés par chromatographie gazeuse et par chromatographie gazeuse- spectrométrie de masse.

On peut ainsi déterminer l'identité d'un polysaccharide en comparant sa composition en sucres et le mode de liaison de ses sucres avec ceux de polysaccharides bien connus. Ces méthodes, longues, coûteuses et difficiles, ne renseignent cependant en rien sur les structures secondaire et tertiaire de la molécule (1). Il est, de plus, clair que ces méthodes ne sont applicables que sur des polysaccharides relativement abondants et isolés en quantités suffisantes.

Une étude du rôle des polysaccharides pariétaux sur la physiologie de la cellule végétale nécessite, elle, l'identification, la localisation et, si possible, la quantification des polysaccharides *in situ* à l'échelle cytologique. Nous allons passer en revue, dans le paragraphe suivant, les techniques existantes qui permettrait d'atteindre ce but.

1.2.3.- Identification et localisation ultrastructurale des polysaccharides (33).

Différentes méthodes relativement classiques (cytochimie au sens strict ou d'affinité entre macromolécules) permettent d'approcher la distribution intracellulaire des polysaccharides. Seuls les anticorps monoclonaux (AcMo) nous paraissent susceptibles, à terme, d'être utilisés comme des marqueurs performants des polysaccharides.

1.2.3.1.- La cytochimie classique des polysaccharides.

La cytochimie classique permet de mettre en évidence trois types de groupements fonctionnels caractéristiques des polysaccharides: les fonctions hydroxyliques, carboxyliques et les esters par des méthodes basées sur l'oxydation au periodate, la formation d'hydroxamates de fer et la réaction avec des micelles colloïdaux, respectivement. Il est également possible d'exploiter le caractère chargé des molécules : par exemple, les acides uroniques peuvent se lier à des particules métalliques colloïdales. Ces fonctions sont malheureusement présentes sur un grand nombre de molécules différentes et ces techniques, quoi qu'elles aient permis de mettre en évidence les voies de synthèse des polysaccharides, ne sont pour autant pas capables de faire la différence entre des polysaccharides de natures différentes.

En effet, ces méthodes permettent de localiser les polysaccharides et de trouver partiellement leurs modes d'organisation, mais ne permettent pas de distinguer des différences de composition, de distinguer les configurations α et β , les formes hexoses et pentoses et les différences de séquences. De plus, elles souffrent d'un faible pouvoir de résolution.

1.2.3.2.- Les lectines(45).

Ce sont des glycoprotéines végétales capables de reconnaître de manière spécifique un sucre ou une séquence caractéristique de sucres.

L'emploi des lectines se heurte à deux inconvénients majeurs:

- Les lectines se lient à des sucres soit libres, soit terminaux d'un polymère, mais alors sans donner de renseignements sur les parties internes de la molécule.
- Il n'y a pas de lectine capable de se lier au xylose ou à l'arabinose, très fréquents dans la paroi.

1.2.3.3.- Enzymes couplées à de l'or colloïdal (33).

Cette technique a permis d'étudier certains types de liaison:

- la β -galactosidase a été utilisée pour la liaison β -galactoside des chaînes latérales de xyloglucanes.
- La xylanase a été utilisée pour la liaison β -1,4- xylopyranose présente dans la chaîne principale des xylanes.
- La 1-4- β -D cellobiohydrolase a été utilisée pour la mise en évidence des microfibrilles de cellulose.
- La chitinase a servi à mettre en évidence de la chitine.

La spécificité de cette méthode est cependant limitée par le fait que l'enzyme ne reconnaît pas une séquence mais coupe une liaison. De plus, l'enzyme doit être purifiée et couplée à l'or colloïdal avec une perte d'activité aussi réduite que possible.

1.2.2.4.- Utilisation d'anticorps.

Outre leur facilité d'utilisation, les anticorps et en particulier les anticorps monoclonaux constituent la meilleure approche théorique de l'identification et du marquage cellulaire, de par leur très forte spécificité.

La production de sondes immunologiques dirigées contre des antigènes polysaccharidiques n'en est encore qu'à ses débuts. Quelques polysérums ont été produits: Vreeland (1972) a produit un sérum polyclonal contre un alginat. Kohn et al. (1986) ont obtenu des sérums contre l' α -L-arabinofuranose. Moore et Staehelin ont localisé in situ le rhamnogalacturonane I et la xyloglucane chez le trèfle.

Dans un domaine plus phytopathologique, Förster et Mendgen ont utilisé un sérum pour repérer les pectinestérases chez *Phytophthora infestans*. Indirectement, cette technique permet d'approcher la localisation des pectines.

Très peu d'anticorps monoclonaux ont été produits contre des polysaccharides végétaux. Il n'y a guère que les travaux d'Irvin et Ceri (47) qui relatent la production d'anticorps monoclonaux contre des résidus d'acide L-gulonique au sein des alginates. En 1984, Vreeland et al. ont produit des anticorps monoclonaux contre des alginates et des fucanes de *Fucus*. De tels anticorps peuvent être utilisés pour l'étude de la paroi primaire au niveau du zygote de *Fucus* durant les premiers stades de différenciation de la paroi.

La même année, Anderson et al. annoncent la production d'anticorps monoclonaux contre l'arabinose et le galactose présents dans la fraction glycosidique d'une glycoprotéine végétale.

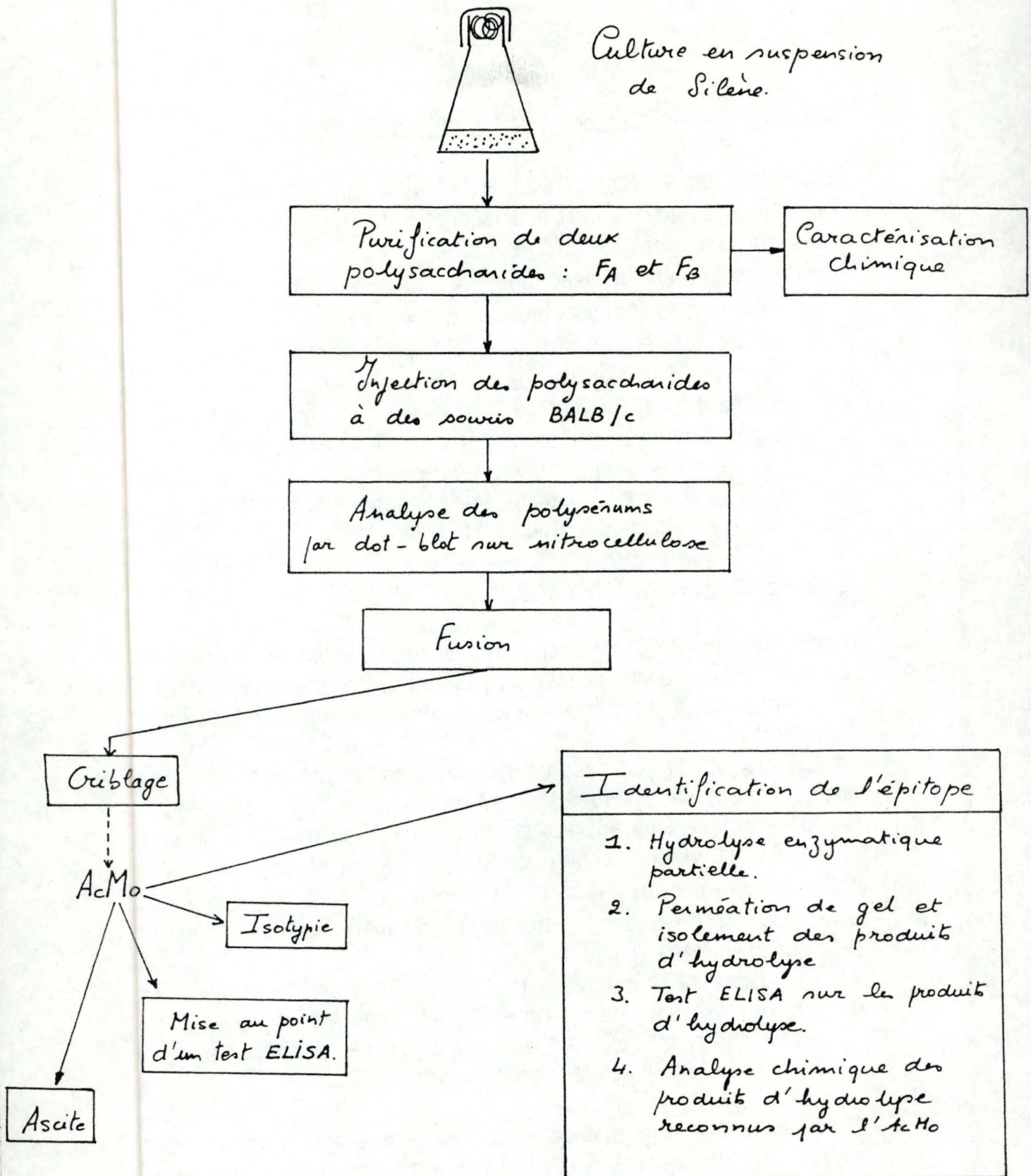


Figure A : Démarche suivie.

En 1988, Liners et al. (53) ont produit des hybridomes qui sécrètent des anticorps monoclonaux spécifiques d'une conformation de l'acide homopolysaccharidique.

Il existe finalement une manière élégante d'utiliser les anticorps monoclonaux en chromatographie d'affinité pour la séparation d'oligosaccharides. Mise au point par Zopf et ses collaborateurs (48), elle pourrait être utilisée pour séparer efficacement des séquences oligosaccharidiques présentant un intérêt particulier en physiologie végétale.

1.3.- But du travail.

Nous venons de voir que les polysaccharides sont des molécules très complexes dont l'analyse est minutieuse et pour lesquels il n'existe pas de marqueurs cytochimiques adéquats pour des localisations *in situ*. Nous nous sommes donc intéressés à un polysaccharide particulier de la famille des hémicelluloses, facile à isoler : une xylane de *Silene alba*. Ce polysaccharide est particulièrement intéressant parce qu'en tant qu'hémicellulose, il intervient probablement dans les phénomènes de croissance cellulaire, et parce que sa composition en oses neutres ne correspond à celle d'aucun polysaccharide-type décrit dans la littérature. Nous avons voulu produire des sondes spécifiques de cette xylane de Silène qui, à terme, peuvent être utilisées comme des marqueurs cytochimiques. Ces sondes, des anticorps monoclonaux, à l'instar des enzymes de restriction capables de reconnaître une séquence nucléotidique dans l'ADN, peuvent se fixer sur une séquence ou sur une conformation oligosaccharidique caractéristique.

La démarche suivie dans ce travail est résumée schématiquement à la figure A. La xylane a été isolée à partir du surnageant de culture en suspension de *Silene alba*. Elle a ensuite été caractérisée et injectée à des souris en vue de produire des anticorps monoclonaux. Afin de déterminer la nature de l'épitope reconnu par les anticorps monoclonaux obtenus, nous avons procédé par analyse enzymatique partielle du polysaccharide. Les produits d'hydrolyse ont ensuite été isolés et testés en ELISA contre les anticorps monoclonaux d'une part, analysés en chromatographie en phase gazeuse d'autre part. Cela nous a finalement permis de proposer une structure générale du polysaccharide.

MATERIBLS BT METHODES.

2.1.- Culture en suspension de cellules de *Silene alba*.

2.1.1. -Mode de culture.

Une souche de *Silene alba* (le compagnon blanc) nous a été très aimablement fournie par l'Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux de l'Université de Lille (Dr. Morvan).

La culture des cellules eu lieu en erlenmeyer de 250 ml à col large fermé par une bourre d'ouate et une feuille d'aluminium. Le volume de culture était de 100 ml. Le récipient et son contenu ont été autoclavés à 121°C (1 bar) pendant 20 minutes avant inoculation. L'oxygénation des cultures s'est faite sur un agitateur horizontal vks 75 Edmund Bühler à 100 tours/minutes en chambre de culture (luminosité 1000 lux et température constante de 25°C) pendant 15 jours.

2.1.2.- Mode de repiquage.

Nous avons utilisé deux méthodes pour repiquer les cellules.

1. Repiquage par dilution

On prélève un volume de milieu après 15 jours de culture et on le dilue dans un milieu neuf dans un rapport de 1:10.

2. Repiquage "à la spatule"

Il s'agit d'un repiquage où on récupère les cellules sur un verre fritté stérile (Duran Mainz Jena^{er} Glas n° 1). Cette technique permet ainsi de prélever la totalité du milieu de culture. Les cellules sont ensuite réparties "à la spatule" entre de nouvelles fioles de culture.

2.1.3.- Composition du milieu de culture.

Il s'agit de la solution de Lamport modifiée par Lescure (1966)

Composants	Concentration en mg . l ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O (UCB)	290,000
KCl (Merck)	65,000
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka)	360,000
KH ₂ PO ₄ (Fluka)	500,000
KNO ₃ (Fluka)	1960,000
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O (Merck)	97,000
FeSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka)	2,875

Na ₂ EDTA (Merck)	3,725
H ₃ BO ₃ (Fluka)	1,500
KI (Merck)	0,750
MnSO ₄ · 4H ₂ O (Fluka)	4,500
ZnSO ₄ (Fluka)	1,500
Saccharose (Fluka)	20.000,000
Thiamine-HCl (Sigma)	1,000
2,4-D (Sigma)	1,000

2.2.- Purification et caractérisation des polysaccharides.

2.2.1.- Protocole de purification.

Ce protocole expérimental nous a été très aimablement communiqué par l'Equipe Polysaccharides pariétaux des Végétaux (Dr. Morvan) de l'Université de Lille.

- Préléver le surnageant de culture en suspension de *Silene alba* après 15 jours et filtrer sur verre fritté.

- Précipiter le surnageant avec un volume d'éthanol pur. Laisser reposer une nuit à 4°C.

- Centrifuger à 1600 g pendant 5 minutes. Eliminer le culot.

- Evaporer l'éthanol du surnageant au moyen d'un rotavapor Büchi RE 111 à 40°C. Réduire le volume de moitié.

- Dialyser le milieu contre H₂O déminéralisée (résistivité de l'eau: 1,5 M Ω · cm⁻¹). On utilise un sac à dialyse en cellulose avec un cut-off de 12000 daltons (Arthur H. Thomas CO. , Philadelphia , PA 19105, USA).

- Chromatographie échangeuse d'ions sur le milieu concentré.

Gel: Sephadex DEAE-A50 (Pharmacia). C'est un gel faiblement basique. La capacité totale est de 3,5 méq/g et la capacité accessible est de 25 g/100 ml. Le gel est utilisé dans H₂O déminéralisée. On utilise une colonne de 50 x 1,5 cm (45 cm de gel) et nous travaillons à un débit de 40 ml · h⁻¹ (débit naturel de la colonne de 80 ml · h⁻¹). L'élution n'a lieu que lorsque tous les polysaccharides non fixés ont quitté le gel. On réalise une lecture à 248,5 nm avec un spectrophotomètre Philips PU8740 UV/Vis Scanning Spectrophotometer en utilisant une cuvette en quartz à circulation Helma 178010-QS d'un volume de 80 μ l. L'élution se réalise au moyen de NaCl 0,1 M en récoltant des fractions de 5 ml.

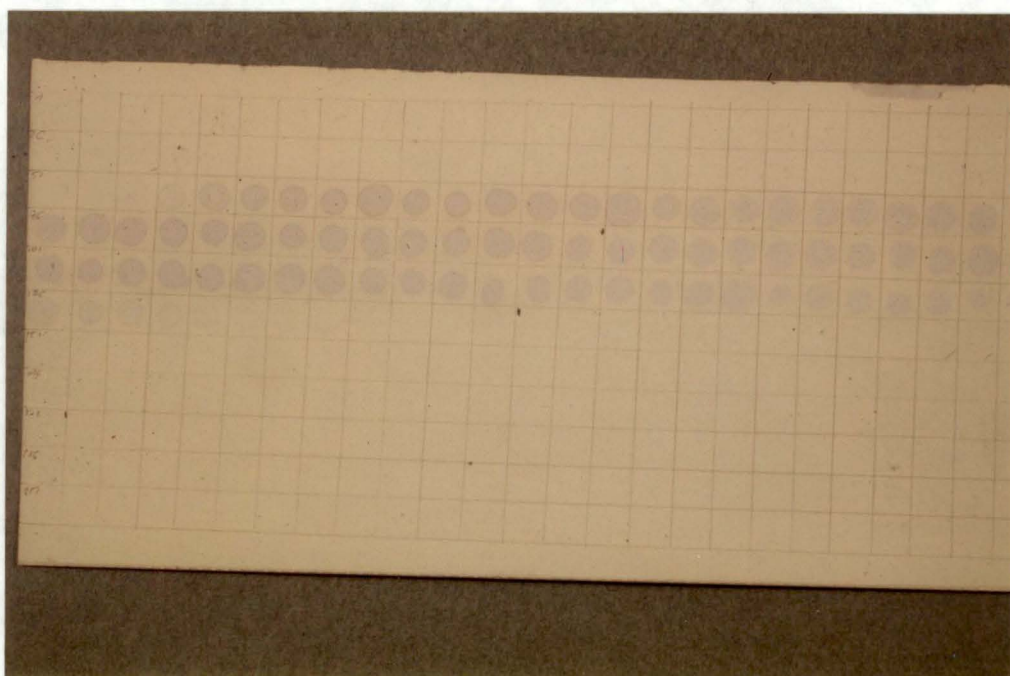


Photo n° 1 : Révélation typique à l'orcinol sulfurique sur couche mince.
Dans chaque petit carré sont déposés 3 μ l de chaque fraction récoltée en sortie de colonne. Après séchage de la plaque de silice, on y vaporise une solution d'orcinol sulfurique et on révèle à 100°C à l'étuve. Le changement de couleur de la solution d'orcinol permet de repérer les fractions contenant des substances glycosidiques.

- Révélation: Un dosage des sucres totaux sur chaque fraction nous a permis de localiser exactement les fractions contenant des sucres indépendamment du schéma d'éluion. Nous utilisons pour ce faire une méthode très rapide : la méthode à l'orcinol sulfurique. Une solution d'orcinol à 0,1 % dans H_2SO_4 70 % est vaporisée sur une plaque de silice en couche mince (TLC aluminium sheets silica gel 60 20x20 - 0,2 mm silice Merck) sur laquelle on a déposé 3 μ l de chaque fraction. On incube ensuite la plaque à 100°C pendant 15 minutes. Les fractions positives sont rapidement repérées par un changement de la couleur de la solution d'orcinol (photo n°1).

- Collecte des fractions positives à l'orcinol et dialyse contre H_2O déminéralisée pour éliminer le NaCl.

- Réduction du volume de l'échantillon au rotavapor à 1 ou 2 ml (100-150 ml en sortie de colonne).

- Chromatographie sur tamis moléculaire

Gel : Sephacryl S-200 (Pharmacia). La limite de fractionnement de ce gel est de 5000 à 250.000 daltons pour les protéines et de 1000 à 80000 daltons pour les polysaccharides. Le gel est utilisé dans H_2O déminéralisée. Nous utilisons une colonne de 110 x 2,2 cm (90 cm de gel) dont le volume mort est de 90 ml. Le débit opérationnel est de 60 ml . h⁻¹ et on récolte des fractions de 1 ml. La chromatographie est suivie à 248,5 nm. La révélation se fait en couche mince comme précédemment.

- Lyophilisation des fractions positives sur couche mince.

2.2.2.- Etude chimique et enzymatique.

2.2.2.1.- Dosage des protéines par la méthode de Folin.

Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Lowry (52). Nous avons utilisé une gamme étalon sur BSA (fig.10).

2.2.2.2.- Dosage des oses neutres par la méthode de Dubois (31).

Réactifs.

Acide sulfurique (Merck)

Phénol (Merck)

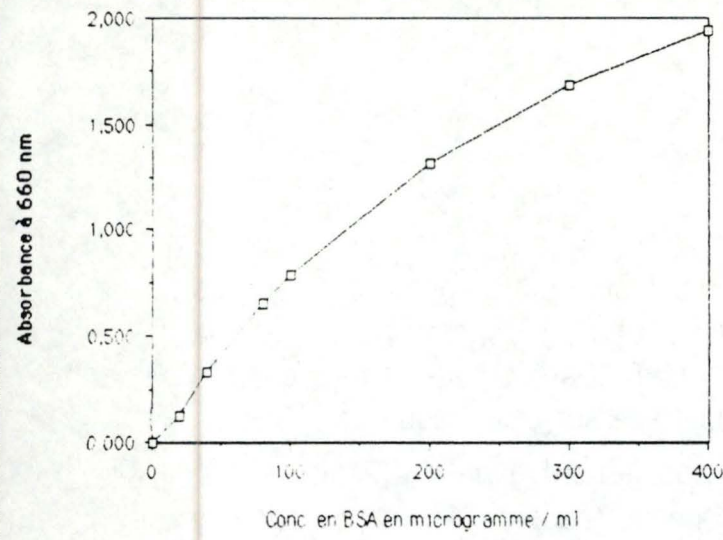


fig. 10.

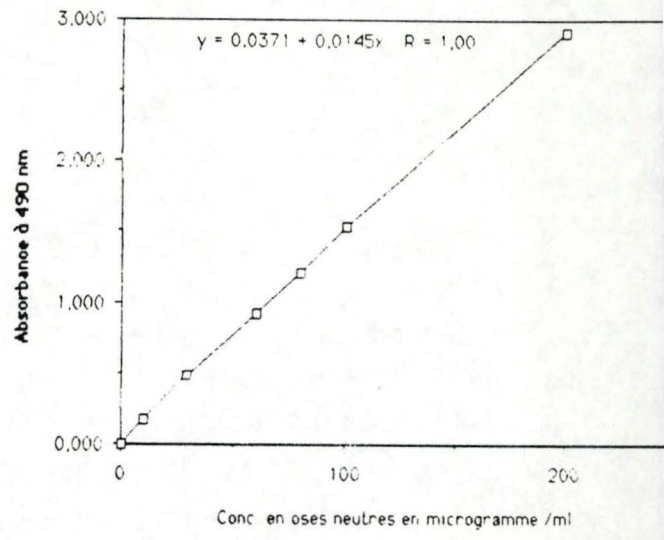


fig. 11.

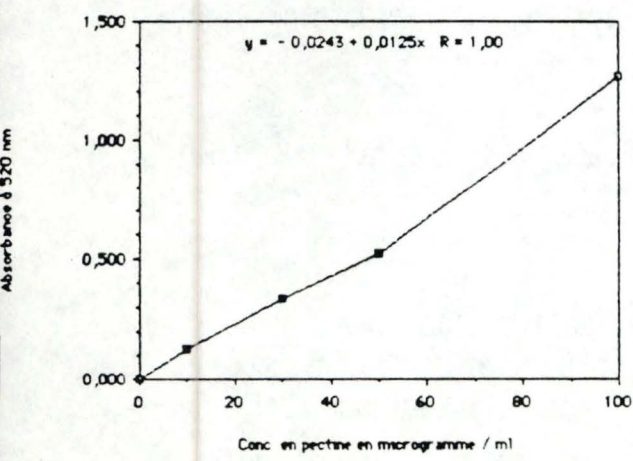


fig. 12.

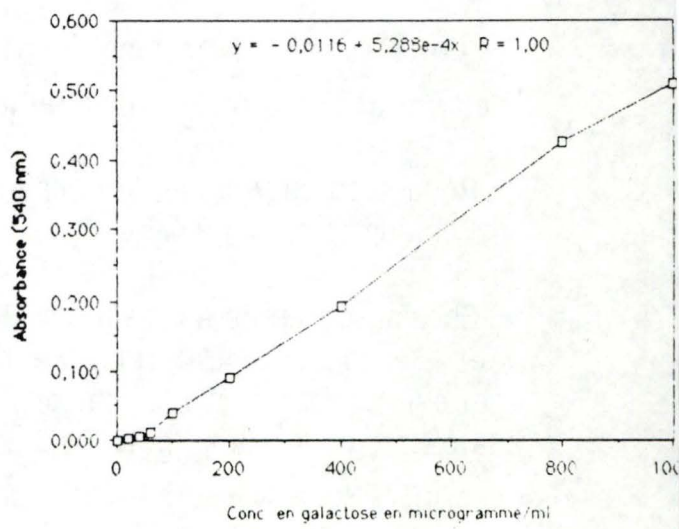


fig. 13.

Fig. 10 : Gamme étalon sur BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry.

Fig. 11 : Gamme étalon pour le dosage des sucres neutres par la méthode de Dubois. La droite d'étalonnage a été construite sur un mélange des différents sucres susceptibles de se retrouver dans le polysaccharide analysé (chaque sucre a été utilisé à une concentration de 1 mg/ml).

Fig. 12 : Gamme étalon sur acide homopolygalacturonique (Sigma) pour le dosage des acides uroniques par la méthode à l'acide dinitrosalicylique.

Fig. 13 : Gamme étalon sur galactose pour le dosage des sucres réducteurs.

Mode opératoire.

On prépare une solution de phénol à 80 %. Dans un volume de 2 ml de solution de sucre, on ajoute 0,05 ml de phénol à 80 % et 5 ml d'acide sulfurique concentré. On laisse reposer pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite agités et placés pendant 15 minutes dans un bain-marie à 25-30°C. On lit ensuite l'absorbance à 490 nm.

Remarque: Pour le dosage des sucres neutres, nous avons utilisé une gamme étalon avec une solution à 1 mg / ml de chacun des sucres neutres: glucose, galactose, arabinose, fucose, rhamnose, xylose et mannose-à-d des sucres susceptibles de se retrouver dans le polysaccharide étudié (fig. 11).

2.2.2.3.- Dosage des sucres réducteurs par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNSA).Réactif.

- 8 g de NaOH (Merck)
- 150 g de tartrate double Na⁺-K⁺ (Merck)
- 5 g d'acide de DNSA pour 500 ml H₂O

Mode opératoire.

A 1 ml d'échantillon, on ajoute 1 ml du réactif précédent, puis on place les tubes au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 5 ml d'H₂O désionisée, et on lit l'absorbance à 540 nm. Nous avons utilisé une gamme étalon sur galactose (fig. 12).

2.2.2.4.- Dosage des acides uroniques au méthahydroxybiphénile.Principe

Sous l'action de l'acide sulfurique, les polyosides sont hydrolysés en oses neutres et acides uroniques. Les monomères libérés sont déshydratés en dérivés furfuroïques qui forment avec le méthahydroxybiphénile un complexe de couleur rose présentant un maximum d'absorption à 520 nm.

Réactifs

- Solution de méthahydroxybiphényle (3-phenyl phenol 90 % Aldrich)
Pratiquement, on prépare une solution à 0,15 % en méthahydroxybiphényle dans du NaOH à 0,5 % (1).
- Solution d'acide sulfurique concentré 97-98 %.
- Solution d'acide homopolygalacturonique (pour la gamme étalon).

Mode opératoire

A 1 ml de solution contenant de 5 à 100 μg d'acides uroniques, on ajoute, dans un bain de glace, 6 ml de la solution d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont agités et passés dans un bain-marie à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement dans la glace, on ajoute 100 μl de réactif au métahydroxybiphényle. On place les tubes à l'obscurité pendant 15 minutes. On lit l'absorbance à 520 nm après avoir homogénéisé les tubes. Pour le dosage des acides uroniques, nous avons utilisé une gamme étalon d'acide pectique (Sigma) (fig. 13). Il existe cependant une très légère interférence due aux oses neutres.

2.2.2.5.- Dosage qualitatif et étude enzymatique par chromatographie en couche mince.

a. Dosage qualitatif.

Le support de chromatographie est une plaque de verre recouverte d'un gel de silice (TLC plates Silica gel 60 20x20 cm : 0,25 mm de silice , Merck).

Les standards utilisés sont de l'arabinose, du galactose, du fucose, du glucose, du rhamnose, du xylose, du mannose de l'acide galacturonique et de l'acide glucuronique à une concentration de 1 mg / ml. On dépose 5 μl de standard à 2 cm du bord de la plaque.

Le polysaccharide est préalablement hydrolysé avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) 2 N dans un tube à hydrolyse en pyrex hermétiquement fermé pendant 2 heures à 120°C. Après hydrolyse, le TFA est éliminé au rotavapor à 40°C, suivie de 3 évaporations successives à l'éthanol. Le résidu sec est ensuite remis en suspension dans de l'eau (50 à 100 μl) et déposé sur la couche mince à raison de 30 à 40 μl par dépôts successifs de 5 μl .

Le solvant de migration est constitué de butanol, d'acide acétique et d'eau dans un rapport de 2:1:1. A température ambiante, la chromatographie ascendante dure environ 8 heures et est ensuite séchée à 40°C. On révèle par vaporisation d'une solution d'orcinol sulfurique (voir 2.2.1.) suivie d'un séchage dans l'étuve à 100°C.

b. Etude enzymatique.

Digestion à la pectinase et à l'hémicellulase.

Le principe de cette étude est de vérifier la sensibilité du polysaccharide isolé vis-à-vis de différentes enzymes fournies dans le commerce. Nous

avons utilisé une pectinase (Sigma) et une hémicellulase (Sigma).

Mode opératoire:

- Dans un tube en pyrex, on réalise une digestion enzymatique durant 36 heures. La digestion se fait de manière à avoir 0,7 unité d'enzyme par mg de polysaccharide.

- Pour la pectinase, une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzymes qui libère une micromole d'acide galacturonique par hydrolyse de l'acide polygalacturonique par minute à pH 4,0 et à 25°C.

Pour l'hémicellulase, on distingue une activité hémicellulase où une unité enzymatique libère une micromole de D-galactose de l'hémicellulose par heure à pH 5,5 et à 37°C, et une activité cellulase où une unité enzymatique libère une micromole de D-glucose de la cellulose par heure à pH 5,5 et à 37°C.

- Après digestion, on élimine les protéines par ajout d'acide trifluoroacétique 13 N à raison de 1 μ l de TFA par μ g de protéine, et on centrifuge directement à 1600 g pendant 5 minutes à 20°C. On récupère le surnageant.

- On évapore le TFA au Rotavapor sous vide à 40°C suivi de 3 évaporations successives à l'éthanol.

- Les hydrolysats sont ensuite analysés par chromatographie en couche mince.

Digestion à la driselase (Sigma).

La driselase est un mélange enzymatique contenant de la laminarase, de la xylanase et de la cellulase de Basidiomycètes. Ce mélange enzymatique est capable de faire la différence entre une xylane et une xyloglucane (voir 1.1.2.3.1.-b).

Ce test a nécessité 10 mg de polysaccharide Fa . L'hydrolyse a été réalisé au moyen d'une solution enzymatique brute à 5 % pendant 16 heures. Les produits d'hydrolyse ont été séparés par chromatographie sur couche mince. Nous avons utilisé l'arabinose, le glucose, le fucose, le xylose et le galactose comme standards, ainsi qu'un contrôle négatif sur driselase seule et sur le polysaccharide seul. La libération de xylose lors de la digestion est propre aux xylanes.

2.2.2.6.- Analyse chimique du polysaccharide en chromatographie en phase gazeuse.

L'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse est de pouvoir quantifier chacun des sucres constitutifs du polysaccharide. Pour ce faire, nous

utilisons dans cette analyse la méthode des acétates d'alditols (1) où les monomères sont d'abord réduits et ensuite acétylés afin de les rendre volatils, préalables indispensables à la chromatographie en phase gazeuse.

Principe.

Les échantillons volatils sont injectés dans le chromatographe, vaporisés au niveau de la chambre d'injection et entraînés par un gaz porteur (Hélium dans ce cas-ci) constituant la phase mobile. L'échantillon ainsi entraîné passe dans une colonne contenant la phase stationnaire. Les différentes molécules contenues dans l'échantillon interagissent plus ou moins fortement avec cette phase stationnaire, ce qui se traduit par un temps de rétention plus ou moins long suivant la nature de la molécule. En sortie de colonne, le passage d'une substance dans le détecteur à flamme se traduit par une différence de potentiel proportionnelle à la concentration de cette substance.

Protocole expérimental:

- Hydrolyse du polysaccharide avec du TFA 2N pendant 2 heures à 120°C dans un tube en pyrex hermétiquement fermé.
- Evaporation du TFA sous vide à 40°C au rotavapor, suivie de 3 évaporations à l'éthanol (jusqu'à dessiccation complète du résidu final).
- Réduction des monomères libérés: on prépare une solution fraîche de NaBH_4 à 10 mg/ml dans NH_4OH 1 M. Au résidu sec, ajout de 250 μl de la solution réductrice. Les tubes sont placés ouverts dans un bain thermostaté à 60°C pendant une heure.
- Arrêt de la réduction par 3 ou 4 gouttes d'acide acétique glacial (on observe une effervescence due au dégagement d'hydrogène).
- Première évaporation du milieu jusqu'à obtention d'une pâte.
- Resuspension de cette pâte dans 250 μl d'un mélange méthanol/acide acétique (9:1) et évaporation sous flux d'air. On recommence cette opération deux fois en veillant à ce que le résidu soit sec entre deux évaporations.
- Nouvelle série de trois évaporations avec 250 μl de méthanol.
- Acétylation: cette étape se réalise par ajout au résidu sec de 200 μl d'anhydride acétique et de 100 μl de pyridine comme catalyseur. Après 20 minutes à 120°C, les tubes sont refroidis sous eau courante.

- Ajout de deux fois 400 μ l de toluène, suivi chaque fois d'une évaporation à sec.

- Evaporation de l'anhydride acétique et de la pyridine sous un courant d'air, puis ajout de 0,5 ml de dichlorométhane et 0,5 ml d'eau. Il se forme deux phases (il est parfois nécessaire de centrifuger pour bien séparer les deux phases). On récupère la phase organique inférieure au moyen d'une pipette Pasteur et on évapore le dichlorométhane sous un flux d'air. On réalise encore deux ajouts et deux évaporations de 0,5 ml de dichlorométhane avant de resuspendre le résidu sec dans le volume adéquat de dichlorométhane. On injecte finalement les acétates d'alditols dans un chromatographe en phase gazeuse Hewlet Packard HP 5890. Les acétates d'alditols sont séparés sur une colonne capillaire de 15 m de long et de 0,25 mm de diamètre intérieur. La phase stationnaire est constituée de bicyanopropylphényl polysilosane sous la forme d'un film de 0,20 μ m d'épaisseur.

Les paramètres d'analyse sont les suivants:

- Colonne utilisée : type SP 2330 (Supelco)
- Température du four : 240°C
- Température du détecteur : 300°C
- Température de l'injecteur : 300°C
- Pression en tête de colonne : 150 kPa
- Volume injecté : 1 μ l

La figure 14 montre un chromatogramme typique réalisé sur un mélange standard de sucres neutres. L'ordre de sortie est rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose et inositol, ce dernier comme standard interne.

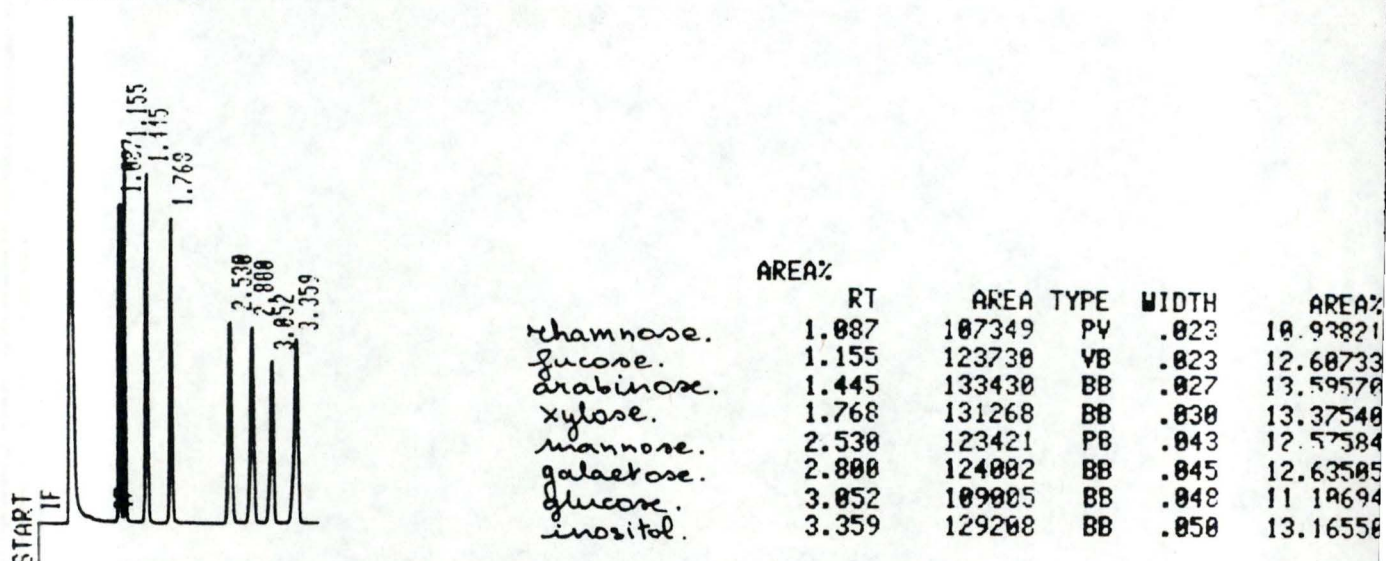


Fig. 14 : Chromatogramme des acétates d'alditols d'un mélange de quantités équivalentes d'oses neutres. L'ordre de sortie des oses neutres est le suivant : rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose et inositol.

2.3. Production d'anticorps monoclonaux.

2.3.1.- Immunisation des souris.

Deux lots de cinq souris syngéniques de type BALB/c ont été immunisés, l'un avec le polysaccharide Fa, l'autre avec le polysaccharide Fb de *Silene alba*. Le polysaccharide, utilisé à une concentration de 265 mg / ml, a été ajusté à un pH de 7,4. La stabilisation du pH n'a eu lieu qu'après plusieurs heures.

- Injection primaire : un volume de solution de polysaccharide émulsionné dans un volume d'adjuvant complet de Freund (Gibco), a été injecté, en intrapéritonéale, à raison de 0,5 ml d'émulsion par souris.
- Injection de rappel (14 semaines plus tard) : même protocole en remplaçant l'adjuvant complet par de l'adjuvant incomplet de Freund.
- La réussite de l'immunisation a été vérifiée par dot-blot sur nitrocellulose.

2.3.2.- Dot blot sur nitrocellulose.

Principe.

On adsorbe l'antigène sur la feuille de nitrocellulose. Après blocage des sites non-spécifiques, la feuille est incubée en présence du polysérum à tester. Une incubation ultérieure avec un Ac couplé à la peroxydase permet par l'oxydation d'un substrat non coloré en un complexe coloré, de mettre en évidence la présence d'anticorps, et donc de l'antigène, sur le support.

Protocole.

- Dépôt de 5 μ l de l'Ag sur la feuille de nitrocellulose (BioRad). On dépose 1 μ l à la fois en attendant que le dépôt précédent soit bien sec.
- Saturation dans un tampon TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,5 mM (pH 7,4) (tampon TRIS-Na-Ca) + 10% de sérum de cheval (Gibco). Incubation pendant une nuit à 4°C ou pendant 2 heures à 37°C.
- Incubation de la membrane pendant une heure à température ambiante avec le polysérum dilué 20 fois dans le tampon TRIS-Na-Ca + 1% de sérum de cheval.
- Lavage de la membrane 3 fois pendant 10 minutes avec le tampon TRIS-Na-Ca + 0,1% de tween-20.

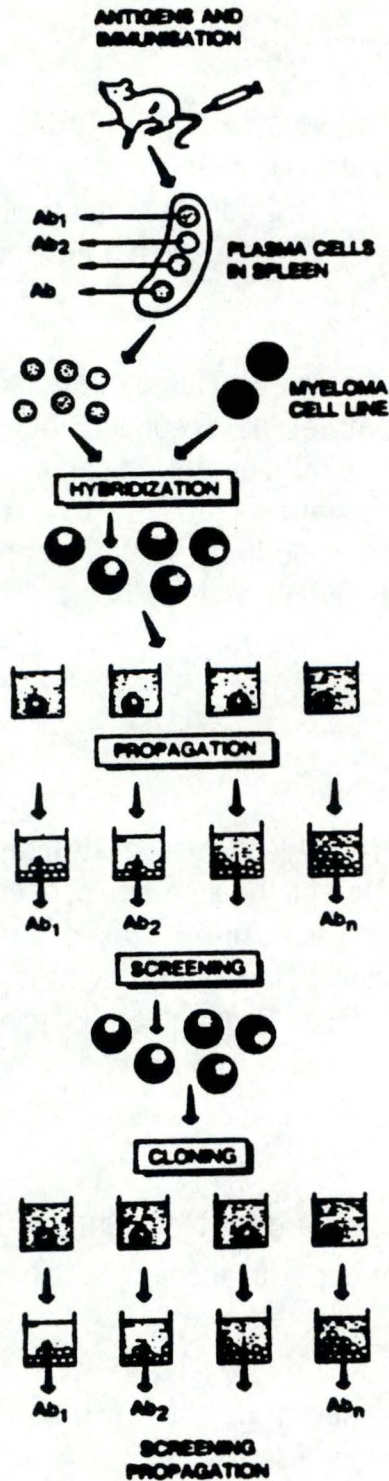


Fig. 15 : Schéma retraçant les grandes étapes suivies lors de la production d'anticorps monoclonaux. Après immunisation des souris, les spénocytes de la souris sont isolés et fusionnés avec un myélome (hybridation). Les hydridomes résultants de cette opération sont mis en culture en micropuits (propagation). Les surnageants de culture sont ensuite testés contre l'antigène avec lequel les souris ont été immunisées (screening). Les hydridomes sont clonés par dilutions limites et remis en culture. Ils seront encore testés par la suite pour vérifier s'ils sont encore producteur d'Ac spécifiques de l'Ag.

- Incubation de la membrane pendant une heure à température ambiante en présence de RAM-peroxydase (rabbit anti-mouse couplé à la peroxydase) (Amersham) diluée 500 fois dans le tampon TRIS-Na-Ca + 1 % de sérum de cheval.
- Lavage de la membrane comme ci-dessus.
- Révélation avec tampon TRIS-HCl 50 mM (pH 7,5) + 0,05 % de diaminobenzidine (Sigma) + 0,03 % d'H₂O₂.
- Arrêt la réaction par HCl 0,1 N.

2.3.3. Fusion et obtention des hybridomes.

2.3.3.1.- Principe et technique de fusion.

Principe.

La production d'anticorps monoclonaux est basée sur la fusion cellulaire entre des splénocytes et une lignée de myélomes. Les produits de fusion, les hybridomes, allient immortalité et production d'immunoglobulines. La sélection des hybridomes se base sur une complémentation enzymatique en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine et thymidine) entre splénocyte et cellule myélomateuse.

Technique de fusion.

La fusion est réalisée suivant la méthode mise au point par Köhler et Milstein en 1975 (57) avec quelques légères modifications. Le protocole de fusion est rapidement résumé au schéma de la figure 15.

2.3.3.2.- Animal et myélome utilisés

Animal: Souris syngénique de type BALB/c

Myélome: Lignée Sp2/O-Ag 14 non productrice d'immunoglobuline, dérivée d'un myélome X63-Ag8X BALB/c.

2.3.3.3.- Les milieux de culture:

- RPMI minimal (fig. 16)
RPMI 1640 (Gibco) + (par litre de milieu)
4,77 g Hapes (Sigma)

RPMI 1640 Medium¹

Component	074-01800 Powder mg/L
INORGANIC SALTS:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100.00
KCl	400.00
MgSO ₄ (anhyd.)	48.84
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—
MnSO ₄ · H ₂ O	—
NaCl	6000.00
NaHCO ₃	—
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	800.00
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	—
OTHER COMPONENTS:	
D-Glucose	2000.00
Glutathione (reduced)	1.00
HEPES	—
Phenol Red	5.00
VITAMINS:	
Biotin	0.20
D-Ca Pantothenate	0.25
Choline Chloride	3.00
Folic Acid	1.00
D-Inositol	35.00
Nicotinamide	1.00
Para-aminobenzoic Acid	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavin	0.20
Thiamine HCl	1.00
Vitamin B ₁₂	0.005
AMINO ACIDS:	
L-Arginine (free base)	200.00
L-Asparagine	50.00
L-Aspartic Acid	20.00
L-Cystine	—
L-Cystine · 2HCl	65.15
L-Glutamic Acid	20.00
L-Glutamine	300.00
Glycine	10.00
L-Histidine (free base)	15.00
L-Hydroxyproline	20.00
L-Isoleucine (allo free)	50.00
L-Leucine (methionine free)	50.00
L-Lysine · HCl	40.00
L-Methionine	15.00
L-Phenylalanine	15.00
L-Proline (hydroxy L-proline free)	20.00
L-Serine	30.00
L-Threonine (allo free)	20.00
L-Tryptophan	5.00
L-Tyrosine	—
L-Tyrosine (disodium salt)	28.83
L-Valine	20.00

¹ Moore, G.E., Gerner, R.E. and Franklin, H.A.

Fig. 16: Composition du milieu RPMI utilisé lors de la fusion.

0,85 g NaHCO₃ (Merck)

10 ml de glutamine 200mM (Gibco)

10 ml de pyruvate de Na (Gibco)

10 ml de mélange de pénicilline, streptomycine (Gibco)
pH 7,4 et filtré sur Sartorius avec membrane à 0,2 µm

- RPMI total

RPMI minimal + 10 % de HS (Horse serum, Gibco) et 5 % de FCS (Fetal calf serum, Gibco) décomplémenté par chauffage pendant 30 minutes à 50°C. Le pH est de 7,4 et le milieu est filtré comme précédemment.

- milieu HAT

RPMI total + 2 % de HAT concentré 50 fois (Gibco)

- milieu HT

RPMI total + 2 % de HT concentré 50 fois (Gibco)

2.3.4- Criblage des hydridomes.

2.3.4.1.- Principe.

Cette étape permet de détecter dans les produits de fusion les clones producteurs d'anticorps spécifique de l'antigène utilisé, ici en l'occurrence le polysaccharide injecté aux souris.

Ce "screening" est réalisé par la technique Elisa (38).

2.3.4.2.- Technique ELISA.

La technique ELISA ou Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay a été décrite pour la première fois par Engvall et Perlmann en 1971. En 1976, Clark et Adams utilisèrent le test immuno-enzymatique en phase solide pour détecter des virus chez les végétaux.

Il existe différentes manières de réaliser un test ELISA, dont la méthode directe et la méthode indirecte(37).

- Méthode directe (fig. 17).

On fixe l'antigène (Ag) sur un support et on le détecte avec un anticorps (Ac) spécifique couplé à une enzyme. Le désavantage de cette méthode est qu'elle nécessite un nouveau complexe Ac-enzyme pour chaque nouvel Ag testé.

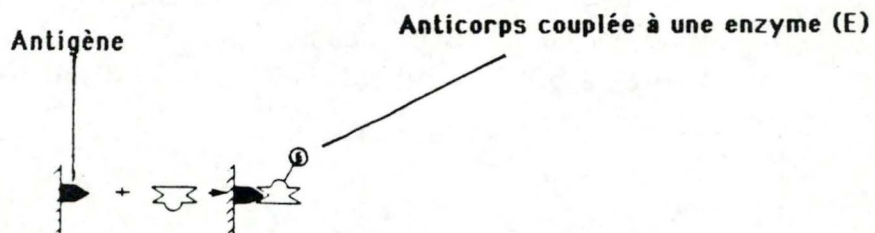


Fig. 17 : Elisa direct : L'antigène est immobilisé sur le support solide et sera ensuite reconnu par un anticorps spécifique couplé à une enzyme. Le désavantage de cette méthode est qu'il faut un nouveau complexe anticorps-enzyme pour chaque antigène testé.

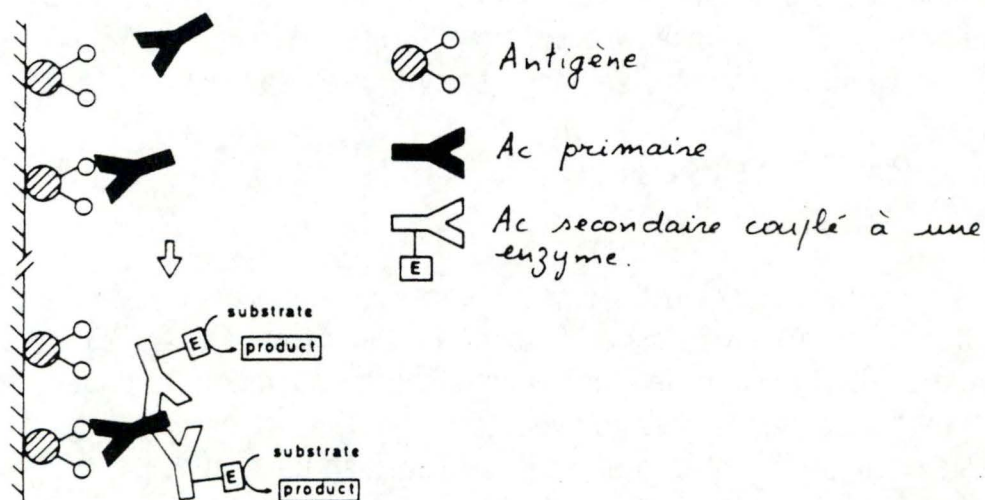


Fig. 18 : Elisa indirect : L'antigène est fixé sur le support solide et est reconnu par un anticorps primaire spécifique de cet antigène. Ce dernier sera, à son tour, reconnu par un anticorps secondaire anti-immunoglobuline couplé à une enzyme. Ce dernier complexe peut ainsi être utilisé pour des antigènes différents (37).

- Méthode indirecte (fig. 18).

On fixe l'Ag sur un support et celui-ci est reconnu par des Ac spécifiques qui eux-mêmes seront reconnus par des Ac dits secondaires anti-immunoglobulines, couplés à une enzyme. L'avantage de cette méthode est de pouvoir utiliser le même Ac secondaire pour toute une série d'Ag différents. L'Ac secondaire doit être produit dans une espèce animale différente de celle produisant l'Ac primaire. Il est cependant possible de contourner ce problème en utilisant les fragments $F(ab')_2$ qu'on fixe sur la phase solide pour immobiliser l'Ag (36,37,38) (test sandwich).

Que ce soit l'Ag ou l'Ac qui est fixé sur un support solide, on parlera toujours de test ELISA en phase hétérogène (37). La phase solide peut être du polystyrène, de la nitrocellulose, du papier, du verre, de l'agarose, de la cellulose ou du Sephacryl. Dans la pratique, on utilise le plus souvent les matières plastiques (type polystyrène ou PVC) et le dot-blot sur nitrocellulose, bien que ce dernier ne donne que des informations qualitatives (37).

Le dosage de l'Ag est basé sur la transformation d'un substrat peu ou pas coloré en produit très coloré. Les enzymes utilisées sont essentiellement la peroxydase, la β -galactosidase, la phosphatase alcaline, la malate déshydrogénase, la glucose-6-P- déshydrogénase, l'uréase et la ribonucléase (37).

Les avantages de la technique ELISA sont: (35)

- Sensibilité très élevée (échelle du ng/ml voire fg/ml (37)).
- Rapidité.
- Possibilité de traiter des centaines d'échantillons.
- Spécificité.
- Simplicité du matériel utilisé.
- Economie de réactifs.
- Automatisation possible.

On peut améliorer la sensibilité du test en utilisant la fluorescence ou la chémiluminescence. Par exemple, l'hydrolyse du 4-méthylumbelliferyl-D-galactopyranoside par la β -galactosidase donne le 4-méthylumbelliferyl permettant de détecter $5 \cdot 10^{-15}$ mg d'IgG/ml, soit 25000 molécules d'IgG. L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'elles nécessitent un appareillage sophistiqué, qui n'est rentable que si de nombreuses analyses doivent être effectuées (37).

2.3.4.3.-Protocole expérimental.

-Fixation de l'Ag sur le support.

1. On utilise une plaque de microtitration en polystyrène à haute capacité d'adsorption (Microwell Module F-8 Immunoquality 160 PCS, Nunc).
2. Dépôt de poly-L-lysine à 0,05 mg /ml à raison de 100 μ l/puits. On incube une heure à température ambiante.
3. Dépôt de l'Ag à une concentration de 200 μ g/ml à raison de 50 μ l/puits + 25 μ l/puits d'une solution de CaCl₂ 1 mM et NaCl 150 mM.

-Saturation.

La saturation se réalise au moyen d'une solution de gélatine à 200 μ g/ml dans un tampon TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,5 mM (pH 7,4) (tampon TRIS-Na-Ca). On dépose 200 μ l / puits et la saturation dure deux heures à 37°C

-Dépôt de l'Ac primaire.

Dépôt du surnageant pur ou dilué dans le tampon TRIS-Na-Ca à raison de 50 μ l/puits. Incubation de 1 heure à 37°C.

-Lavages.

Réalisés avec le tampon TRIS-Na-Ca + 0,1% de Tween-20.

-Dépôt de l'Ac secondaire.

Dépôt de RAM-peroxydase diluée 500 fois dans le tampon TRIS-Na-Ca à raison de 50 μ l/puits. Incubation de 1 heure à 37°C.

-Lavages.

voir ci-dessus.

-Révélation.

La révélation se fait avec une solution d'ABTS-H₂O₂-tampon citrate à raison de 50 μ l/puits. Incubation de 15 minutes à 37°C.

Le tampon citrate se compose de 20,5 g/l de Na₂HPO₄ . 2H₂O (Merck), 8,9 g/l d'acide citrique (UCB) à pH 5,6. La solution de révélation contient 4 mg d'ABTS + 20 μ l d'H₂O₂ / 6 ml de tampon citrate.

-Lecture.

Lecteur ELISA Titertek (absorbance à 405 nm).

Rem. : ce protocole expérimental a été légèrement modifié en cours de travail pour optimiser les réponses de l'anticorps monoclonal produit.

2.3.5.- Détermination de l'isotypie.

2.3.5.1.- Principe.

Il s'agit d'une application de la technique ELISA de type "sandwich". L'anticorps dont on veut déterminer l'isotypie est considéré dans ce test comme un antigène. Un anticorps anti-souris est immobilisé sur la phase solide pour fixer les immunoglobulines du surnageant de culture. Celles-ci sont alors reconnues par un deuxième anticorps spécifique de la partie constante μ , γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} de l'immunoglobuline et couplé à la biotine. La révélation du test est basée sur la très grande affinité de la streptavidine (couplée à la peroxydase) pour la biotine.

2.3.5.2.- Protocole expérimental

- Déposer 50 μ l / puits (PVC souple) de RAM (rabbit anti-mouse) (10 μ g /ml en PBS). Incubation pendant une nuit à 4°C.
- Saturer avec une solution d'ovalbumine à 2 % dans PBS. Incuber 1h à 37°C.
- Déposer 50 μ l / puits de surnageant pur. Incuber 1 h à 37°C.
- Laver en PBS + 0,1 % Tween 20.
- Déposer l'anticorps secondaire
 - Ac anti- IgG₁
 - Ac anti-IgG_{2a}
 - Ac anti- IgG_{2b}
 - Ac anti- IgM complexé avec de la biotine (diluer 1000 fois dans PBS et incuber 1 h à 37°C).
- Laver en PBS + 0,1 % de Tween 20
- Déposer 50 μ l /puits du complexe streptavidine-biotine-peroxydase dilué 1500 fois dans PBS. Incuber 30 minutes à 37°C.
- Laver en PBS + 0,1 % Tween 20.
- Révélation avec ABTS-H₂O₂-tampon citrate et incuber 15 minutes à 37°C.

Le tampon PBS se compose de

1,44 g.l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O
0,20 g.l ⁻¹	KH ₂ PO ₄
0,20 g.l ⁻¹	KCl
8,00 g.l ⁻¹	NaCl

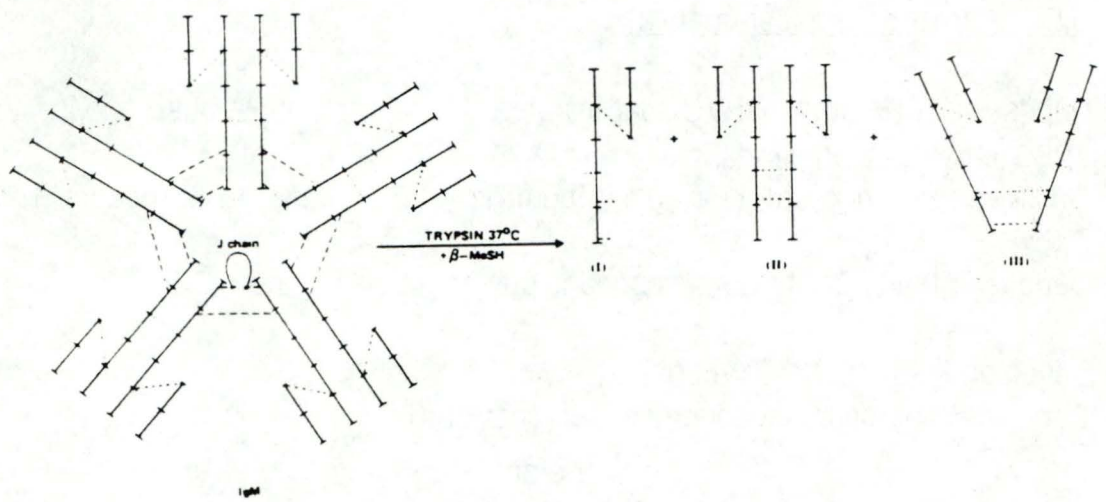


Fig. 19: Schéma montrant les produits d'hydrolyse d'IgM par la trypsine à 37°C et en présence de mercaptoéthanol (5).

2.3.6.- Production de l'ascite.

L'obtention d'anticorps monoclonaux à partir des hybridomes peut se faire soit *in vitro* soit *in vivo*.

Cette seconde alternative consiste à injecter $2 \cdot 10^6$ hybridomes dans la cavité péritonéale d'une souris BALB/c sensibilisée 10 jours auparavant par une injection intrapéritonéale de pristane (Aldrich). L'ascite est récupéré 2 à 3 jours après l'injection. La multiplication de l'hybridome dans la souris est peu coûteuse et optimale car la souris apporte tous les facteurs de croissance permettant d'obtenir de fortes concentrations en anticorps.

Le désavantage de cette technique est la présence d'impuretés dans le produit récolté. Le procédé classique utilisé pour la purification de l'ascite est la chromatographie d'affinité sur protéine A ou sur protéine G pour les IgG.

Pour les IgM, on utilise plutôt la précipitation au sulfate d'ammonium à 40 % (w:v). Après centrifugation à 4000 rpm, le culot est remis en suspension dans du PBS et dialysé contre du PBS à 4°C. L'ascite est retesté en ELISA.

2.3.7.- Hydrolyse des IgM à la trypsine.

Protocole expérimental pour l'hydrolyse.

-Les IgM monoclonales (ascites) à une concentration de 1 mg/ml dans un tampon TRIS 50mM, NaCl 150mM, CaCl_2 20 mM pH 8,0 sont digérées à la trypsine (Sigma) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 5 heures à 37°C.

-On ajoute ensuite du mercaptoéthanol à une concentration finale de 0,01 M pour réduire les ponts disulfures, et on poursuit l'incubation pendant 5 minutes à 37°C.

-On ajoute de l'inhibiteur de trypsine de soja (Sigma) à une concentration finale de 0,1 mg/ml, et on poursuit l'incubation pendant 5 minutes à 37°C.

-On ajoute de l'iodoacétamide (Sigma) à une concentration finale de 0,06 M et la réaction se termine par une incubation pendant 10 minutes à température ambiante.

Cette hydrolyse libère des fragments protéiques (fig. 19) d'un poids moléculaire moyen de 200.000 daltons (5).

Cet hydrolysate est chromatographié sur tamis moléculaire Séphacryl S-200. On utilise une colonne de 50 x 1,5 cm (avec 45 cm de gel, $V_0 = 25$ ml). Le gel est équilibré dans le tampon utilisé lors de l'hydrolyse. Nous travaillons avec un débit de 15 ml \cdot h⁻¹. La chromatographie est suivie par lecture de l'absorbance à 280 nm. Les fractions récoltées à la sortie de la colonne sont testées en ELISA.

2.4.- Contribution à l'identification de l'épitope reconnu par l'AcMo.

Après la production d'AcMo, après caractérisation de leurs conditions de réponse en ELISA, nous avons, par hydrolyse enzymatique, tenté d'isoler le plus petit fragment oligosaccharidique contenant l'épitope reconnu par l'AcMo.

2.4.1.- Digestion enzymatique.

Nous avons utilisé une pectinase et une hémicellulase commerciales pour réaliser une digestion partielle du polysaccharide Fa. Les hydrolyses ont duré respectivement 24, 56 et 120 heures pour l'hémicellulase; 56 heures pour la pectinase. Chaque hydrolyse a nécessité 30 mg de polysaccharides et 0,7 unité enzymatique par mg de polysaccharide.

Après l'hydrolyse, nous aurions pu éliminer l'enzyme au moyen de TFA 13 N à raison de 1 μ l de TFA par μ g de polysaccharide, mais nous avons préféré la conserver car elle sort au volume mort du gel utilisé pour le fractionnement des produits d'hydrolyse.

2.4.2.- Etude des produits d'hydrolyse.

a.- Fractionnement sur tamis moléculaire.

L'hydrolysate (1 ml) est passé sur gel de type Bio-Gel P6 (BioRad). Il s'agit d'un gel de polyacrylamide qui fractionne les protéines de poids moléculaire compris entre 1000 et 6000 daltons (le gel Séphacryl S-200 utilisé pour isoler le polysaccharide Fa fractionne entre 5000 et 250.000 daltons).

Nous utilisons une colonne de 50 x 1,5 cm (48 cm de gel). Le débit naturel de la colonne est de 80 ml . h⁻¹ et le débit opérationnel est de 15 ml . h⁻¹. On lit l'absorbance à 248,5 nm et on récolte des fractions de 3,3 ml qui sont révélées à l'orcinol sulfurique (voir 2.2.1). Les fractions positives à l'orcinol sont rassemblées et concentrées.

b.- Test ELISA sur les produits d'hydrolyse.

Les fractions récoltées lors du fractionnement sont testées en ELISA vis-à-vis de l'AcMo suivant le protocole expérimental final décrit dans la partie "résultats et discussions".

c.- Analyse des fractions positives en ELISA.

-On réalise d'abord une étude qualitative par chromatographie sur couche mince après hydrolyse des fractions au TFA 2 N suivant la

méthode décrite au point 2.2.2.5.

-On réalise ensuite une analyse quantitative en chromatographie en phase gazeuse (voir la méthode des acétates d'alditols au point 2.2.2.6.).

d- Détermination de la taille de l'épitope.

Nous avons réalisé un étalonnage du gel en utilisant du dextran, du maltose d'un degré de polymérisation (DP) de 7 et du glucose. Le fractionnement a été réalisé suivant la méthode décrite précédemment.

Ceci nous a permis d'établir une droite d'étalonnage, de trouver le DP approximatif des fragments reconnus par l'AcMo.

RESULTATS ET DISCUSSIONS.

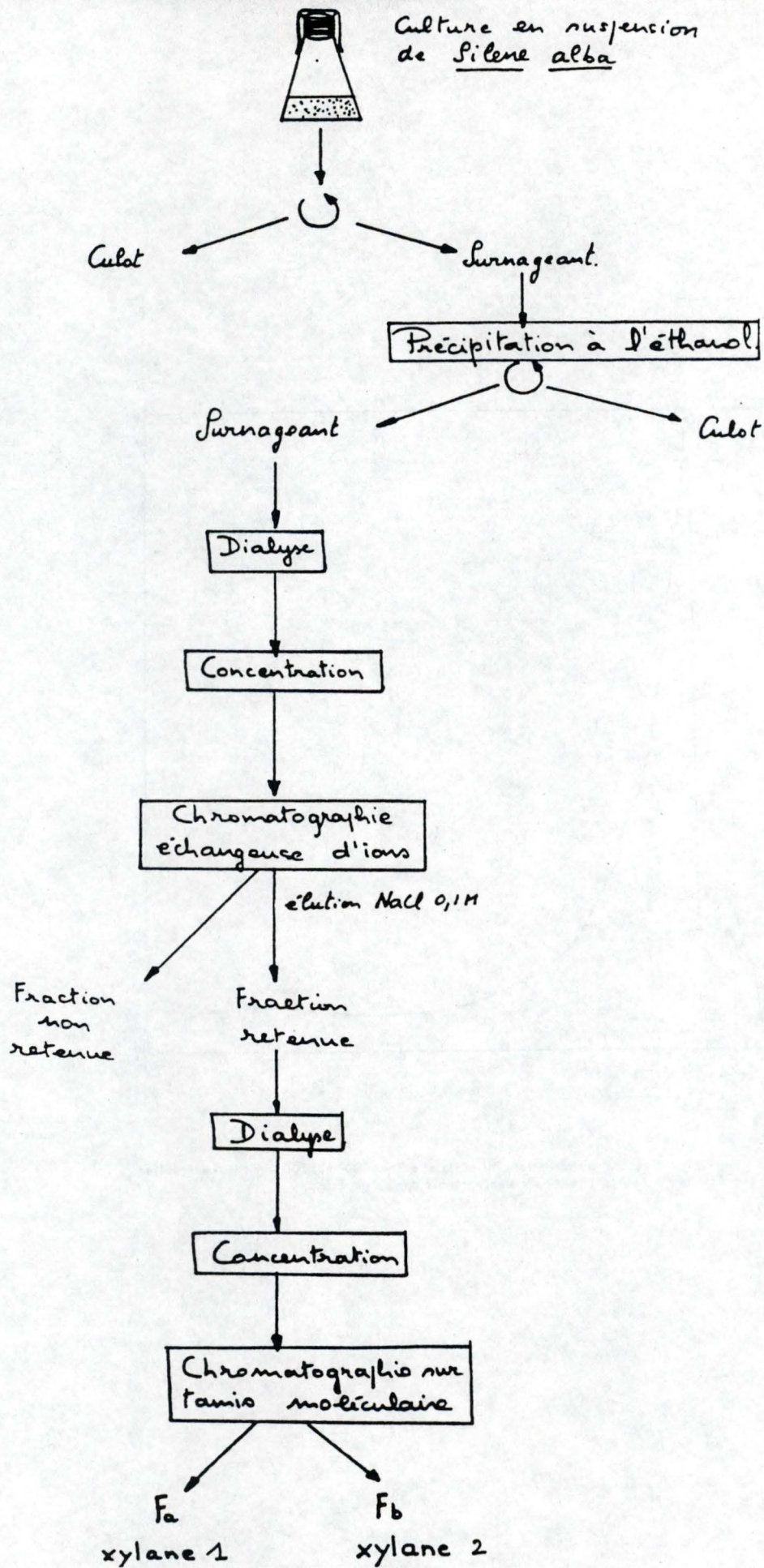
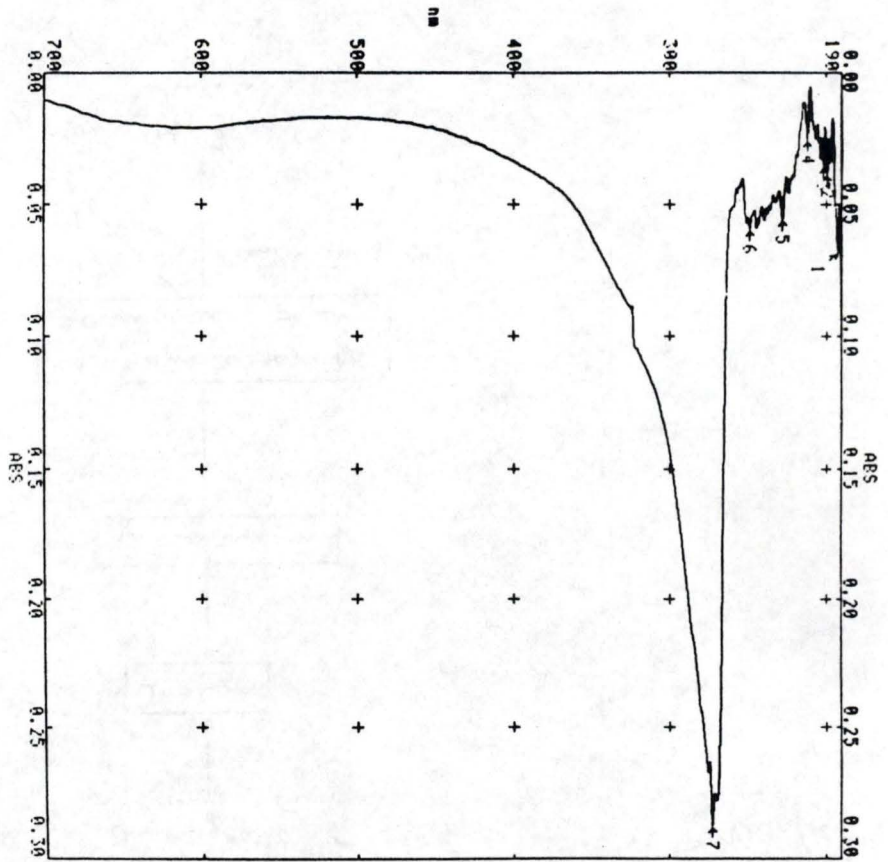


Fig. 20 : Représentation schématique du protocole de purification utilisé.

Fig. 21 : Spectre d'absorption UV-visible entre 190 et 700 nm de la fraction précipitée à l'éthanol avant chromatographie d'échange d'ions.



3.1.-Purification des polysaccharides.

Purification sur Séphadex DEAE-A50.

Avant de discuter les résultats de la purification rappelons (fig. 20) le protocole suivi.

Le surnageant récupéré après précipitation à l'alcool a été débarrassé de l'éthanol par évaporation. Nous avons réalisé un balayage en longueur d'onde de cette fraction afin de déterminer sa longueur d'onde optimale d'absorption pour en suivre l'élution. Le spectre d'absorption UV-visible (fig. 21) montrait un maximum d'absorption à 270 nm (pic 7, fig. 21) et 248 nm (pic 6, fig. 21). Nous avons suivi l'élution à 248 nm pour éviter de l'échelle d'enregistrement du spectrophotomètre.

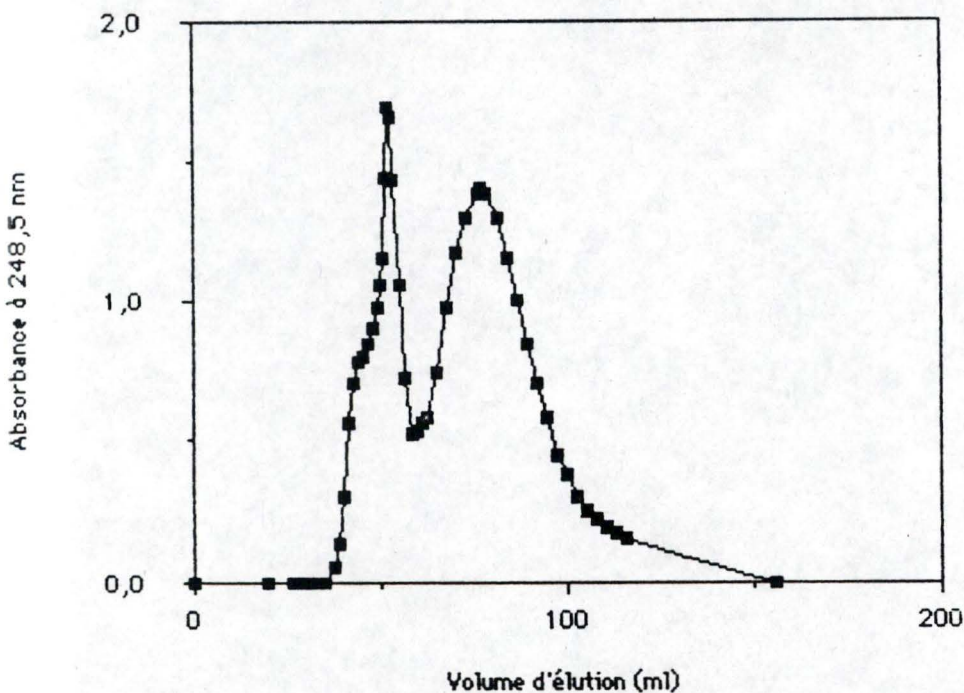


Fig. 22 : Schéma d'élution sur Séphadex DEAE-A50. Ce chromatogramme présente deux pics d'élution. Le premier pic correspond vraisemblablement à l'élution d'une fraction peu chargée quittant le gel quand la molarité en NaCl n'est pas encore égale à 0,1 M. Conformément au protocole reçu, les deux fractions ont été rassemblées, dialysées et concentrées avant d'être appliquées sur une colonne de perméation de gel Séphacryl S-200.

Le schéma d'élution sur Séphadex DEAE-A50 à 0,1 M en NaCl (fig. 22) présentait deux pics d'élution insuffisamment résolus. La molarité en NaCl n'atteignant pas immédiatement la valeur de 0,1 M en sortie de colonne, le premier pic d'élution correspondait probablement à un polysaccharide moins chargé, détaché du gel par une force ionique plus faible.

Pour séparer les deux polysaccharides, nous avons dû faire appel à une chromatographie sur tamis moléculaire, conformément au protocole communiqué par le laboratoire Lillois. La première chromatographie d'échange d'ions aurait peut-être suffi à séparer ces polymères si on avait utilisé un gradient de NaCl au lieu d'une élution à molarité fixe. La première immunisation des souris ayant été faite avec les polymères Fa et Fb isolés à Lille suivant ce protocole, nous avons été obligés de nous y conformer.

Chromatographie sur tamis moléculaire sur Séphacryl S-200.

Le schéma d'élution donne deux pics (fig. 23).

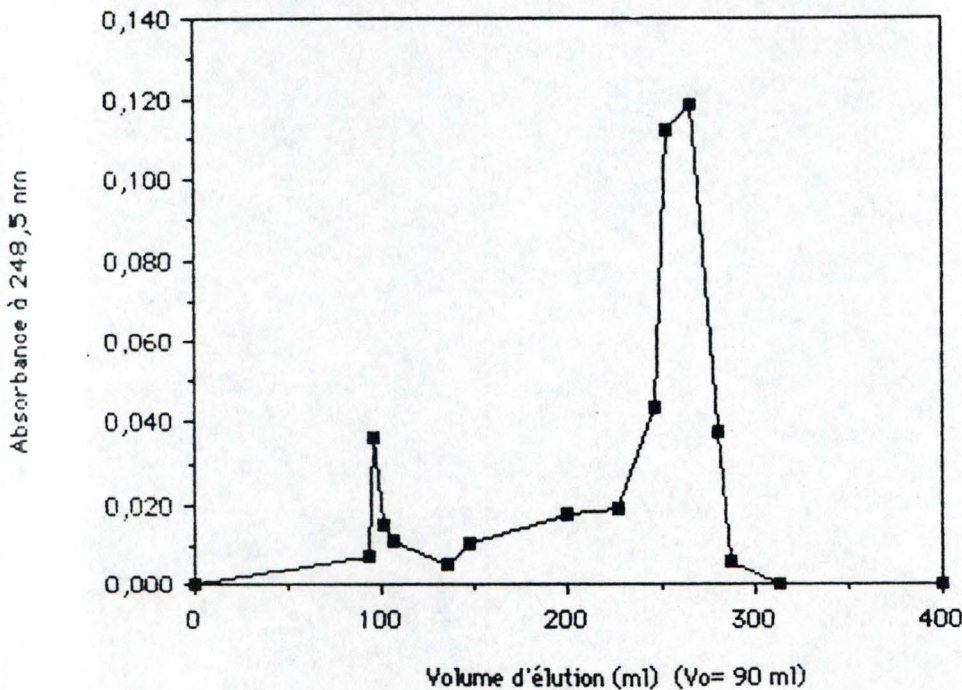


Fig. 23 : Schéma d'élution sur Séphacryl S-200 de la fraction totale récupérée à la sortie de la colonne échangeuse d'ions lors de l'élution à 0,1 M NaCl. Cette chromatographie permet de séparer deux pics: la fraction s'éluant à V_0 sera appelée la fraction Fa; l'autre Fb. Ces deux fractions seront utilisées pour immuniser des souris en vue de produire des anticorps monoclonaux.

Un test à l'orcinoïde sulfurique permet de montrer qu'il s'agit bien de deux fractions polysaccharidiques. Le premier polysaccharide, que nous appellerons Fa, quitte le gel à V_0 ; le deuxième, Fb, quitte le gel à un volume d'élution de 250 ml. Ce deuxième pic n'est probablement pas homogène (asymétrie du pic).

Rendement.

Un litre de surnageant de culture en suspension de *Silene alba* permet de récupérer 8,5 mg de polysaccharide Fa et 107 mg de polysaccharide Fb pour 187 mg de polysaccharides totaux obtenus en sortie de la chromatographie échangeuse d'ions c-à-d 4,5 et 95,5 % respectivement.

Considération générale sur l'isolement des polysaccharides.

A l'une ou l'autre exception près et contrairement aux protéines, il n'existe pas de critères absolus de pureté pour les polysaccharides. En effet, les polysaccharides subissent des remaniements, des dépolymérisations, des concaténations ainsi que des liaisons covalentes. Chaque fraction glycosidique isolée contient donc probablement des polysaccharides dont la masse moléculaire et la composition globale sont identiques, mais pouvant comporter de légères différences de polymère à polymère. Cette caractéristique est liée à une synthèse particulière des polysaccharides : il y a une synthèse précise et une synthèse imprécise (56). La première fait intervenir des enzymes qui sont spécifiques des résidus glycosylés à greffer, du mode de liaison entre résidus et capables de donner une certaine régularité à la structure primaire du polysaccharide. Ce type de synthèse permet de classer un polysaccharide dans une famille donnée de polymères pariétaux. La deuxième, quant à elle, utilise des enzymes qui sont incapables de conférer une régularité à la structure primaire du polymère. Ce dernier aspect de la synthèse des polysaccharides montre qu'il est impossible d'affirmer qu'un polysaccharide est pur (56).

Durant ce travail, nous parlerons toujours de polysaccharide Fa ou Fb, sachant bien que leur pureté est à nuancer avec les données précédentes.

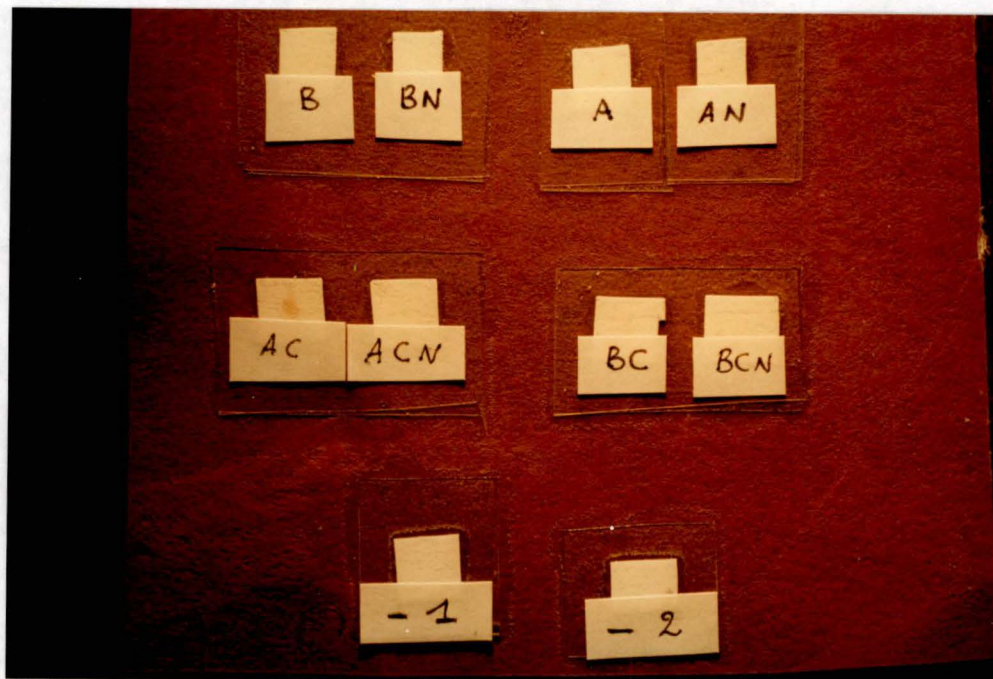


Photo n° 2 : Dot-blot sur nitrocellulose testant les polysérums pour la production d'anticorps anti-polysaccharide Fa et anti-polysaccharide Fb.

-1 : Sérum anti-Fa contre la protéine de saturation

-2 : Sérum anti-Fb contre la protéine de saturation

ACN : Sérum naïf contre Fa + Ca²⁺

AC : Sérum anti-Fa contre Fa + Ca²⁺

AN : Sérum naïf contre Fa

A : Sérum anti-Fa contre Fa

BCN : Sérum naïf contre Fb + Ca²⁺

BC : Sérum anti-Fb contre Fb + Ca²⁺

BN : Sérum naïf contre Fb

B : Sérum anti-Fb contre Fb

On observe une réponse du polysérum anti-Fa en présence et en absence de Ca²⁺, la réponse étant cependant plus forte en présence de Ca²⁺. Le polysérum anti-Fb ne donne pas de réponse.

3.2.- Analyse des polysérums des souris.

Les polysaccharides Fa et Fb ont été injectés non couplés à des souris pour la production des anticorps monoclonaux. Avant d'aller plus loin dans l'analyse des polysaccharides, il était indispensable de tester la présence d'anticorps anti-polysaccharide Fa ou Fb. Il n'était en effet pas certain, a priori, que les polysaccharides injectés soient immunogènes et qu'il ne faille pas réimmuniser après couplage du polysaccharide avec une protéine lui conférant une plus grande immunogénicité.

Cette analyse a été réalisée en dot-blot sur nitrocellulose et ne permet d'avoir que des résultats qualitatifs. Nous disposions des polysérums des souris immunisées par injection du polysaccharide Fa d'une part, du polysaccharide Fb d'autre part.

Les contrôles utilisés en dot-blot étaient:

- un contrôle négatif pour vérifier l'absence de fixation non spécifique du second Ac en utilisant un sérum de souris naïve.
- un contrôle négatif avec le sérum des souris immunisées mais sans Ag pour vérifier l'absence de fixation non spécifique de l'Ac primaire.

Les tests ont également été réalisés en absence et en présence de calcium. Les résultats de ce dot-blot sont visibles au niveau de la photo n°2. Les différentes abréviations utilisées sont explicitées ci-dessous:

- B= Sérum anti-Fb contre Fb
- BN= Sérum naïf contre Fb
- BC= Sérum anti-Fb contre Fb + Ca²⁺
- BCN= Sérum naïf contre Fb + Ca²⁺
- A= Sérum anti-Fa contre Fa
- AN= Sérum naïf contre Fa
- AC= Sérum anti-Fa contre Fa + Ca²⁺
- ACN= Sérum naïf contre Fa + Ca²⁺
- 1= Sérum anti-Fa contre la protéine de saturation
- 2= Sérum anti-Fb contre la protéine de saturation

Nous pouvons observer une réponse du polysérum anti-Fa en présence et en absence de Ca²⁺. La réponse est cependant plus importante en présence de Ca²⁺. Le polysaccharide Fb ne génère pas de réponse, ni en présence, ni en absence de Ca²⁺. Le polysaccharide Fb n'est donc pas immunogène pour les souris. Il n'y a pas eu de fixation non spécifique ni du premier, ni du second anticorps, et pas de réponse croisée avec la protéine de saturation. Seul le polysaccharide Fa a été traité plus en détail et les souris immunisées contre ce polysaccharide ont été utilisées pour la fusion.

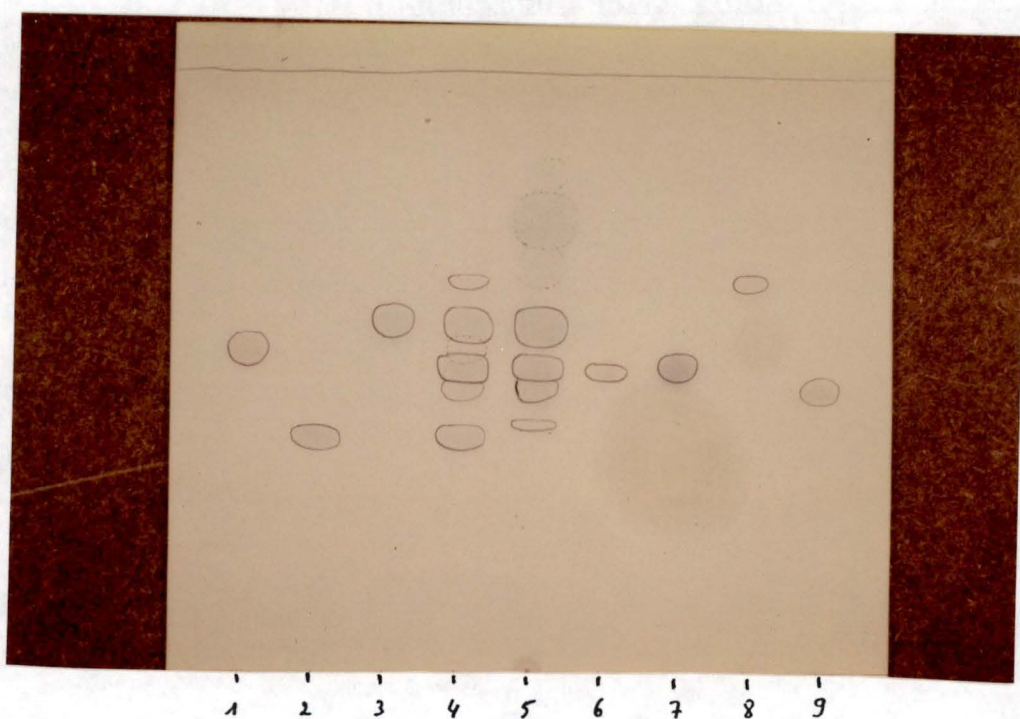


Photo n° 3: Chromatographie sur couche mince analysant la composition en oses neutres et en acides uroniques du polysaccharide Fa.

- 1. : mannose
- 2. : acide galacturonique
- 3. : xylose
- 4. : mélange des standards
- 5. : échantillon du polysaccharide Fa hydrolysé au TFA pendant 2 H à 120°C
- 6. : glucose
- 7. : arabinose
- 8. : rhamnose
- 9. : galactose

Le polysaccharide Fa contient manifestement du xylose, du galactose, des traces de mannose. Il subsiste cependant encore un spot à une hauteur qui peut correspondre soit au glucose et/ou à l'arabinose.

3.3.- Analyse sommaire de la composition glycosidique du polysaccharide Fa.

Pour mieux caractériser le polysaccharide contre lequel nous allons produire des AcMo, nous avons successivement dosé les sucres neutres, les acides uroniques et les sucres réducteurs par méthode colorimétrique. Une chromatographie en couche mince a permis de déterminer qualitativement les oses présents. Finalement, la quantité de chacun des oses neutres a été déterminée par chromatographie gazeuse.

3.3.1.- Dosage des sucres neutres par la méthode de Dubois.

Le dosage des sucres neutres sur le polysaccharide Fa à 1,5 mg/ml dilué 20 fois a donné une absorbance de 1,04 unités, soit une concentration totale en oses neutres de 1,37 mg/ml. Ceci équivaut à 91,6 % d'oses neutres par rapport aux sucres totaux.

3.3.2.- Dosage des acides uroniques par la méthode au méthahydroxybiphényle.

Une solution de polysaccharide Fa à une concentration de 3,022 mg/ml a donné une absorbance de 1,18 unités, ce qui correspond à une concentration totale de 96 µg/ml soit 3,2 % d'acides uroniques.

3.3.3.- Dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNSA.

Une solution de polysaccharide Fa à une concentration de 6 mg/ml contenait 224 µg de sucres réducteurs/ml soit 3,7 % des sucres totaux.

3.3.4.- Chromatographie sur couche mince.

-Hydrolyse au TFA.

Ce même polysaccharide Fa, hydrolysé au TFA, contenait une quantité importante de xylose et de galactose (photo 3). Il subsistait une tache de migration correspondant au glucose et/ou à l'arabinose. La couche mince n'a pas permis de mettre en évidence ni d'acide galacturonique, ni d'acide glucuronique soit parce que l'hydrolyse n'a pas été assez longue (le groupement carboxylique protège la liaison glycosidique du clivage par le TFA), soit parce que ces sucres sont présents en trop faible quantité.

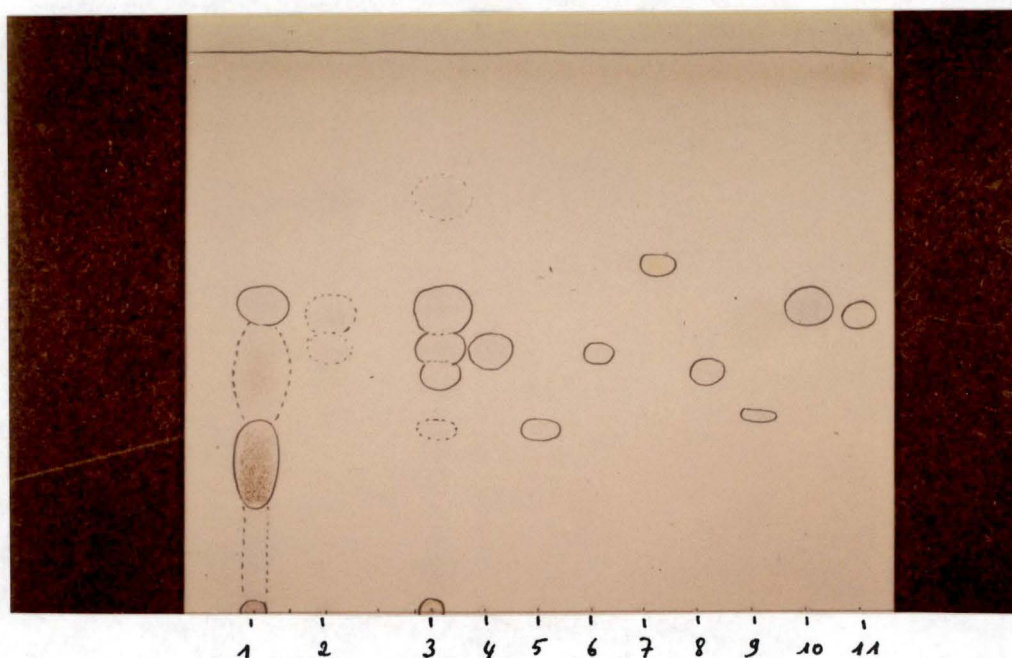


Photo n° 4: Chromatographie sur couche mince montrant la sensibilité du polysaccharide Fa à différentes enzymes commerciales.

1. : Fa hydrolysé à l'hémicellulase pendant 36 H
2. : Fa hydrolysé au TFA pendant 2 H à 120 °C
3. : Fa hydrolysé à la pectinase pendant 36 H
4. : arabinose
5. : acide galacturonique
6. : glucose
7. : rhamnose
8. : galactose
9. : acide glucuronique
10. : xylose
11. : fucose

Une digestion à l'hémicellulase libère des fragments oligosaccharidiques de degré de polymérisation variable (tache allongée). La digestion à la pectinase pose problème car l'action de celle-ci devrait se manifester par la libération d'une grande quantité d'acide galacturonique or celui-ci n'est présent qu'à l'état de traces, mais d'autres sucres sont libérés tels le xylose, l'arabinose et le galactose. Apparemment, le polysaccharide Fa est très peu sensible à la pectinase et il faut admettre soit que la solution de pectinase contient des sucres contaminants, soit qu'elle contient une ou plusieurs autres activités enzymatiques expliquant la libération d'oses autres que l'acide galacturonique.

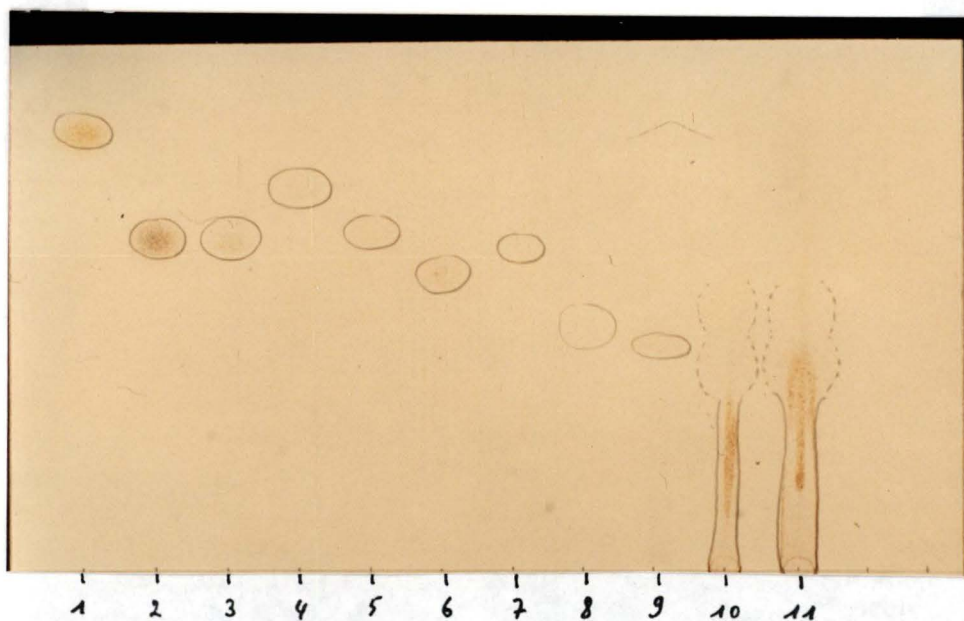


Photo n° 4bis : Chromatographie sur couche mince montrant que la solution de pectinase commerciale utilisée ne contient pas de monomères contaminants mais bien des oligomères contaminants de faible degré de polymérisation.

- 1 : rhamnose**
- 2 : fructose**
- 3 : arabinose**
- 4 : xylose**
- 5 : mannose**
- 6 : galactose**
- 7 : glucose**
- 8 : acide glucuronique**
- 9 : acide galacturonique**
- 10 et 11 : dépôt de 5 et 10 μ l de la solution de pectinase**

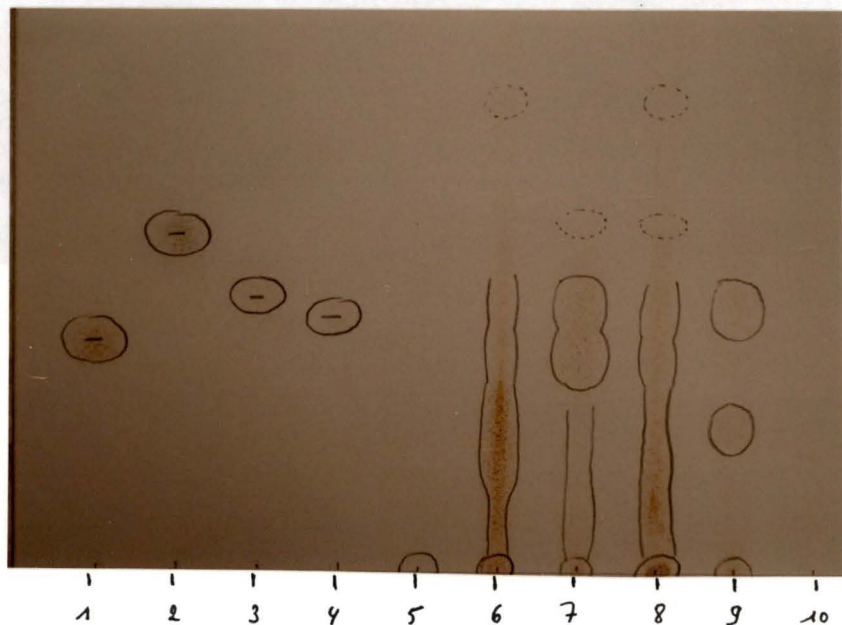


Photo n° 5: Chromatographie sur couche mince du polysaccharide Fa hydrolysé à la driselase.

1. : galactose
2. : xylose
3. : arabinose
4. : glucose
5. : Fa non hydrolysé
6. : produits d'hydrolyse à la driselase (16 H de digestion) non traités au TFA (hydrolyse réalisée dans l'eau)
7. : produits d'hydrolyse à la driselase (16 H de digestion) traités au TFA pour éliminer l'enzyme (hydrolyse réalisée dans l'eau)
8. : produits d'hydrolyse à la driselase (16 H de digestion) non traités au TFA (hydrolyse réalisée dans un mélange eau-acide acétique-pyridine dans un rapport 23:1:1)
9. : produits d'hydrolyse à la driselase (16 H de digestion) traités au TFA pour éliminer l'enzyme (hydrolyse réalisée dans le même mélange que 8)
10. : driselase seule

La driselase est un mélange enzymatique permettant de faire la distinction entre xylane et xyloglucane. Seules les xylanes digérées à la driselase libère du xylose. Le polysaccharide Fa libérant une faible quantité de xylose, nous pouvons l'identifier à une hémicellulose de type xylane. Ce mélange enzymatique libérant non seulement des monomères, mais également des oligomères, il nous est impossible d'identifier la nature des autres substances migrant en couche mince faute d'avoir ces oligomères comme témoins. On note également que les oligomères de faible masse moléculaire révélés quand il n'y a pas de traitement au TFA, disparaissent une fois traités au TFA et repris dans l'éthanol.

-Hydrolyse par la pectinase et l'hémicellulase.

Une chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse à la pectinase (photo 4) a révélé la libération de xylose, d'arabinose et de galactose, alors que l'action de la pectinase sur une pectine aurait dû se manifester par une libération importante d'acide galacturonique. La présence de ces trois oses neutres est probablement due à l'action du TFA 13 N utilisé pour éliminer l'enzyme. Cette préparation enzymatique n'est pas adéquate pour une étude enzymatique stricte : une chromatographie sur couche mince de la solution de pectinase a montré que celle-ci contient des fragments glycosidiques de faible degré de polymérisation (Photo n° 4bis). De plus, une électrophorèse de cette pectinase a révélé plusieurs bandes protéiques (P. Baes , communication personnelle). Cette digestion enzymatique montre néanmoins que le polysaccharide Fa est très peu sensible à l'action de la pectinase.

Les résultats de l'hydrolyse à l'hémicellulase sont visibles sur la photo 4. On a pu ainsi révéler, sous la forme d'une tache allongée ne correspondant à aucun monomère utilisé comme standard, la présence de fragments polysaccharidiques de petite taille pouvant migrer en couche mince. On observe également au bas de la chromatographie, la présence de polysaccharides de trop grande taille pour migrer. Une chromatographie sur couche mince d'une solution d'hémicellulase a été réalisée ultérieurement et n' a pas révélé la présence de contaminants glycosylés.

Nous reviendrons sur ces résultats d'hydrolyse au § 3.8.

-Hydrolyse à la driselase (photo 5).

La chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa par la driselase a mis en évidence une certaine quantité de xylose. On peut donc conclure provisoirement que le polysaccharide Fa était une xylane.

3.3.5.-Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

L'analyse en CPG du polysaccharide Fa hydrolysé au TFA a complété les résultats obtenus en couche mince.

Le chromatogramme (fig. 24, p. 38) montre des traces de mannose et de rhamnose (jamais mis en évidence en couche mince). Les autres sucres majoritaires sont l'arabinose (16,5 %), le xylose (37,8 %), le galactose (17,9 %) et le glucose (24,3 %). Ces pourcentages ont été calculés par rapport aux oses neutres totaux, la méthode des acétates d'alditols ne permettant pas de mettre en évidence les acides uroniques.

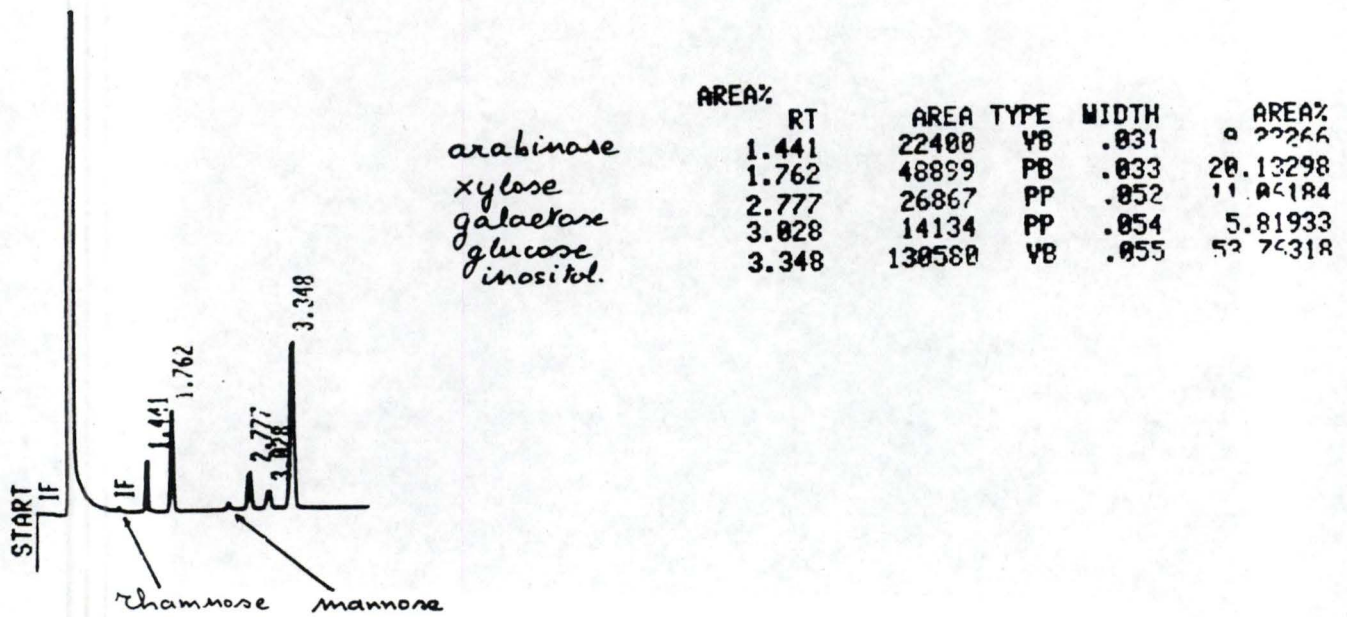


Fig. 24 : Chromatogramme des acétates d'alditols obtenus à partir des produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa par le TFA 2N.

L'utilisation d'un standard interne (inositol avec le temps de rétention de 3,348 minutes) a permis de calculer que le polysaccharide Fa contient 16,5 % d'arabinose, 37,8 % de xylose, 17,9 % de galactose, 24,3 % de glucose et des traces de mannose et de rhamnose.

Le polysaccharide Fa, faiblement acide et très peu hydrolysé par la pectinase, est une xylane, ainsi qu'en attestent la digestion à la driselase et la composition en oses neutres.

Nous avons donc, à ce moment, un polysaccharide Fa caractérisé quant à sa composition monomérique et un polysérum de souris répondant positivement en ELISA à la présence de polysaccharide. L'étape suivante de notre travail a été de produire des anticorps monoclonaux et d'en préciser la nature des épitopes reconnus. Un préalable indispensable était bien sûr de cribler les clones obtenus.

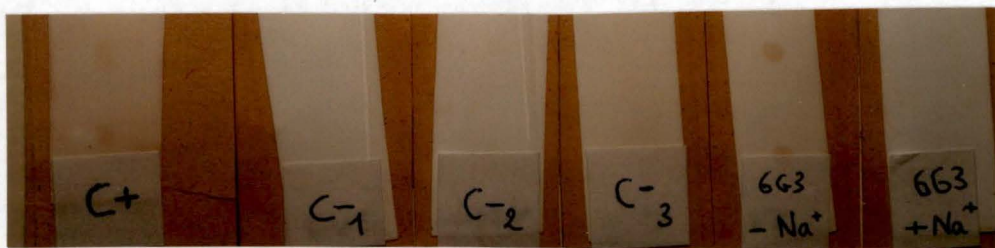


Photo N° 6 : Dot-blot sur nitrocellulose testant la réponse de L'AcMo 6G3 sur le polysaccharide Fa.

C+ : Sérum des souris immunisées contre le polysaccharide Fa

C-1 : contrôle négatif en remplaçant le 6G3 par l'AcMo 11B2 (anti-Ac anti-classe I de bovin

C-2 : contrôle négatif en remplaçant le 6G3 par le tampon

C-3 : contrôle négatif en remplaçant le 6G3 par l'AcMo 2F4 anti-pectine

6G3+Na+ : 6G3 sur Fa, tampon de lavage contenant 150 mM de NaCl

6G3-Na+ : 6G3 sur Fa, tampon de lavage ne contenant pas de NaCl

On constate que le 6G3 ne reconnaît le polysaccharide Fa que si le tampon de lavage ne contient pas de NaCl.

3.4.-Le criblage.

Après la fusion, nous disposions de 800 hybridomes que nous avons testés en ELISA pour la production d'AcMo anti-polysaccharide Fa. Le test a également été réalisé en parallèle sur la pectine Sigma pour la production éventuelle d'AcMo anti-pectine.

Le criblage a permis de trouver 3 clones anti-polysaccharide Fa (clones 6G3, 1H11 et 2A9) et aucun clone anti-pectine. Le 6G3 répondait le mieux en ELISA.

Nous avons retesté les clones en dot-blot sur nitrocellulose. Ce test n'a pu être réalisé qu'en absence de NaCl dans le tampon de lavage (voir photo 6). Les clones 1H11 et 2A9, remis en culture après cryoconservation, ont cependant cessé de produire des immunoglobulines.

- Détermination de l'isotypie.

Le clone 6G3 a été subcloné par la méthode des dilutions limites pour se mettre dans les conditions optimales de production d'AcMo, bien que l'état monoclonal ne puisse pas être prouvé. Les contrôles utilisés dans la recherche de l'isotypie étaient des AcMo anti-pectine : les clones 2F4, 1C7 et 7F7, respectivement une IgG₁ et deux IgM. Nous disposions pour le test de 3 subclones du clone 6G3 d'origine, répondant le mieux en ELISA sur le polysaccharide Fa. Les 3 subclones ont montré une isotypie de type IgM. Dans un polysérum, les IgM sont efficaces par effet bonus, mais leur utilisation en tant qu' IgM n'est pas très commode : ils sont très peu affines vis-à-vis de leur épitope. De plus, leur faible affinité les exclut d'une éventuelle utilisation dans des chromatographies d'affinité, et leur masse moléculaire élevée pose problème en immunocytochimie. Il est cependant possible de contourner ce problème en hydrolysant les IgM en monomères d'une affinité plus grande pour leur Ag et plus commodes en microscopie (5).

Technique ELISA utilisée lors du criblage des hybridomes.

-Fixation de l'Ag sur le support.

1. On utilise une plaque de microtitration en polystyrène à haute capacité d'adsorption (Microwell Module F-8 Immunoquality 160 PCS, Nunc).
2. Dépôt de poly-L-lysine à 0,05 mg/ml à raison de 100 µl/puits. On incube une heure à température ambiante.
3. Dépôt de l'Ag à une concentration de 200 µg/ml à raison de 50 µl/puits + 25 µl/puits d'une solution de CaCl₂ 1 mM et NaCl 150 mM.

-Saturation.

La saturation se réalise au moyen d'une solution de gélatine à 200 µg/ml dans un tampon TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 0,5 mM (pH 7,4) (tampon TRIS-Na-Ca). On dépose 200 µl / puits et la saturation dure deux heures à 37°C

-Dépôt de l'Ac primaire.

Dépôt du surnageant pur ou dilué dans le tampon TRIS-Na-Ca à raison de 50 µl/puits. Incubation de 1 heure à 37°C.

-Lavages.

Réalisés avec le tampon TRIS-Na-Ca + 0,1% de Tween-20.

-Dépôt de l'Ac secondaire.

Dépôt de RAM-peroxydase diluée 500 fois dans le tampon TRIS-Na-Ca à raison de 50 µl/puits. Incubation de 1 heure à 37°C.

-Lavages.

voir ci-dessus.

-Révélation.

La révélation se fait avec une solution d'ABTS-H₂O₂-tampon citrate à raison de 50 µl/puits. Incubation de 15 minutes à 37°C.

Le tampon citrate se compose de 20,5 g/l de Na₂HPO₄ . 2H₂O (Merck), 8,9 g/l d'acide citrique (UCB) à pH 5,6. La solution de révélation contient 4 mg d'ABTS + 20 µl d'H₂O₂ / 6 ml de tampon citrate.

-Lecture.

Lecteur ELISA Titertek (absorbance à 405 nm).

Fig. 25: Rappel du protocole expérimental utilisé en ELISA lors du criblage des produits de fusion.

3.5.- Mise au point d'un test ELISA pour optimaliser les réponses du 6G3.

Le test ELISA mis au point pour des anticorps monoclonaux anti-pectine (38) s'est avéré, lors du criblage, inadapté à l'anticorps monoclonal que nous avons produit (ce protocole est rappelé à la fig. 25). Nous avons donc modifié ce protocole afin d'optimiser la réactivité du monoclonal 6G3 vis-à-vis du polysaccharide Fa.

Nous avons ainsi successivement testé le type de support (polystyrène ou PVC), la méthode de saturation des micropuits, l'effet de la poly-L-lysine et de la protéine de saturation sur la fixation de l'anticorps et finalement le type et le nombre de lavages des micropuits.

3.5.1.- Effet du type de plaque de microtitration utilisée.

Nous savions d'après les résultats obtenus en dot-blot sur nitrocellulose que la présence de NaCl dans le tampon de lavage était néfaste. Nous avons donc décidé de commencer les expériences avec un tampon TRIS 20 mM- CaCl_2 1 mM à pH 7,4 et une saturation à la gélatine.

Nous avons utilisé les plaques de microtitration en polystyrène (ps) décrites dans la partie 'matériels et méthodes' et des plaques en PVC souple (Flow) (fig. 26).

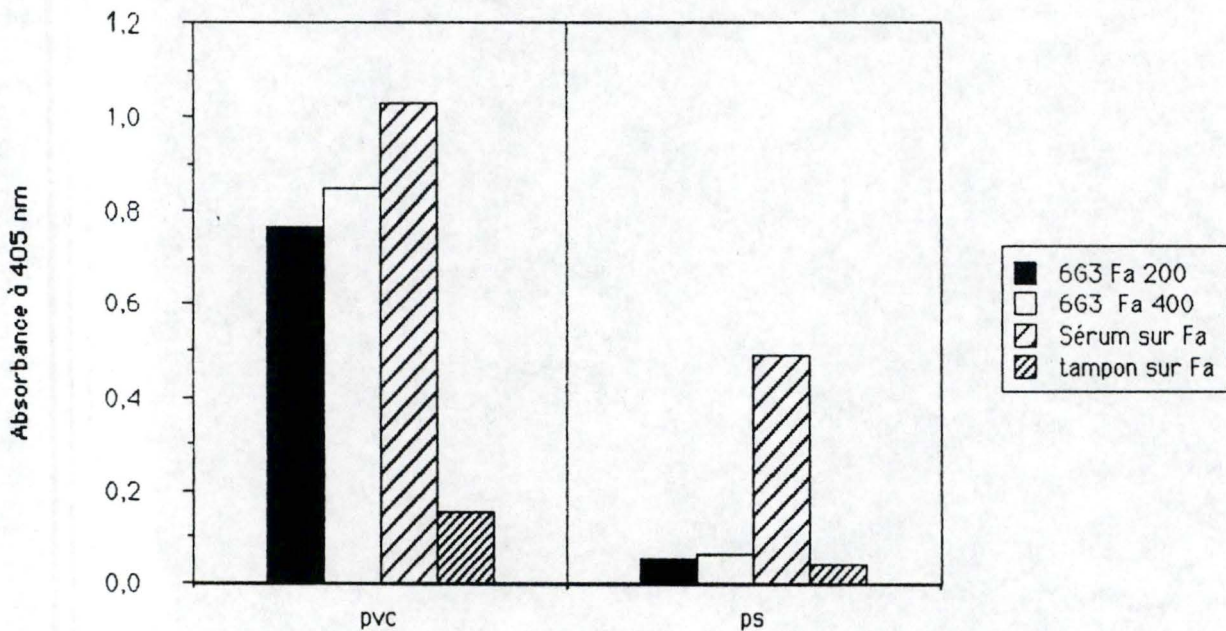


Fig. 26 : Effet du type de plaque de microtitration (PVC ou polystyrène) pour immobiliser l'antigène.

On observe une réponse globale beaucoup plus importante sur les plaques en PVC souple.

L'antigène est utilisé à deux concentrations différentes (200 et 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et curieusement il n'y a quasi pas de différence de réponse de l'AcMo aux deux concentrations utilisées.

Les absorbances élevées sur tampon (Ag à une concentration de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) suggèrent une adsorption non spécifique du second anticorps ou une contamination de puits à puits.

Le 6G3 a été testé contre le polysaccharide adsorbé à deux concentrations différentes (respectivement 200 et 400 µg/ml). Tous les tests ont été produits en triplicate.

Curieusement, la réponse du 6G3 est à peu près identique aux deux concentrations de l'Ag. De plus, l'absorbance élevée des contrôles négatifs suggère une adsorption non spécifique du second Ac due à une mauvaise saturation des micropuits ou à une contamination de puits à puits.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé différentes méthodes de saturation, mais nous n'avons plus utilisé que des plaques en PVC souple, vu leur réponse plus intense et plus rapide. Nous avons rincé plusieurs fois la pipette avant de laver une nouvelle rangée de micropuits pour supprimer les éventuelles contaminations de puits à puits.

3.5.2.- Effet de la protéine de saturation.

Nous avons testé six méthodes de saturation à quatre concentrations différentes. Les concentrations utilisées sont reprises ci-dessous pour chaque molécule de saturation:

	cc1(%)	cc2(%)	cc3(%)	cc4(%)
Tween	0,05	0,1	0,5	1
BSA	0,5	1	2	4
Ovalbumine	0,5	1	2	4
Gélatine	0,025	0,05	0,1	0,2
Lait en poudre	0,005	0,01	0,02	0,05
Sérum cheval	0,1	1	10	20

- Les contrôles étaient - le tampon comme contrôle négatif de fixation non spécifique du second Ac (T).
 - le 11B2 (B) comme contrôle négatif (le 11B2 est un anticorps monoclonal anti-Ac anti-classe I de bovin).
 - le sérum des souris immunisées comme contrôle positif (S) (fig. 27).

Toutes les méthodes de saturation donnent des résultats valables, mais le lait en poudre et le sérum de cheval sont nettement supérieurs. Ces substances satureront suffisamment les sites non spécifiques sans pour autant masquer l'antigène au fond des puits et empêcher la reconnaissance par l'anticorps.

Nous avons décidé de continuer les tests en saturant avec la poudre de lait à 0,05 %.

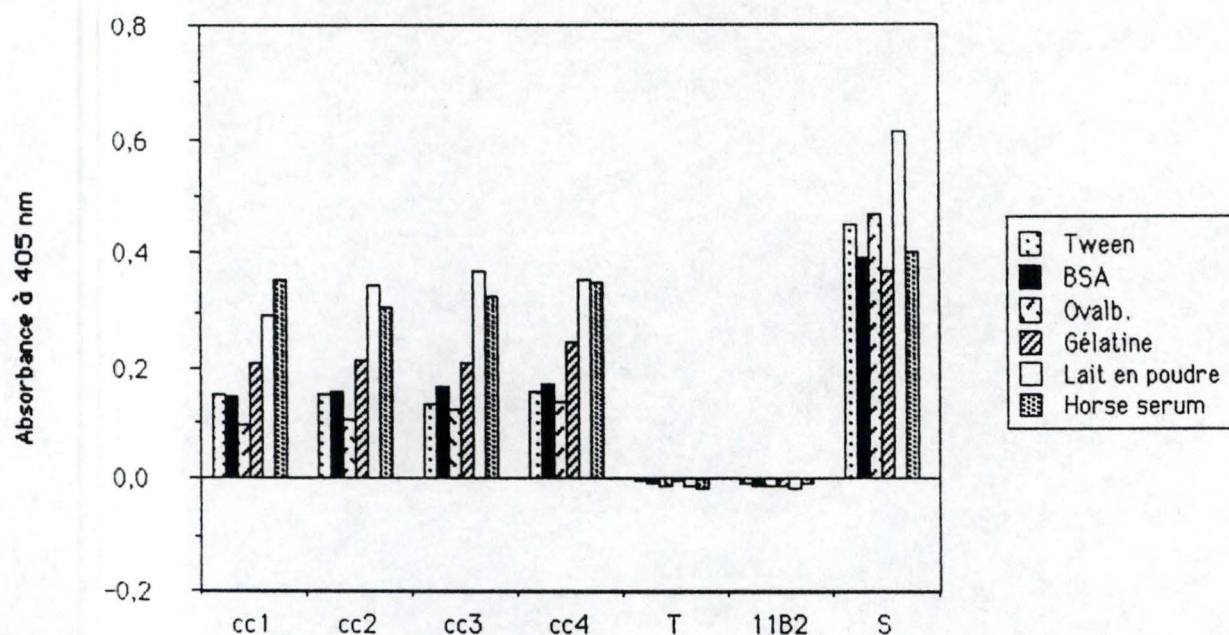


Fig. 27 : Effet de la protéine de saturation sur les réponses de l'AcMo.

Les différentes substances de saturation ont été utilisées à quatre concentrations différentes reprises dans le tableau ci-dessus. Un Ac anti-Ac anti-classe I de bovin comme contrôle négatif (11B2); le contrôle de fixation non spécifique du second Ac est composé d'un tampon qui remplace le premier Ac. Le contrôle positif est le sérum des souris immunisées. L'antigène est utilisé à une concentration de 200 µg/ml.

On constate que toutes les méthodes de saturation sont bonnes mais que la poudre de lait et le sérum de cheval donnent des résultats nettement supérieurs.

3.5.3.- Effet de la poly-L-lysine.

Un doute subsistait néanmoins: la réponse nettement positive des micropuits saturés à la poudre de lait pouvait résulter d'une reconnaissance effective de l'épitope polysaccharidique par notre Ac 6G3, mais aussi d'une adsorption non-spécifique de celui-ci par la PLL utilisée pour immobiliser l'Ag, voire par la poudre de lait elle-même.

Nous avons levé le doute en réalisant un test en parallèle avec et sans Ag au fond des puits. La PLL à une concentration de 0,05 mg/ml a été déposée à raison de 50 et 100 µl/puits.

Nous avons utilisé les contrôles habituels sur tampon (T), 11B2 et sérum des souris immunisées (S) (fig. 28).

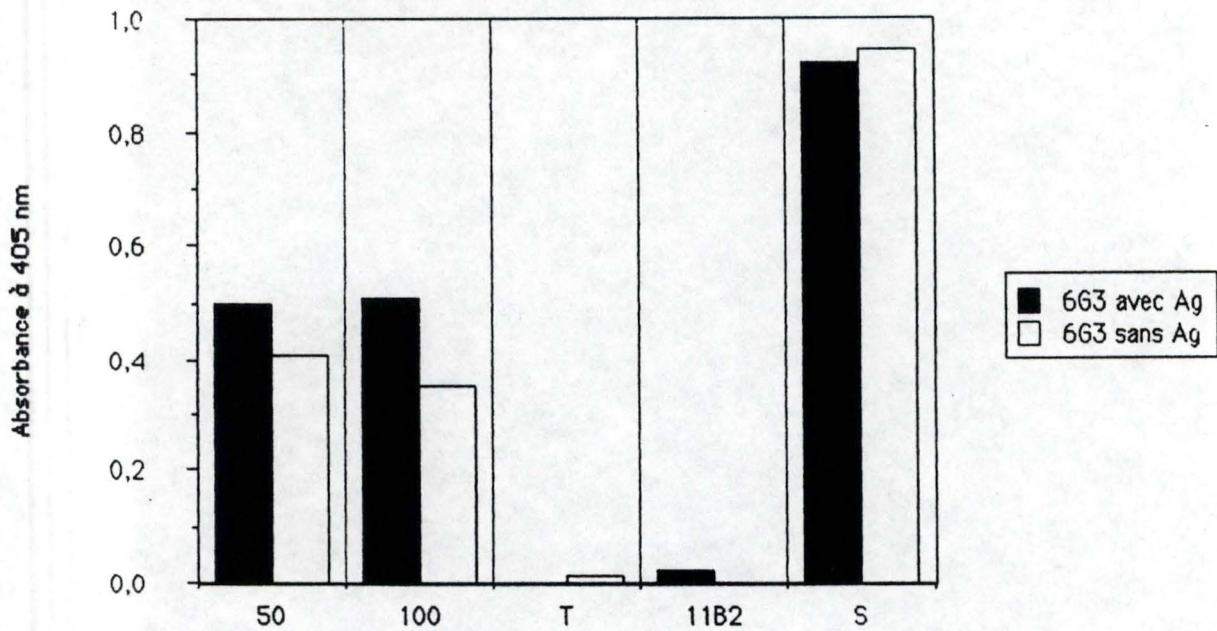


Fig. 28 : Test ELISA vérifiant la spécificité de l'AcMo.

Ce test consiste à vérifier la réponse de l'AcMo en présence (200 $\mu\text{g/ml}$) et en absence de l'antigène. On observe une réponse du 663 dans les deux cas, avec cependant une réponse plus marquée en présence de l'antigène. Cette différence est due au fait que l'AcMo se fixe de manière non spécifique soit sur la PLL, soit sur la poudre de lait utilisée pour saturer les micropuits.

Le 663 répondait clairement même en absence de polysaccharide Fa au fond des micropuits. Il n'y avait par ailleurs pas d'adsorption non spécifique, ni du 11B2, ni du second Ac. L'anticorps 663 se fixait donc de manière non spécifique soit sur la PLL soit sur la protéine de saturation.

Il nous restait donc à tester le 663 sur le polysaccharide Fa avec ou sans PLL et sur la poudre de lait sans antigène au fond des puits. Nous avons utilisé les mêmes contrôles que précédemment (fig. 29).

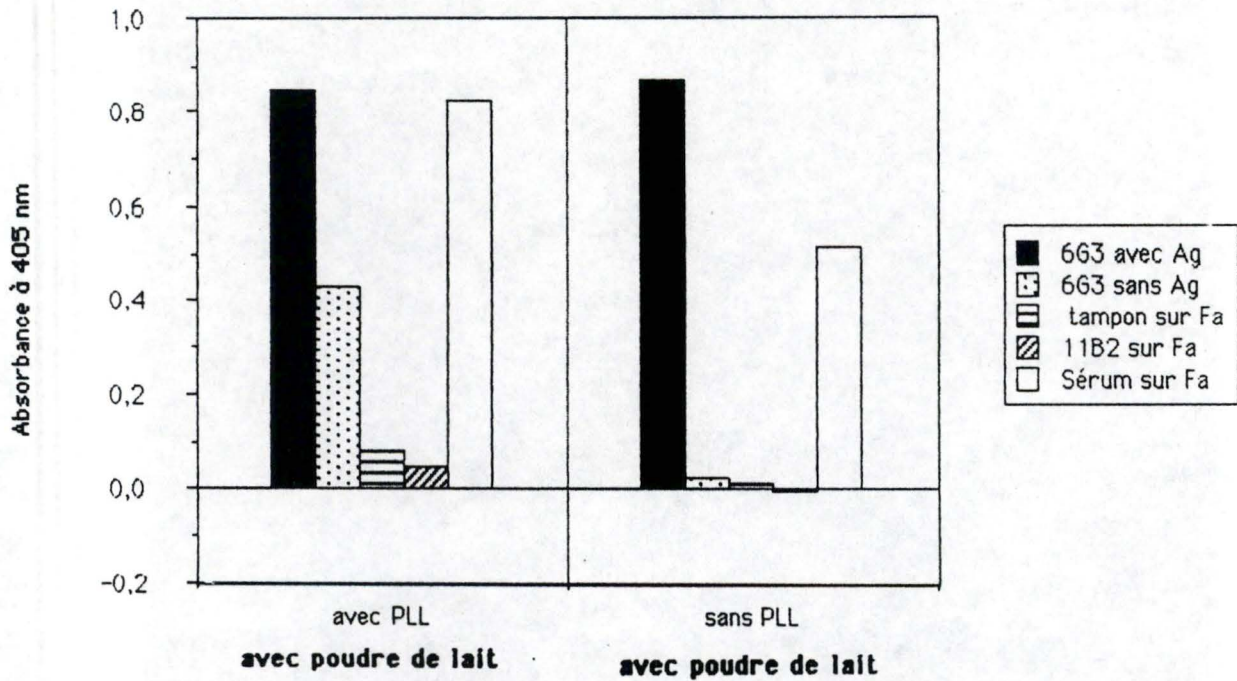


Fig. 29 : Test ELISA révélant la réponse croisée avec la PLL.

Le test consiste à vérifier la réponse du 663 sur le polysaccharide Fa avec ou sans PLL et sur la poudre de lait sans antigène au fond des micropuits. On observe une réponse du 663 en présence de PLL avec ou sans Ag au fond des micropuits, réponse tout de même supérieure de 0,4 unité d'absorbance en présence de l'antigène. L'absence de réaction croisée avec la poudre de lait permet de justifier cette différence comme étant due uniquement à la présence de l'antigène.

Le monoclonal 663 répondait en présence de PLL, même en absence de l'antigène ! Sa réponse était cependant supérieure d'environ 0,4 unité d'absorbance au contact de l'antigène. Le test sans PLL a permis d'affirmer que cette différence était due uniquement à la présence de l'antigène au fond des puits puisque le 663 ne croisait pas avec la poudre de lait seule. Nous savions alors que notre anticorps 663 s'adsorbait non spécifiquement sur la PLL, mais pas sur la poudre de lait écrémé qui s'est avérée être la meilleure technique de saturation des sites d'adsorption non-spécifiques.

3.5.4.- Effet de la composition ionique du tampon de lavage.

Nous avons vérifié ici en ELISA les résultats (effet néfaste du NaCl sur la réponse du 663) obtenus en dot-blot sur nitrocellulose. Nous avons utilisé différents tampons de lavage dont la composition est reprise ci-dessous:

tampon n°	TRIS (mM)	NaCl (mM)	CaCl ₂ (mM)
1	20	150	0,5
2	20	100	0,5
3	20	50	0,5
4	20	0	0,5
5	20	150	0,1
6	20	150	1
7	20	0	0
8	20	0	1
9	0	0	0

Nous avons utilisé comme contrôles, le sérum de souris immunisées (S), le tampon (T-), le 11B2 (B-) en lieu et place de l'Ac 6G3, et le 6G3 sans Ag (-Fa).

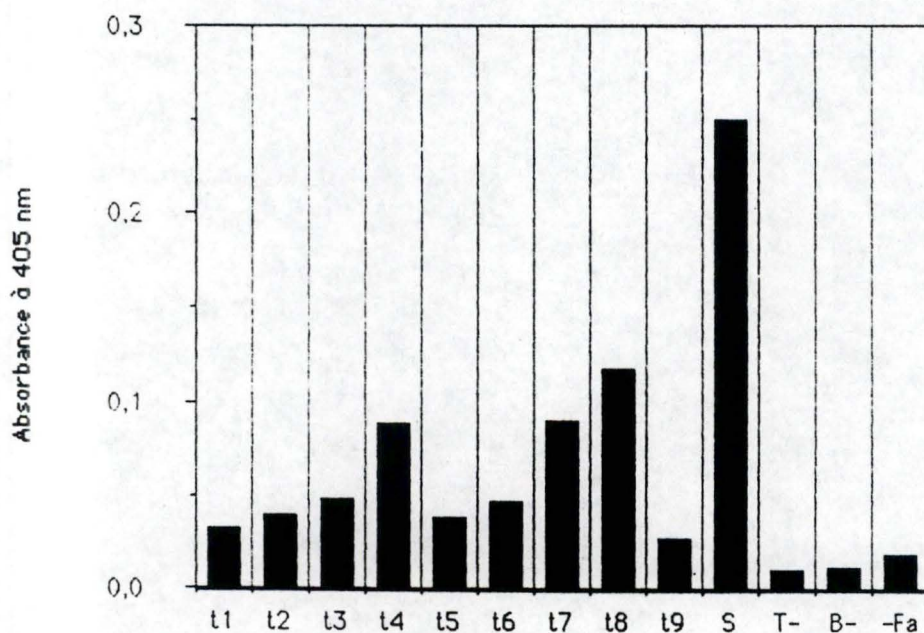


Fig. 30 : Test ELISA montrant l'effet de la composition du tampon de lavage sur la réponse de l'AcMo.

(S= contrôle positif avec sérum des souris immunisées, tampon de lavage n°8; T-= contrôle sur tampon; B-= contrôle négatif 11B2 sur Fa; -Fa= 6G3 sans Ag)

Dans ce test, nous avons modifié essentiellement les concentrations en NaCl et en CaCl₂ (tampon 1 à 9). On observe une meilleure réponse en absence de NaCl dans le tampon de lavage (tampon 4, 7 et 8). Le tampon n°9, de l'eau pure en fait, donne une réponse médiocre.

Les résultats (fig. 30) ont confirmé l'effet négatif observé en dot-blot du NaCl dans les tampons de lavage : seuls les tampons 4, 7 et 8 ont donné de bons résultats.

Les interactions éventuelles des hémicelluloses avec les ions étant très mal connues, nous ne pouvons pas interpréter ce résultat avec certitude. Il est cependant possible que le NaCl ait eu un effet sur la conformation du polysaccharide de manière à faciliter son détachement du support ou comme dans le cas de la pectine, à modifier la conformation de l'épitope reconnu par l'AcMo.

3.5.5.- Influence du nombre de lavage.

Le nombre de lavage est très important dans la réalisation des tests ELISA. En effet, les lavages doivent être assez nombreux pour éliminer les réactifs des étapes précédentes mais ils ne peuvent pas supprimer les antigènes fixés au fond des micropuits. Ces phénomènes sont d'autant plus importants pour les antigènes de nature polysaccharidique qu'on doit fixer sur des supports prévus pour adsorber des protéines. La réduction du nombre de lavage accélère également le test. Nous avons donc vérifié l'effet du nombre de lavages sur la réponse de l'AcMo (fig. 31).

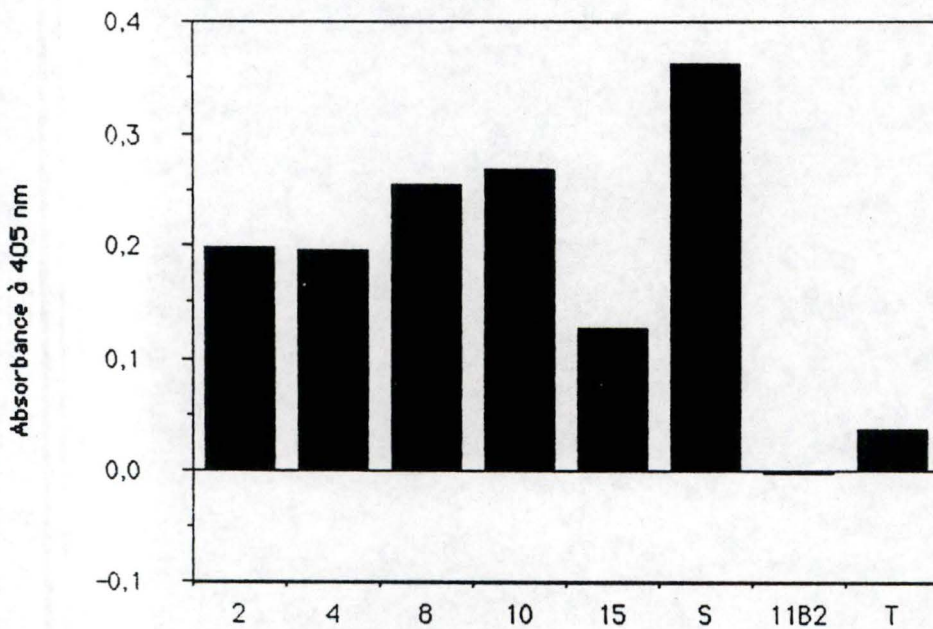


Fig. 31 : Influence du nombre de lavage sur la réponse du 663 en ELISA.

Le nombre de lavage dans un test ELISA est un paramètre capital car il faut trouver la juste mesure entre un nombre de lavages suffisants éliminant les réactifs tout en conservant les molécules qui se sont adsorbées. Nous avons fait varier le nombre de lavages entre 2 et 15, et on constate que jusqu'à dix lavages les différences de réponses de l'AcMo ne sont pas significativement différentes. Les témoins utilisés sont le sérum des souris immunisées comme témoin positif (S), un anticorps monoclonal (11B2) comme témoin négatif, et un contrôle négatif où le 663 est remplacé par du tampon (T).

Les résultats ne diffèrent pas jusqu'à 10 lavages. C'est le meilleur compromis entre le pouvoir discriminatoire du test et la rapidité à laquelle il peut être réalisé.

En résumé:

1. La présence de NaCl dans les tampons utilisés a un effet négatif sur le résultat du test.
2. Les plaques en PVC conviennent mieux au test.
3. Le 6G3 se fixe de manière non spécifique sur la PLL mais ne "croise" pas avec la poudre de lait.
4. Le nombre de lavage peut être réduit sans pour autant altérer la qualité du test.

Nous disposons maintenant d'un test fiable dont le protocole est repris ci-dessous:

- Fixation de l'antigène par simple adsorption sur plaque PVC souple.
Dépôt de 50 µl/puits du polysaccharide Fa à une concentration de 200 µg/ml.
Incubation pendant une nuit à 4°C.
- Saturation au lait en poudre à 0,05 % à raison de 200 µl/puits.
Incubation de deux heures à 37°C.
- Dépôt de l'Ac primaire à raison de 50 µl/puits. Incubation d'une heure à 37°C.
- Lavage avec tampon TRIS 20 mM pH 7,4 + tween 20 à 0,1 %
CaCl₂ 1 mM
10 lavages/puits
- Dépôt du second Ac RAM-peroxydase diluée 500 fois dans le tampon TRIS- Ca + 10% sérum de cheval à raison de 50 µl/puits.
Incubation d'une heure à 37°C.
- Révélation à l'ABTS-H₂O₂-tampon citrate.

3.5.6.- Variation de la concentration en antigène.

Ce protocole a été utilisé pour suivre la réponse de l'AcMo 6G3 quand on modifiait la concentration en Ag au fond des puits (fig. 32).

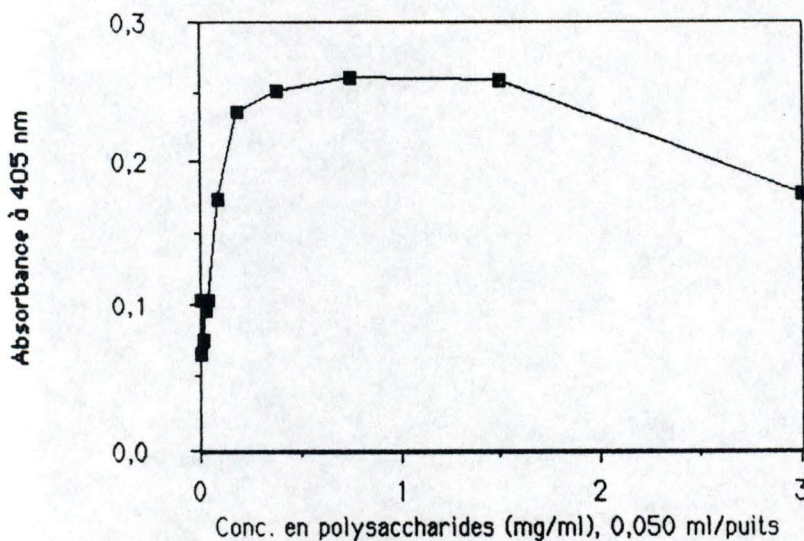


Fig. 32 : Absorbance du 6G3 en fonction de la concentration de l'antigène.

On peut remarquer d'après ce graphique que la réponse est optimale pour des concentrations comprises entre 0,5 et 1,5 mg/ml. A des concentrations supérieures en Ag, la réponse diminue, probablement par encombrement stérique qui masquerait une partie des épitopes.

3.5.7.- Dilution du 6G3.

Ce test a permis de mettre en évidence la dilution optimale de l'AcMo à utiliser dans les tests ELISA (fig. 33).

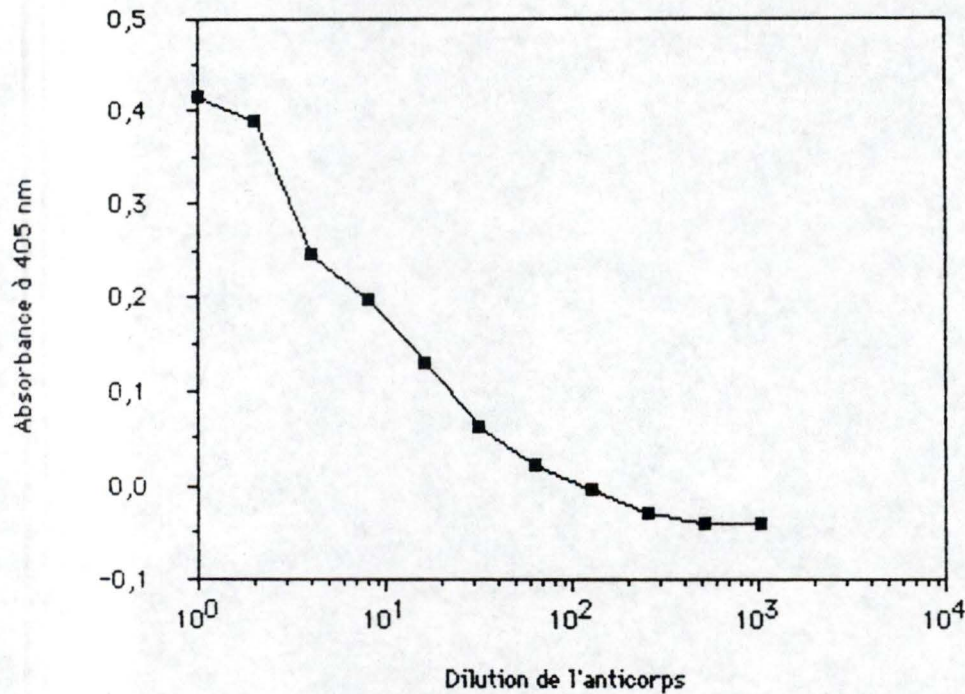


Fig. 33: Effet de la dilution de l'anticorps monoclonal sur la réponse en ELISA.

En absence de plateau lors de la dilution de l'anticorps 6G3, nous avons utilisé le surnageant de culture des hybridomes toujours à l'état pur.

Le protocole ainsi mis au point a été utilisé pour tester les ascites partiellement purifiés ou hydrolysés à la trypsine ainsi que dans l'identification de fractions glycosidiques libérées par hydrolyse enzymatique du polysaccharide Fa.

3.6.- Production des ascites.

La purification des ascites au sulfate d'ammonium a permis de récupérer 10 mg d'Ig qui ont été remis en suspension dans 5 ml de tampon PBS. Les IgM purifiées ont ensuite été testées en ELISA et se sont parfaitement fixées sur le polysaccharide Fa. La gamme de dilution possible des IgM n'est cependant pas très large (fig. 34 bis).

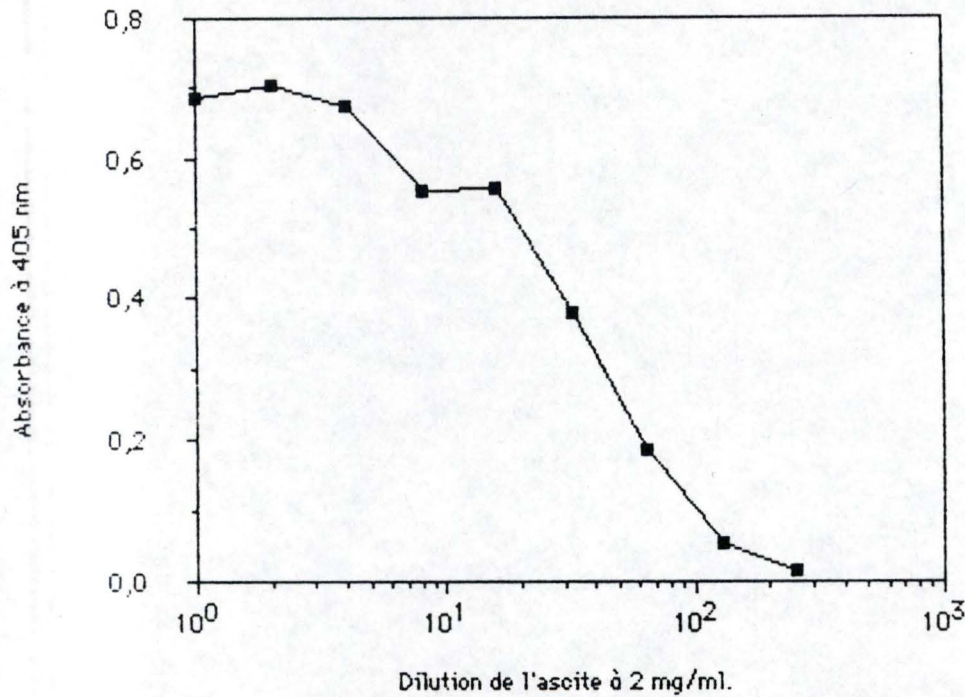


Fig. 34bis : Dilution de l'ascite purifié par précipitation au sulfate d'ammonium.

3.7.- Hydrolyse des IgM.

L'utilisation d'IgM en cytochimie nécessite leur hydrolyse préalable afin de réduire leur taille tout en conservant leur site de fixation de l'antigène.

Les IgM ont ainsi été hydrolysées et les produits d'hydrolyse passés sur une colonne de perméation de gel Séphacryl S-200.

Le chromatogramme obtenu (fig. 35) a montré deux pics d'éluion P₁ et P₂.

Le premier pic est sorti à un volume d'éluion de 28 ml et le deuxième à 71 ml. Le gel utilisé excluait les substances d'un poids moléculaire supérieur à 250.000 daltons et le volume mort V₀ de la colonne était de 25 ml. Le pic P₁ contenait par conséquent des protéines dont le poids moléculaire était inférieur à 250.000 daltons. Ce pic devait donc correspondre aux IgM hydrolysées, le poids moléculaire d'une IgM non hydrolysée étant de 900.000 daltons (37). Le deuxième pic correspondait quant à lui aux réactifs de faible poids moléculaire utilisés dans le protocole expérimental.

Les fractions correspondant à ces deux pics ont été récoltées et testées en ELISA sur le polysaccharide Fa.

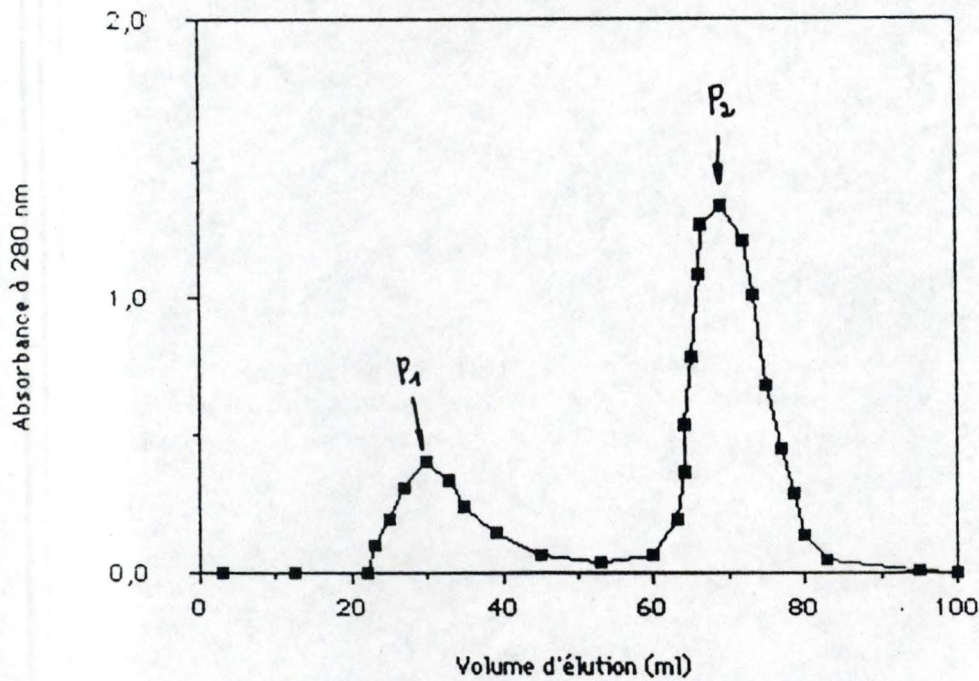


Fig. 35 : Schéma d'éluion sur Séphacryl S-200 ($V_0 = 25$ ml) des produits d'hydrolyse des IgM à la trypsine.

Les contrôles utilisés dans le test (Fig. 36) ont été:

- le sérum des souris immunisées sur Fa.
- L'AcMo 11B2 sur Fa comme contrôle négatif
- Fa sans 6G3 pour vérifier l'absence d'adsorption non spécifique du second Ac.
- 6G3 sans Ag pour vérifier l'absence de réaction croisée avec la protéine de saturation.

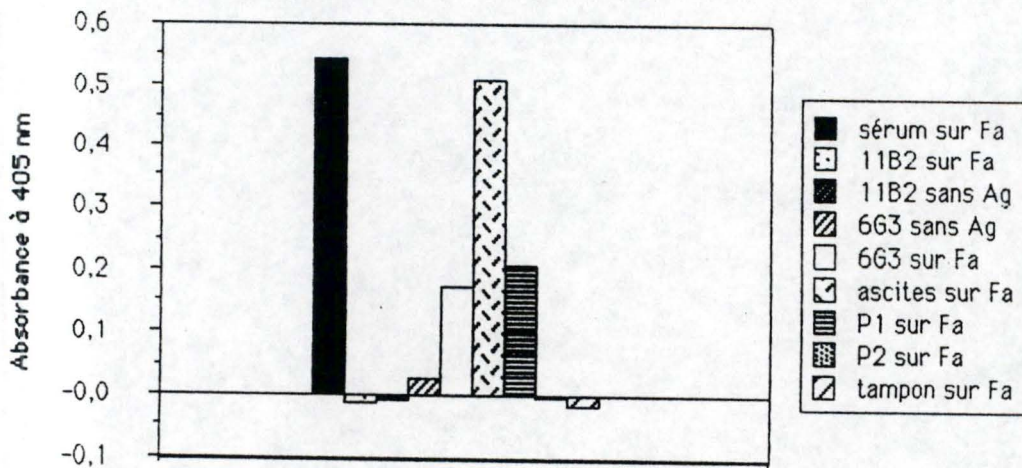


Fig. 36 : Test ELISA avec les produits d'hydrolyse des IgM à la trypsine. Le pic P₁ répond sur le polysaccharide Fa. Ce pic doit correspondre aux IgM hydrolysés d'une masse moléculaire de 200.000 daltons. Le pic P₂ ne répond pas sur le polysaccharide Fa et doit correspondre aux réactifs de faible masse moléculaire (la réponse ne tient pas compte de la dilution des anticorps).

On peut observer que la fraction P_1 a répondu sur le polysaccharide Fa mais pas la fraction P_2 . La fraction P_1 correspondait donc bien aux monomères des IgM.

Nous avons tenté d'utiliser ces monomères pour réaliser un marquage immunocytochimique sur cellules de Silène, mais l'autofluorescence de la paroi n'a pas permis de mettre en évidence un marquage spécifique du polysaccharide *in situ*. Il est possible d'envisager des marquages en microscopie électronique afin de se débarrasser du problème lié à l'autofluorescence.

Néanmoins, la réalisation de marquages immunocytochimiques sur des polysaccharides n'est pas encore une technique courante comme l'est le marquage de protéines. La mise au point de tels marquages dépasse nettement le cadre de ce travail.

3.8.- Contribution à l'identification de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal.

La chromatographie d'affinité constitue la meilleure approche théorique pour purifier un antigène mais, nous l'avons vu, elle est difficilement réalisable avec des IgM dont l'affinité est trop faible. L'utilisation des enzymes est, elle, courante pour l'étude des polysaccharides pariétaux que ce soit pour des extractions, ou des localisations cytochimiques (voir 1.2.1. et 1.2.3.). Nous avons ainsi utilisé une pectinase et une hémicellulase pour réaliser des hydrolyses partielles du polysaccharide Fa, tester les produits d'hydrolyse en ELISA en espérant isoler ainsi des séquences les plus petites possibles possédant encore l'épitope reconnu.

Nous savions que le polysaccharide Fa était sensible à l'action de l'hémicellulase, mais il subsistait un doute quant à sa sensibilité vis-à-vis de la pectinase (cfr. 3.3.4.). Par les résultats exposés dans ce chapitre, nous avons vérifié la sensibilité du polysaccharide Fa à la pectinase, et nous avons isolé des fragments polysaccharidiques qui répondent encore à l'AcMo après hydrolyse par l'hémicellulase.

3.8.1.- Chromatographie sur Bio-Gel P6 de la fraction polysaccharidique totale élue de la colonne de Séphadex DEAE A-50.

Nous avons d'abord chromatographié sur Bio-Gel P6 la fraction récoltée à la sortie de la chromatographie échangeuse d'ion (fig. 36bis). Ce chromatogramme servira de référence pour les chromatographies ultérieures sur Bio-Gel P6.

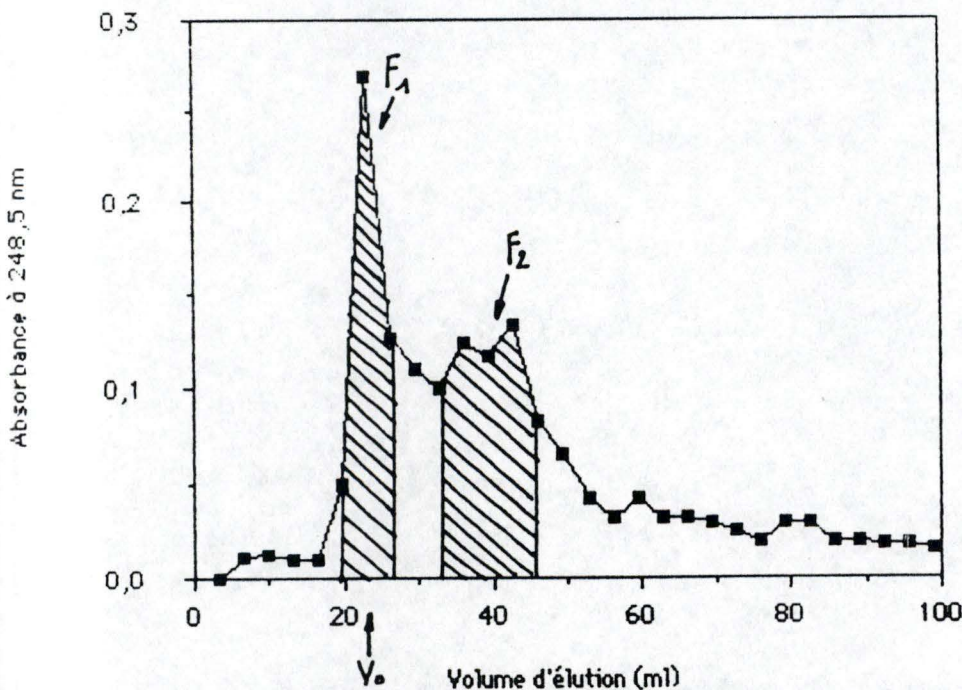


Fig. 36bis : Chromatographie sur Bio-Gel P6 de la fraction polysaccharidique totale élue de la colonne de Séphadex DEAE A-50 par du NaCl 0,1 M. Le chromatogramme présente 2 pics d'élution F₁ et F₂. Le pic F₁ correspond vraisemblablement au polysaccharide Fa quittant le gel de Séphacryl S-200 à V₀; le pic F₂ à la fraction Fb élue du même gel.

Nous avons détecté deux fractions F_1 et F_2 ayant respectivement des volumes d'élution de 22 et 36 ml (d'après le test à l'orcinoï sulfureux).

Un test ELISA (fig. 36*) réalisé sur ces deux fractions montre que seule la fraction F_1 est positive. Cette fraction contient donc le polysaccharide Fa contre lequel nous avons produit l'anticorps monoclonal 6G3. La différence d'absorbance entre la réponse du 6G3 sur F_1 et celle sur la fraction récoltée en sortie de chromatographie échangeuse d'ions est due à une différence de concentration. La fraction F_2 , quant à elle, doit correspondre au polysaccharide Fb contre lequel nous ne possédons pas d'anticorps monoclonal. Comme cette fraction F_2 ne quitte pas le Bio-Gel P6 au volume mort, elle doit être composée d'oligomères de petite taille, ce qui pourrait expliquer qu'on n'ait pu produire, en absence de couplage, d'anticorps monoclonaux contre Fb.

Nous utiliserons uniquement la fraction F_1 pour les hydrolyses enzymatiques.

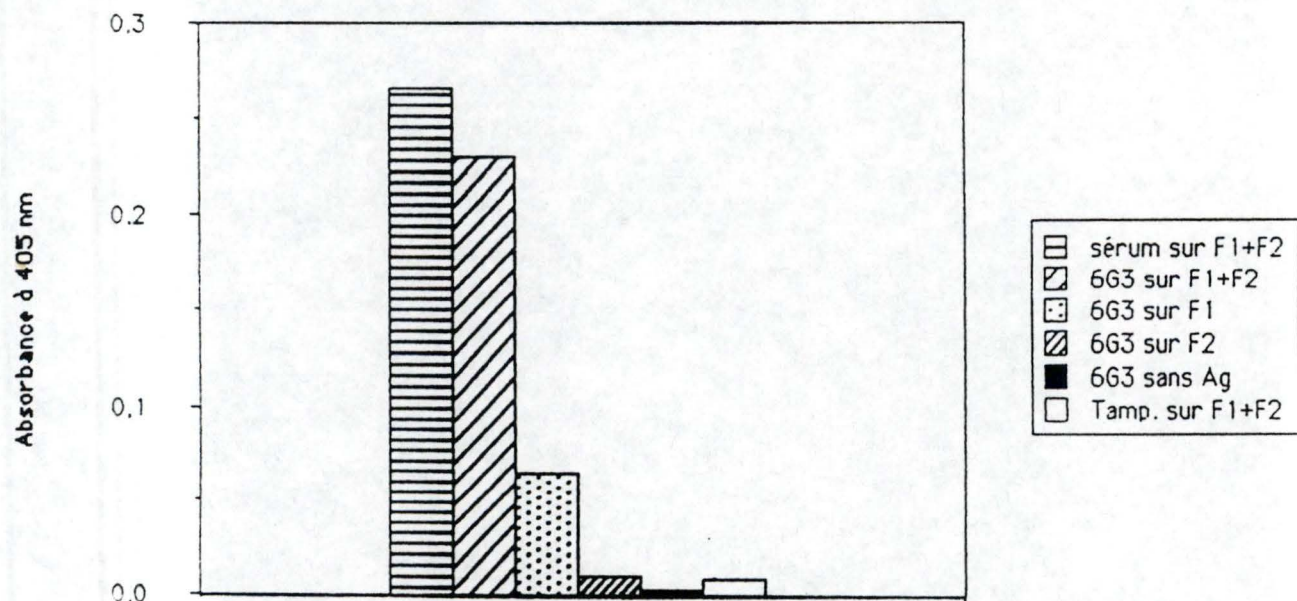


Fig. 36* : Test ELISA sur les fractions F_1 et F_2 récoltées à la sortie du Bio-Gel P6. Seule la fraction F_1 est reconnue par l'AcMo (les réponses du 6G3 ne tiennent pas compte de la dilution de l'Ag), donc cette fraction F_1 correspond au polysaccharide Fa de masse moléculaire élevée quittant le gel à V_0 . La fraction F_2 , manifestement de masse moléculaire plus faible, correspond vraisemblablement au polysaccharide Fb de la fig. 23. Cette petite taille pourrait être une explication à l'absence d'Ac contre ce polysaccharide Fb.

3.8.2.- Hydrolyse enzymatique.

A.- Digestion à la pectinase

Le polysaccharide Fa a été hydrolysé pendant 56 heures par la pectinase, et les produits d'hydrolyse séparés par une colonne de perméation de gel Bio-Gel P6 (fig. 37).

Le chromatogramme se compose de 5 pics que nous appellerons P_1 , P_2 , P_3 , P_4 et P_5 . Les pics P_1 - P_2 ainsi que P_3 - P_4 ne sont pas résolus de manière satisfaisante. La révélation de cette chromatographie par la méthode à l'orcinoïl sulfurique montre que ces fractions P_1 - P_2 et P_3 - P_4 sont positives. Un dosage de protéines sur les fractions P_1 - P_2 , P_3 - P_4 et P_5 a permis de mettre en évidence une élution protéique majoritaire en P_1 - P_2 et moindre en P_3 - P_4 (0,500 mg/ml et 0,200 mg/ml respectivement). La fraction P_1 - P_2 contient vraisemblablement la pectinase utilisée, puisque le Bio-Gel P6 possède une gamme de fractionnement comprise entre 1000 et 6000 daltons (la pectinase a une masse moléculaire moyenne de 36.000 daltons). Cette fraction P_1 - P_2 permet de déterminer ainsi le volume mort V_0 de la colonne à 23 ml +/- 3 ml (qui sera ultérieurement confirmé lors de l'étalonnage du gel). Le polysaccharide Fa ne contenant pas de protéines, la présence de ces dernières dans la fraction P_3 - P_4 ne peut être expliquée que par leur présence dans la solution de pectinase.

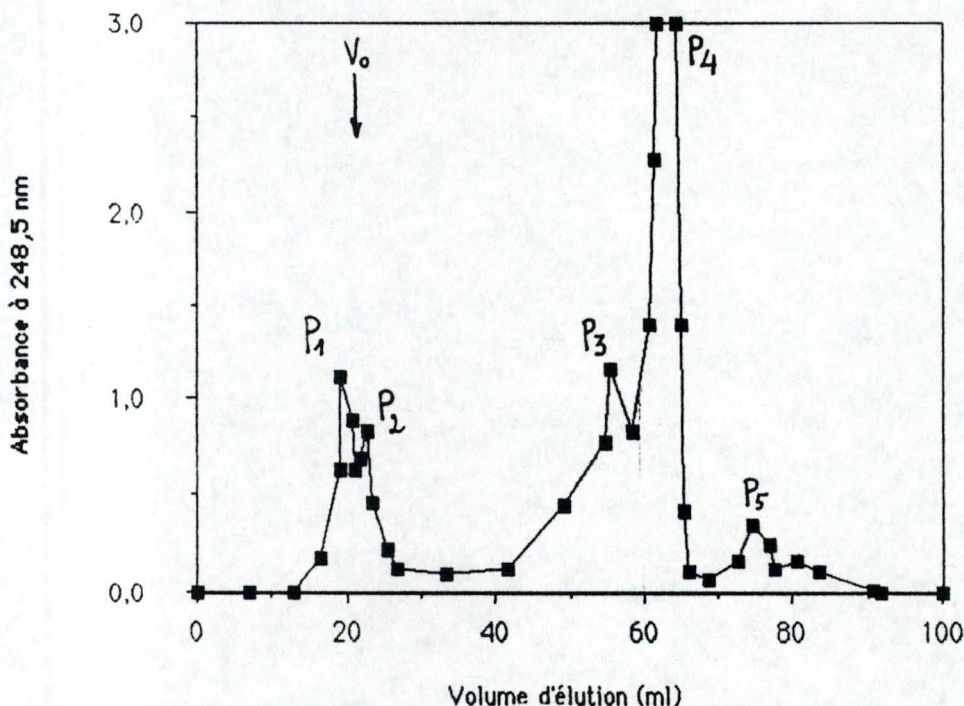


Fig. 37 : Schéma d'élution sur Bio-Gel P6 des produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa par la pectinase pendant 36 heures. Les pics P_1 - P_2 ainsi que P_3 - P_4 correspondent à une coélution d'une fraction glycosidique et protéique. Le pic P_5 ne correspond ni à des protéines ni à des polysaccharides.

Les fractions P_1-P_2 et P_3-P_4 correspondent donc chacune à la coélution d'une fraction polysaccharidique et d'une fraction protéique. Nous avons testé les différentes fractions en ELISA en ajoutant aux contrôles habituels, un contrôle sur pectinase immobilisée au fond des micropuits pour vérifier la non-fixation du 6G3 sur cette pectinase (fig. 38).

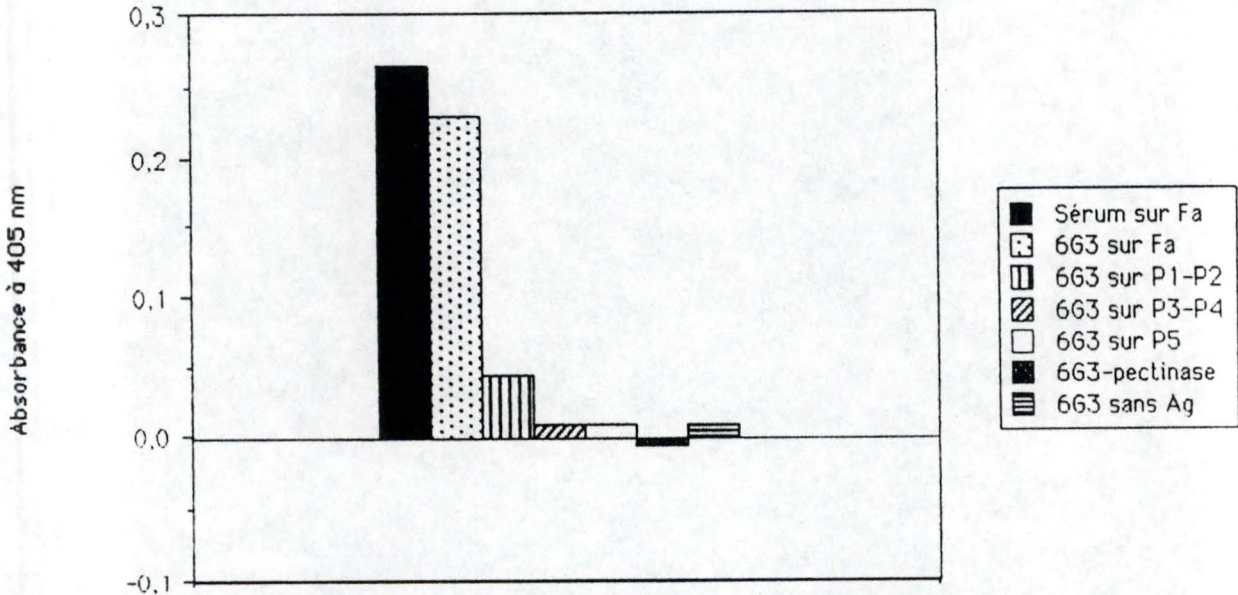


Fig. 38 : Test ELISA sur les produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa par la pectinase (les réponses du 6G3 ne tiennent pas compte de la dilution de l'Ag). Seule la fraction P_1-P_2 est reconnue par l'anticorps monoclonal. L'absence de réaction croisée de l'anticorps avec la pectinase permet de dire que la réponse observée sur P_1-P_2 est due uniquement à la présence de la fraction glycosidique. Le Bio-Gel P6 ayant une gamme de fractionnement comprise entre 1000 et 6000, la composante protéique de la fraction P_1-P_2 correspond vraisemblablement à la pectinase. La composante glycosidique mise en évidence dans la fraction P_3-P_4 correspond aux contaminants présents dans la solution de pectinase mis en évidence lors d'une chromatographie sur couche mince (voir p. 36). Quant à la composante protéique, il s'agit également de contaminants dus à l'impureté de la préparation (résultats d'électrophorèse; P. Baes, communication personnelle).

Seule la fraction quittant le gel à V_0 est positive en ELISA et il n'y a pas d'adsorption non-spécifique du 6G3 sur la pectinase. En se basant sur le fait que le polysaccharide Fa quitte le gel Séphacryl S-200 également à V_0 , on peut affirmer raisonnablement que cette fraction P_1-P_2 contient, en plus de la pectinase, du polysaccharide Fa non hydrolysé. Les substances glycosylées de la fraction P_3-P_4 correspondent aux fragments oligosaccharidiques mis en évidence lors de la chromatographie en couche mince de la solution de pectinase (cfr. p. 37).

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons hydrolysé la fraction P₁-P₂ au TFA 2 N et réalisé la transformation en acétates d'alditols pour permettre l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (fig. 39).

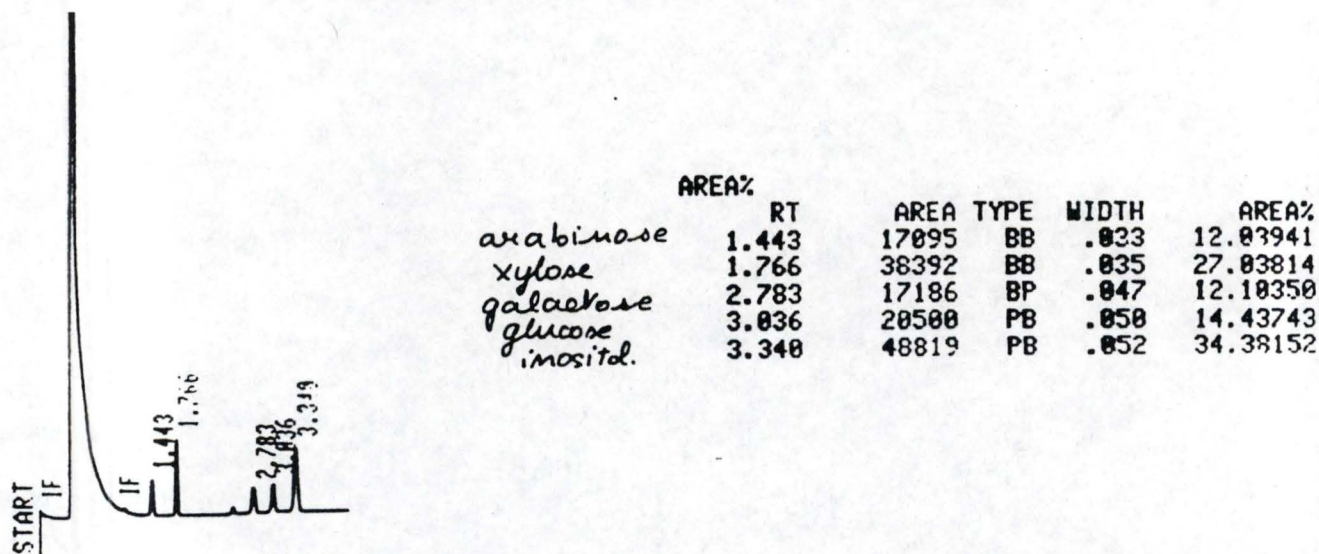


Fig. 39 : Chromatogramme des acétates d'alditols obtenus à partir de la fraction P₁-P₂ isolée lors de l'hydrolyse du polysaccharide Fa par la pectinase.

On observe une très grande similitude avec la fig. 24 p.36 sauf pour la teneur en glucose, fluctuation pouvant être attribuée à une modification de la composition du polysaccharide Fa durant la culture cellulaire. Malgré cette légère différence, nous pensons que cette fraction P₁-P₂ contient du polysaccharide Fa natif et que ce dernier est ainsi insensible à la pectinase.

Si on compare ce chromatogramme à celui du polysaccharide Fa hydrolysé au TFA à la sortie du Séphacryl S-200 (p. 37), on observe une très grande similitude dans les proportions des oses neutres sauf pour la teneur en glucose. Cette différence pourrait être attribuée à une hétérogénéité dans les fractions polysaccharidiques récoltées lors des purifications.

B. - Digestion à l'hémicellulase.

Le test à la pectinase n'ayant pas détaché du polysaccharide d'épitopes reconnus par le 6G3, nous avons utilisé une hémicellulase brute pour hydrolyser le polysaccharide Fa pendant 24, 56 et 120 heures.

La digestion de 24 heures (fig. 40) présente 4 pics d'éluion H₁²⁴, H₂²⁴, H₃²⁴ et H₄²⁴ avec une mauvaise résolution pour les pics H₂²⁴, H₃²⁴ et H₄²⁴. Ces 3 derniers pics sont positifs dans un test à l'orcinol sulfurique avec une réponse plus intense pour les deux derniers pics. Un dosage de protéines montre une éluion de protéines en H₁²⁴ et H₃²⁴-H₄²⁴. Comme pour la digestion à la pectinase et pour les mêmes raisons, la composante protéique provient de la préparation enzymatique et non de l'échantillon polysaccharidique.

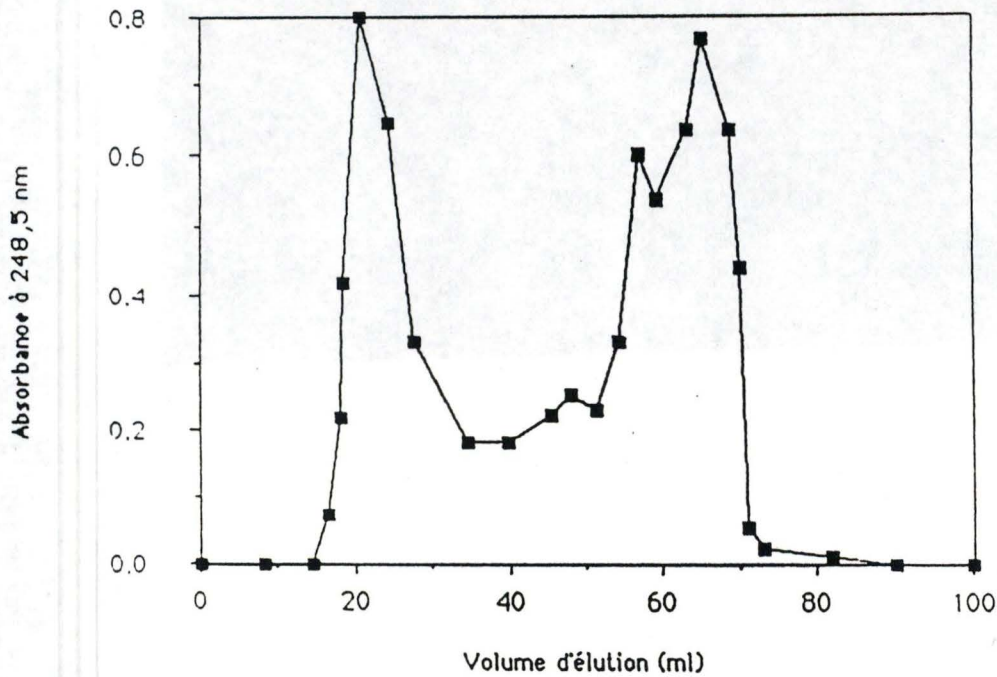


Fig. 40 : Schéma d'élution sur Bio-Gel P6 des produits d'hydrolyse libérés après une digestion de 24 heures à l'hémicellulase.

Les fractions H_3^{24} et H_4^{24} sont rassemblées en une seule fraction qui sera testée en ELISA avec les fractions H_1^{24} et H_2^{24} .

Ces différentes fractions ont été testées en ELISA (fig. 41) en utilisant les contrôles habituels auxquels on ajoute un test de fixation non spécifique du 6G3 sur l'hémicellulase.

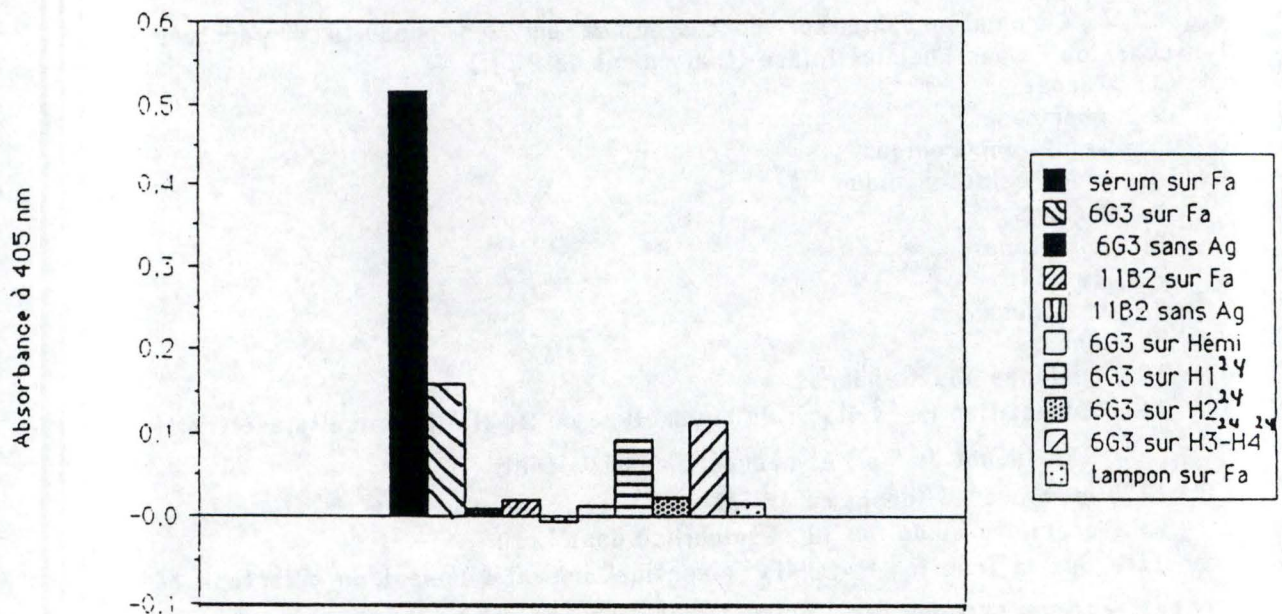


Fig. 41 : Test ELISA sur les produits d'hydrolyse après digestion de 24 heures à l'hémicellulase (les réponses du 6G3 ne tiennent pas compte de la dilution de l'Ag).

Les fractions H_1^{24} et H_3^{24} - H_4^{24} sont reconnues par l'anticorps monoclonal et on n'observe pas de réaction croisée avec la solution d'hémicellulase.

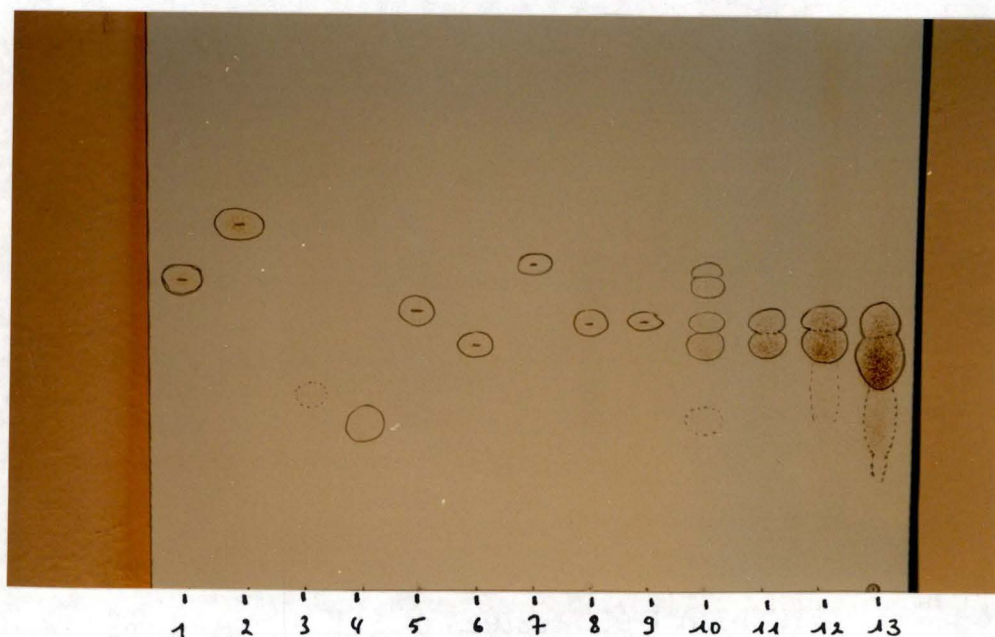


Photo n° 7: Chromatographie sur couche mince sur les produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa par l'hémicellulase (traitement de 24 H)

1. : fucose
2. : rhamnose
3. : acide glucuronique
4. : acide galacturonique
5. : mannose
6. : galactose
7. : xylose
8. : arabinose
9. : glucose
10. : mélange des standards
11. : échantillon $H_3^{24}-H_4^{24}$ de l'hydrolyse de 24 H à l'hémicellulase traité au TFA (dépôt de $5 \mu l$) et récupéré dans l'alcool.
12. : idem que 11 (dépôt de $10 \mu l$)
13. : précipité alcool de 11 resolubilisé dans l'eau

On constate que la fraction $H_3^{24}-H_4^{24}$ contient essentiellement du galactose et du glucose. L'épitope reconnu par l'Ac 663 doit donc être riche en ces deux sucres. La solubilisation des produits d'hydrolyse par l'alcool ne permet pas de récupérer les fragments de degré de polymérisation plus élevé qui n'ont pas été hydrolysés par le TFA. Ces fragments apparaissent dans le dépôt 13. Ceci permet de dire que la fraction $H_3^{24}-H_4^{24}$ ne contient pas que des monomères.

Les fractions H_1^{24} et $H_3^{24}-H_4^{24}$ sont positives en ELISA et le 6G3 ne se fixe pas de manière non spécifique sur l'hémicellulase. La réponse du 6G3 sur les fractions H_1^{24} et $H_3^{24}-H_4^{24}$ est donc due, malgré la coélution, uniquement à la présence de séquences glycosidiques.

La fraction $H_3^{24}-H_4^{24}$ a été hydrolysée au TFA. Ce traitement se caractérise par la formation d'un précipité insoluble dans l'éthanol. Nous avons passé en chromatographie sur couche mince le surnageant éthanol ainsi que le précipité ressolubilisé dans l'eau (photo 7). La fraction soluble dans l'éthanol contient essentiellement du glucose et du galactose. La fraction soluble dans l'eau contient des fragments de degré de polymérisation supérieur de même que du glucose et du galactose n'ayant pas été solubilisé dans l'alcool. Une hydrolyse enzymatique de 24 heures n'a donc pas détruit l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 6G3 mais elle en a détaché une certaine quantité, de faible masse moléculaire, éluee en fin de chromatographie. Nous pouvons déjà conclure que l'épitope sera caractérisé par une teneur importante en glucose et galactose.

La digestion de 56 heures donne un schéma d'élution sur Bio-Gel P6 (fig. 42) comportant 5 pics H_0^{56} , H_1^{56} , H_2^{56} , H_3^{56} et H_4^{56} .

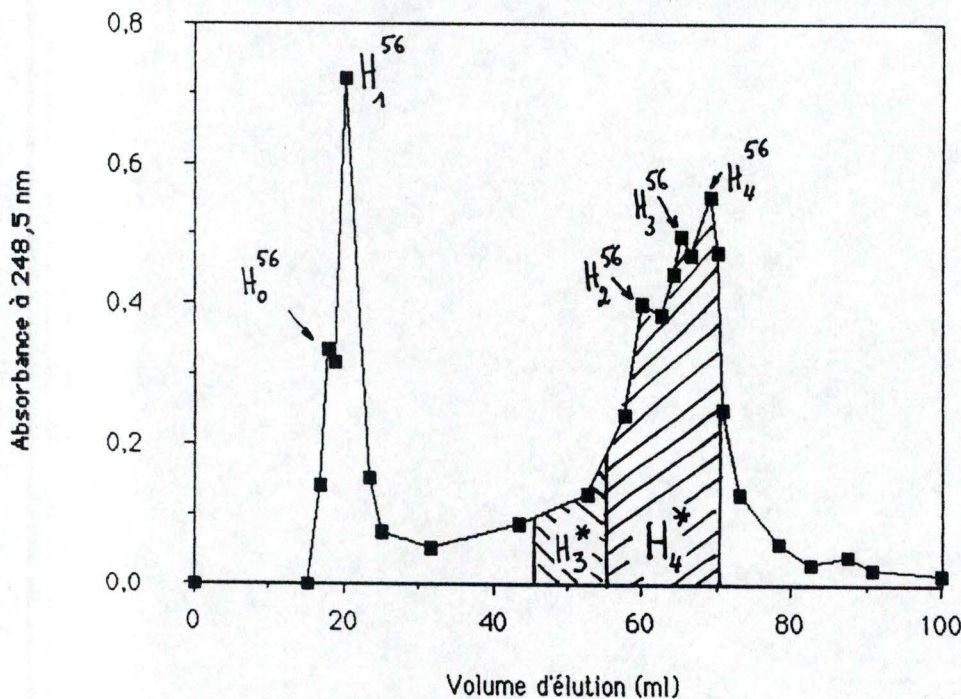


Fig. 42 : Schéma d'élution sur Bio-Gel P6 des produits d'hydrolyse après digestion de 56 heures à l'hémicellulase. Les pics H_2^{56} , H_3^{56} et H_4^{56} ont été rassemblés en une seule fraction H_4^* . Nous avons également récupéré la fraction H_1^{56} et une fraction H_3^* qui s'élue entre 45 et 55 ml. Toutes ces fractions seront testées en ELISA.

Nous récoltons la fraction H_1^{56} . Nous récupérons également une fraction supplémentaire H_3^* s'éluant entre 45 et 55 ml. Nous rassemblons en une seule fraction H_4^* les pics H_2^{56} , H_3^{56} et H_4^{56} .

Un test à l'orcinol sulfurique montre que toutes ces fractions H_1^{56} , H_3^* et H_4^* sont positives. Si on se réfère à la fig. 36bis, les fractions H_3^* et H_4^* n'ont pas d'équivalent dans ce schéma d'éluion, ce qui témoigne bien d'une hydrolyse effective du polysaccharide Fa.

Un dosage de protéines montre une éluion de protéines à V_0 et en H_4^* . Il y a donc de nouveau coélution de protéines et de polysaccharides dans ces deux fractions. Nous savions d'après la fig. 36bis qu'aucune fraction ni glycosidique, ni protéique, ne s'éluait entre 55 et 80 ml. Les protéines détectées dans la fraction H_4^* sont donc des contaminants provenant de la préparation enzymatique d'hémicellulase.

Si on compare ce schéma d'éluion avec celui obtenu pour l'hydrolyse de 24 heures, le pic H_2^{56} semble correspondre au pic H_2^{24} , ce qui suggère une hydrolyse plus poussée et donc une diminution du poids moléculaire des fragments libérés.

Ces différentes fractions ont été testées en ELISA avec les contrôles habituels (fig. 43).

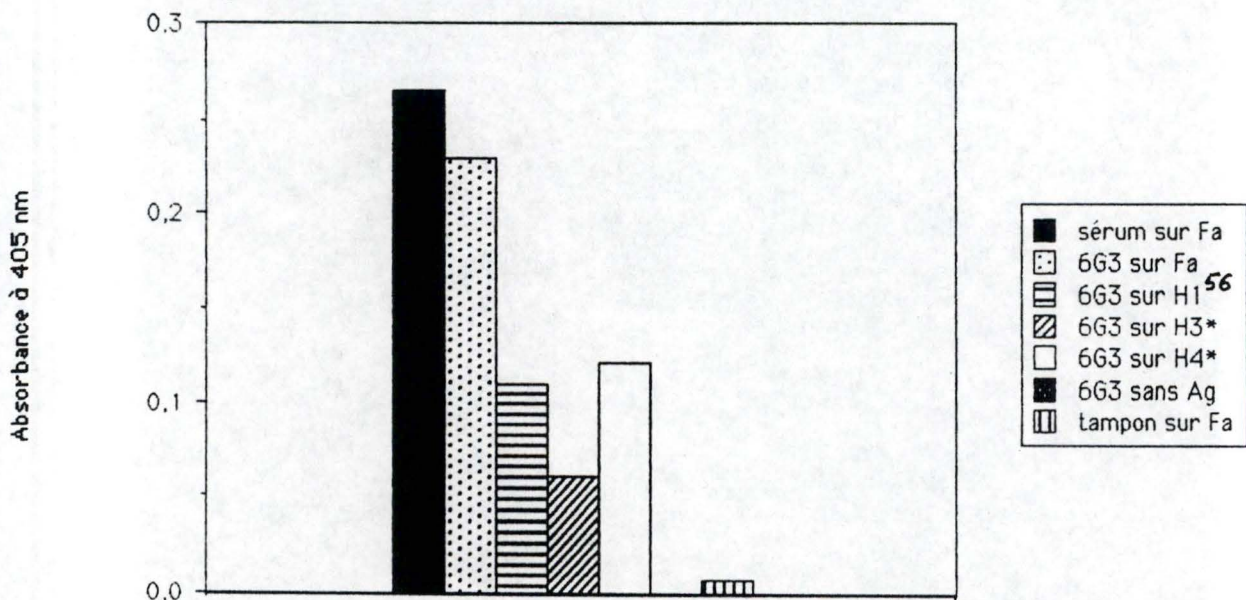


Fig. 43 : Test ELISA sur les produits d'hydrolyse après digestion de 56 heures à l'hémicellulase (les réponses du 6G3 ne tiennent pas compte de la dilution de l'Ag). Les fractions H_1^{56} et H_4^* sont reconnues par l'anticorps monoclonal. La fraction H_3^* l'est également mais la réponse est plus faible.

Les fractions H_1^{56} , H_3^* et H_4^* sont positives. La fraction H_3^* montre cependant une réponse plus faible. Le 6G3 ne croisant pas avec l'hémicellulase, les réponses observées sont dues uniquement à la présence de sucres dans ces fractions. A nouveau, nous avons un premier pic qui contient un polysaccharide de haut poids moléculaire et positif en ELISA, et des fragments de poids moléculaire de plus en plus faibles, détachés du polysaccharide, mais qui contiennent encore l'épitope. Quant à la fraction H_0^{56} , elle doit correspondre à l'hémicellulase qui, bien entendu, ne croise pas avec le 6G3.

Après une digestion de 120 heures (fig. 44), on n'observe plus que 2 pics majoritaires (H_1^{120} et H_2^{120}) dont le premier quitte encore toujours la colonne à V_0 et n'est donc vraisemblablement pas dégradé par l'enzyme utilisée. Ces deux pics sont positifs à l'orcinoI sulfurique mais tous deux négatifs en ELISA vis-à-vis du 6G3 (fig. 45)

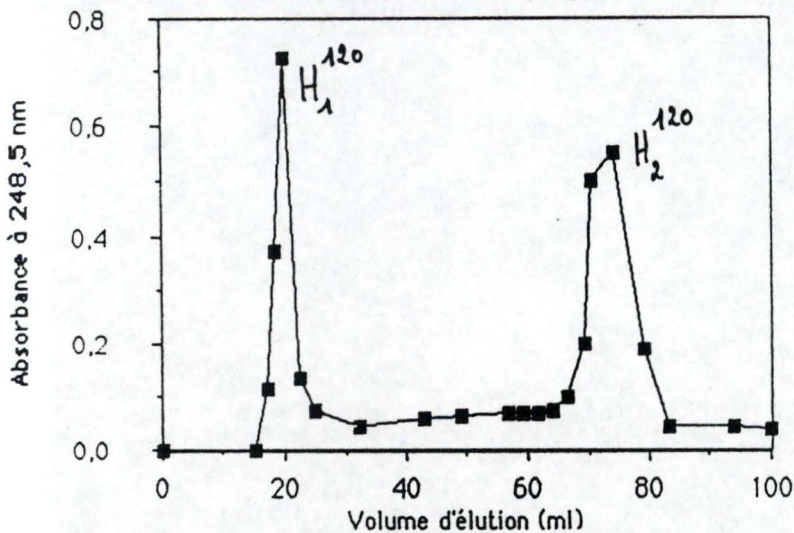


Fig. 44 : Schéma d'éluion sur Bio-Gel P6 des produits d'hydrolyse après digestion de 120 heures à l'hémicellulase. Cette hydrolyse ne permet d'isoler que deux fractions majoritaires H_1^{120} et H_2^{120} . La première correspondant à des molécules de masse moléculaire élevée; la deuxième, vraisemblablement à des oligomères de très faible degré de polymérisation.

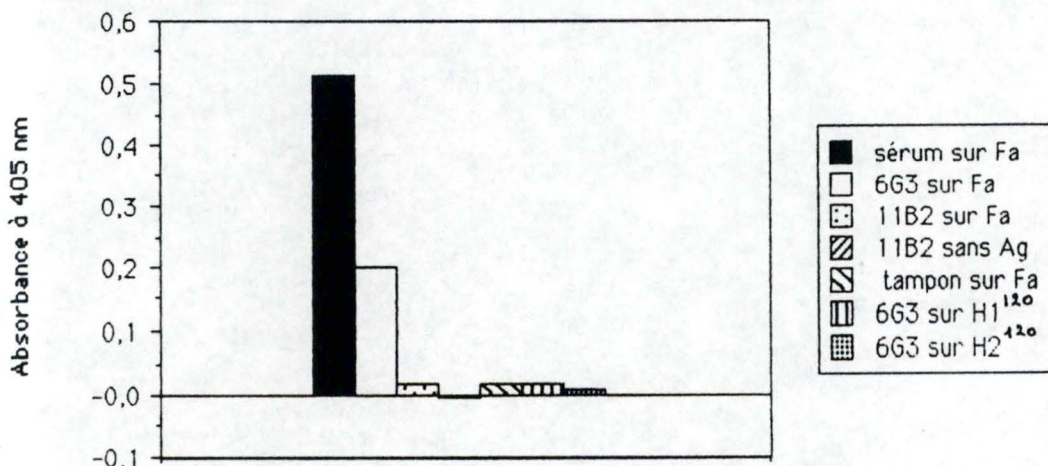


Fig. 45 : Test ELISA sur les produits d'hydrolyse après digestion de 120 heures à l'hémicellulase. Les deux fractions récoltées lors de cette hydrolyse ne sont pas reconnues par l'anticorps monoclonal. Une hydrolyse de 120 heures entraîne donc la destruction de l'épitope reconnu par l'AcMo.

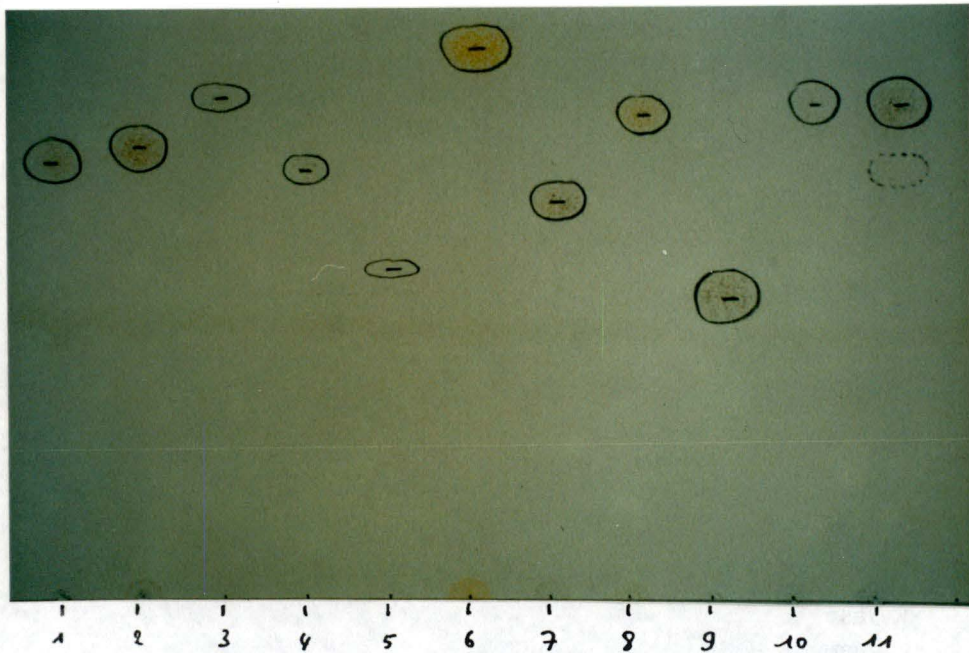


Photo n° 8 : Chromatographie sur couche mince de la fraction H_1^{120} isolée lors de l'hydrolyse de 120 H du polysaccharide Fa par l'hémicellulase.

- 1 : arabinose
- 2 : mannose
- 3 : xylose
- 4 : glucose
- 5 : acide glucuronique
- 6 : rhamnose
- 7 : galactose
- 8 : fucose
- 9 : acide galacturonique

10 et 11 : dépôt de 5 et 10 μ l de l'échantillon hydrolysé H_1^{120} au TFA

On constate que cette fraction contient essentiellement du xylose et un monomère correspondant soit au glucose soit à l'arabinose. Nous verrons plus loin que ce monomère est vraisemblablement de l'arabinose.

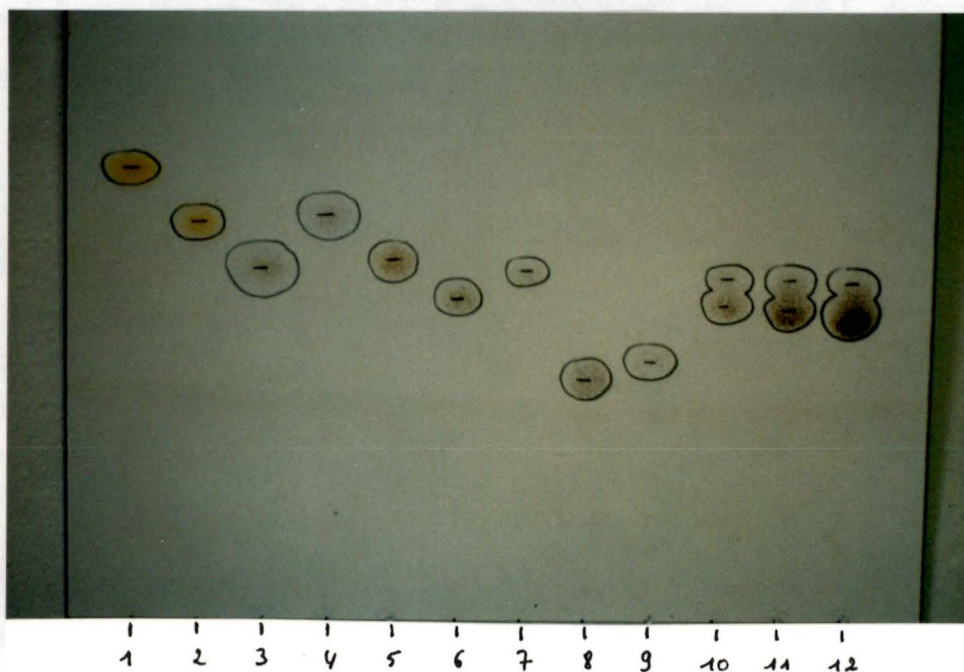


Photo n° 9 : Chromatographie en couche mince de la fraction H_2^{120} isolée lors d'une hydrolyse de 120 H du polysaccharide Fa à l'hémicellulase.

1 : rhamnose

2 : fucose

3 : arabinose

4 : xylose

5 : mannose

6 : galactose

7 : glucose

8 : acide galacturonique

9 : acide glucuronique

10, 11 et 12 : dépôt de 5 10 et 15 μ l de l'échantillon H_2^{120} non hydrolysé au TFA

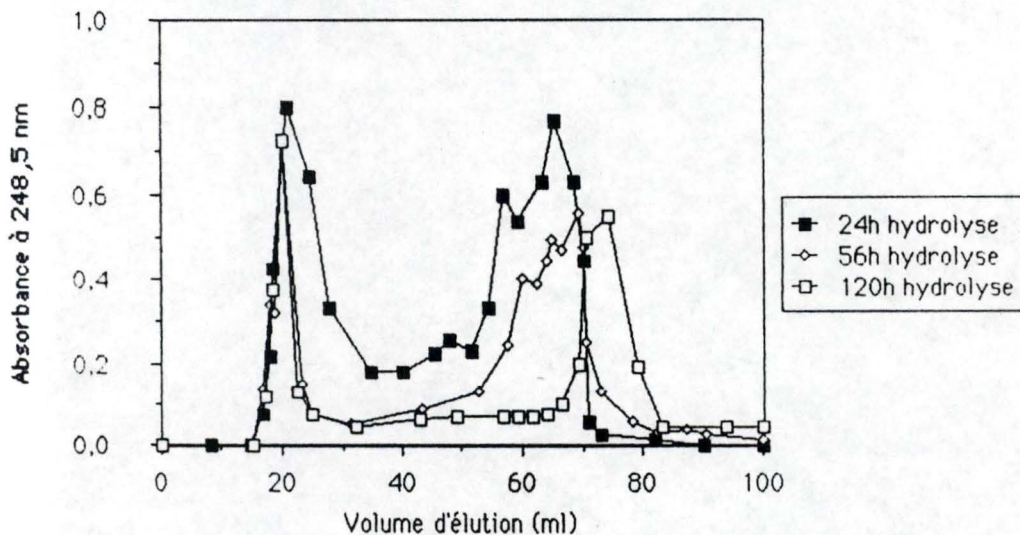
On constate que la fraction contient essentiellement du galactose et du glucose. Ceci permet donc de dire que l'hydrolyse de 120 H finit par libérer des monomères qui ne sont plus reconnus par l'AcMo 663.

Le premier pic, qui répondait encore en ELISA, a cette fois-ci été débarrassé de tout épitope reconnu par le 6G3. D'autre part, le fait que le deuxième pic ne soit pas positif vis-à-vis du 6G3 indiquerait que même les fragments isolés lors de l'hydrolyse de 56 heures ont été tellement hydrolysés par la digestion de 120 heures que l'épitope en est perdu.

Nous avons une chromatographie sur couche mince de ces deux fractions. La fraction H_1^{120} traitée au TFA libère essentiellement du xylose avec des traces d'arabinose (photo 8). La fraction H_2^{120} , quant à elle, non traitée au TFA, libère des monomères de glucose et de galactose (photo 9). L'épitope reconnu par le 6G3 serait donc composé essentiellement de ces deux monomères.

En résumé :

Le schéma ci-dessous reprend les trois schémas d'éluion du polysaccharide Fa hydrolysé, respectivement pendant 34, 56 et 120 heures, par l'hémicellulase.



On retrouve à chaque fois une fraction glycosidique à V_0 qui n'est plus reconnue après 120 heures d'hydrolyse. On constate un décalage des pics vers les petits poids moléculaires, phénomène d'autant plus marqué que l'hydrolyse est longue.

Analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG) et couche mince.

Nous nous sommes limités dans cette analyse à l'étude de fractions polysaccharidiques (positive à l'orcinoI sulfurique) ne quittant pas le gel à V_0 et reconnues par l'AcMo (positives en ELISA).

Nous avons réalisé la transformation des fractions H_3^* et H_4^* provenant de l'hydrolyse de 56 heures en acétates d'alditols (fig. 46,47).

La proportion des monomères présents dans la fraction H_3^* par rapport à la fraction totale en oses neutres était la suivante:

rhamnose	0,044 mg	1,5 %
arabinose	0,056 mg	1,9 %
xylose	0,028 mg	0,9 %
mannose	0,028 mg	0,9 %
galactose	1,207 mg	42,4 %
glucose	1,486 mg	52,2 %

RT	AREA	TYPE	WIDTH	ARFAZ
1.114	9733	PB	.024	1.01729
1.394	4480	VV	.027	.45989
1.458	15498	VV	.032	1.61985
1.544	7571	VB	.029	.79132
1.780	7613	VB	.033	.79571
2.535	7109	BB	.054	.74303
2.856	307151	BB	.061	32.19331
3.125	332482	PB	.064	34.75090
3.421	265201	PB	.062	27.71870

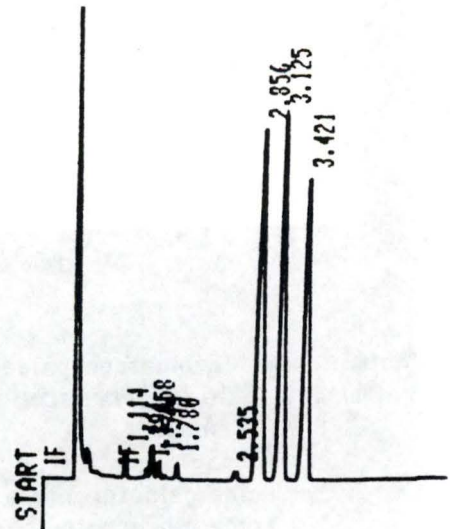


Fig. 46 : Chromatogramme des acétates d'alditols obtenus à partir de la fraction H_3^* isolée lors de l'hydrolyse de 56 heures du polysaccharide Fa par l'hémicellulase. Les fractions majoritaires sont le glucose et le galactose. On observe cependant également des traces de quelques autres sucres neutres tels le rhamnose, l'arabinose, le xylose et le mannose.

La proportion des monomères présents dans la fraction H_4^* par rapport à la fraction totale en oses neutres était la suivante:

rhamnose	0,469 mg	2,9 %
arabinose	0,214 mg	1,3 %
xylose	0,175 mg	1,1 %
galactose	5,657 mg	35,5 %
glucose	9,43 mg	59,1 %

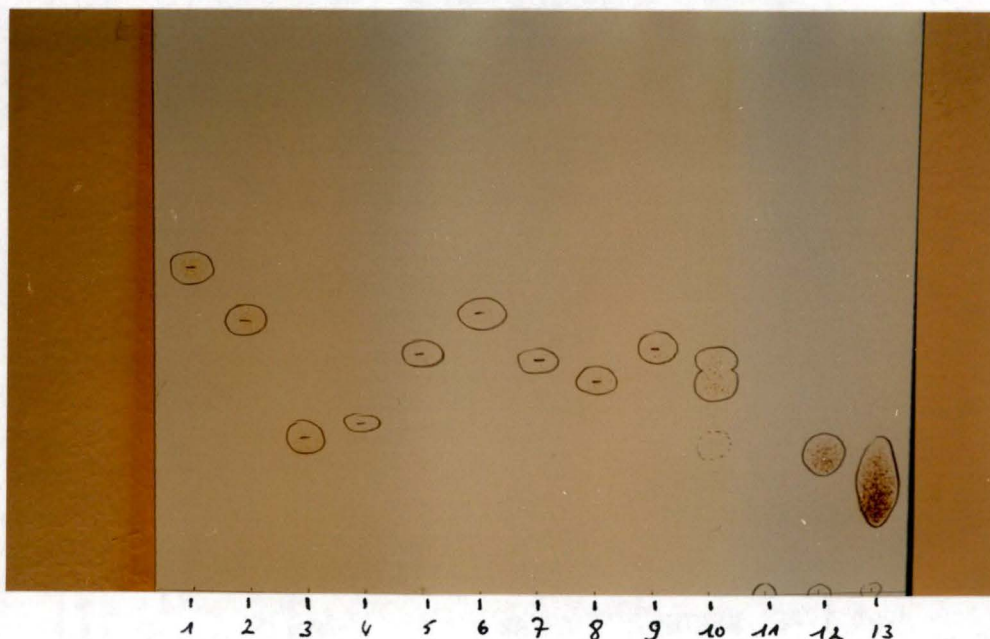


Photo n° 10: Chromatographie sur couche mince des fractions récupérées après un traitement de 56 H à l'hémicellulase.

- 1. : rhamnose
- 2. : fucose
- 3. : acide galacturonique
- 4. : acide glucuronique
- 5. : arabinose
- 6. : xylose
- 7. : glucose
- 8. : galactose
- 9. : mannose
- 10. : fraction H4* traitée au TFA pendant 2 H à 120°C
- 11. : fraction H₁⁵⁶ non traitée au TFA
- 12. : fraction H₃* non traitée au TFA
- 13. : fraction H₄* non traitée au TFA

La fraction H₁⁵⁶ ne migre pas et correspond donc à des fragments oligosaccharidiques de grande taille. Quant aux fractions H₃* et H₄* , elles sont composées de fragments oligosaccharidiques de tailles suffisamment petites pour encore migrer en couche mince. Ces deux dernières fractions vont être analysées plus en détail par chromatographie en phase gazeuse.

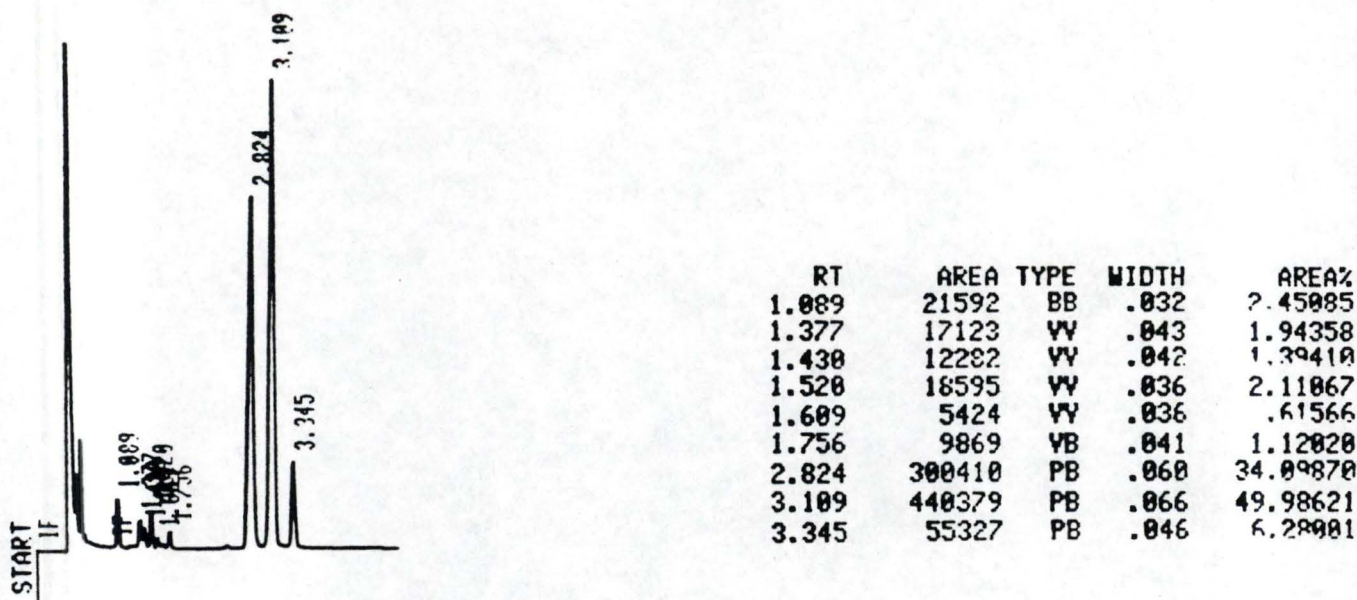


Fig. 47 : Chromatogramme des acétates d'alditols obtenus à partir de la fraction H_4^* isolée lors de l'hydrolyse de 56 heures du polysaccharide Fa par l'hémicellulase. Les fractions majoritaires sont de nouveau le glucose et le galactose. On y observe également des traces de rhamnose, d'arabinose et de xylose.

Les deux fractions H_3^* et H_4^* sont effectivement riches en galactose et glucose. Pour la fraction H_3^* , nous avons un rapport glucose : galactose de 1,2; tandis que la fraction H_4^* est caractérisée par un rapport de 1,6. De plus, ces deux fractions contiennent très peu d'arabinose, ce qui confirme les résultats de la chromatographie réalisée sur couche mince des produits d'hydrolyse au TFA de la fraction H_1^{120}

Il fallait ensuite vérifier le degré de polymérisation des fragments oligosaccharidiques contenus dans les fractions H_3^* et H_4^* . Pour cela nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince de ces fractions non hydrolysées au TFA (photo 10). On remarque d'une part qu'il n'y a pas de monomères de galactose ni de glucose dans l'échantillon H_4^* (piste 13, photo 10); et, d'autre part qu'il y a une substance qui migre et qui ne correspond à aucun monomère susceptible de se retrouver dans le polysaccharide. La fraction H_3^* (piste 12, photo 10) donne également un spot légèrement plus haut qui lui non plus ne trouve pas de correspondance avec un des monomères utilisés comme standard. La différence de comportement en couche mince de ces deux fractions peut être attribuée à la variation du rapport glucose/galactose. La fraction H_1^{56} (piste 10, photo 10) ne migre pas, suggérant un degré de polymérisation élevé.

Jusqu'à présent, nous savions qu'une hydrolyse du polysaccharide Fa libérait plusieurs fractions oligosaccharidiques. Les oligomères libérés lors de l'hydrolyse de 56 heures étaient reconnus par le 6G3 mais les monomères libérés par l'hydrolyse de 120 heures ne l'étaient plus. Il est clair que l'épitope reconnu par l'AcMo 6G3 n'était pas un monomère. Nous avons ensuite déterminé le degré de polymérisation moyen de ces oligomères au moyen d'une chromatographie sur colonne de Bio-Gel P6.

3.8.3.- Détermination du degré de polymérisation moyen de l'épitope reconnu par l'AcMo.

Un préliminaire indispensable à cette détermination était l'étalonnage du gel Bio-Gel P6 utilisé pour séparer les produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa par l'hémicellulase.

Le volume mort V_0 du gel a été déterminé au moyen de bleu dextran (Blue dextran 2000, Pharmacia) et équivalait à 22 ml.

Pour l'étalonnage proprement dit, nous avons utilisé le glucose et du maltoheptaose dont les volumes d'éluion (V_e) sont respectivement de 76 et 45 ml. Connaissant la masse moléculaire du glucose (180 daltons) et celle du maltoheptaose (1153 daltons), il nous a été possible de tracer une droite d'étalonnage (fig. 48) où, en abscisse, on reporte le logarithme de la masse moléculaire et, en ordonnée, le K_{av} égal à $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ avec V_t (volume total) = 89 ml.

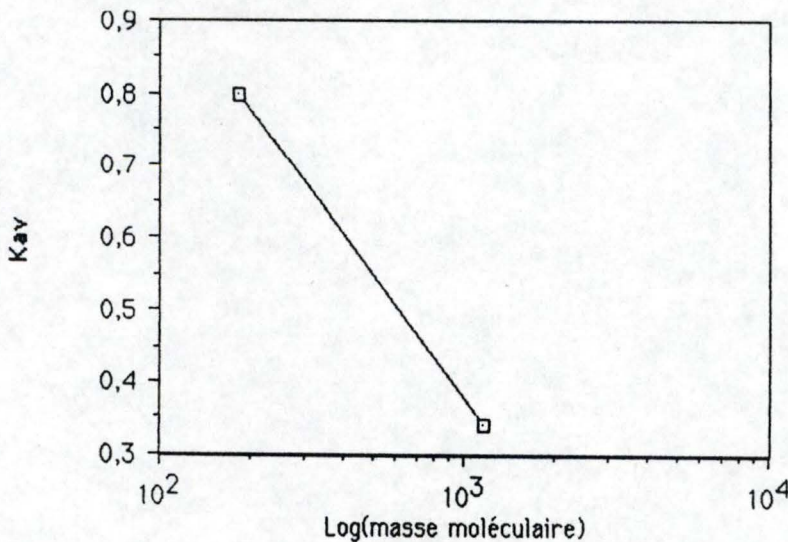


Fig. 48 : Droite d'étalonnage du gel de chromatographie Bio-Gel P6 ($V_0 = 22$ ml).
Le gel a été étalonné en utilisant du glucose (180 daltons, $V_e = 76$ ml) et par du maltoheptaose (1153 daltons, $V_e = 45$ ml).

Pour trouver le degré de polymérisation des fragments oligosaccharidiques reconnus par l'AcMo, il faut se référer au schéma d'élution des produits d'hydrolyse du polysaccharide Fa lors d'une digestion à l'hémicellulase de 56 heures (fig. 42). Le pic H_4^* , qui rassemble les pics H_2^{56} , H_3^{56} et H_4^{56} , s'élue entre 55 et 70 ml, ce qui équivaut à des K_{av} de 0,49 et 0,71 respectivement. Si on reporte ces valeurs sur la droite d'étalonnage, on constate qu'elles correspondent à une gamme de degré de polymérisation compris entre 2 et 4. Comme le pic H_4^* englobe 3 pics, il nous est difficile de connaître exactement la taille minimale de l'épitope reconnu par l'AcMo.

3.9.- Discussion générale.

Au terme de ce travail, nous possédons un polysaccharide Fa isolé du surnageant de culture en suspension de compagnon blanc, purifié et caractérisé quant à sa composition monomérique. Nous avons de plus un polysérum et une IgM monoclonale spécifiques de ce polysaccharide. Un des buts de la production d'AcMo étant d'étudier la conformation des polysaccharides pariétaux, nous avons utilisé nos résultats pour tenter d'inférer sur la structure de ce polysaccharide Fa.

Le polysaccharide Fa contient peu d'acide uronique, il n'est pas sensible à l'action de la pectinase et n'est pas reconnu par un AcMo anti-pectine (2F4). Il est donc clair que si des séquences homopolylacturoniques existent dans ce polymère, elles doivent être d'une longueur très réduite, inférieure à un degré de polymérisation de huit. Cette présence d'acide uronique dans une hémicellulose n'est pas exceptionnelle : Shimizu et Samuelson (1973) cités par (3), ont détecté des résidus rhamnosyls et galacturonosyls dans une xylane purifiée de bouleau.

Le polysaccharide Fa, sensible à la driselase, révèle par chromatographie en phase gazeuse une teneur importante en xylose. Ces deux propriétés sont caractéristiques des hémicelluloses de type xylane dont la chaîne principale est constituée d'un agencement répété de résidus xyloses en liaison β -1,4-. Sur cette épine dorsale se greffent des chaînes latérales de compositions variables dans lesquelles on doit retrouver les oses neutres détectés par CPG.

Cette conformation du polysaccharide permet d'interpréter plus facilement les résultats des hydrolyses à l'hémicellulase. Une hydrolyse de 56 heures ne détruit pas l'épitope contrairement à une hydrolyse de 120 heures. Ces deux hydrolyses sont caractérisées par l'élution d'une fraction glycosidique de haut poids moléculaire quittant le gel à V_0 , mais la digestion de 56 heures laisse subsister des épitopes reconnus par l'AcMo, ce qui n'est pas le cas de la digestion de 120 heures. Le résidu de haut poids moléculaire qui résiste à cette longue digestion contient essentiellement du xylose ainsi qu'une certaine quantité d'arabinose. On en déduit que l'épitope reconnu par l'AcMo 6G3 se trouve au niveau des chaînes latérales que l'hémicellulase utilisée détache de la chaîne principale de xylose. On retrouve d'ailleurs ces épitopes à des volumes d'élution beaucoup plus grands lorsqu'on chromatographie les produits d'hydrolyses modérées (24 et 56 heures) du polysaccharide Fa et qu'on les soumet à un test ELISA.

Les volumes d'élution auxquels on les retrouve correspondent à des oligosaccharides de degrés de polymérisation compris entre 2 et 4. Des épitopes aussi courts sont probablement séquentiels. Par chromatographie en phase gazeuse des plus petits fragments oligosaccharidiques encore reconnus par l'anticorps, nous avons pu établir que l'épitope était composé essentiellement de glucose et galactose.

Nous retiendrons donc comme modèle général du polysaccharide Fa, l'hypothèse d'une molécule linéaire de xylose, "hérissée" de chaînes latérales de galactose et de glucose.

Les résidus xylozes sont quantitativement majoritaires dans le polysaccharide étudié. On s'attendait donc à trouver, lors du criblage, des Ac orientés contre cette fraction xylose majoritaire, c-à-d contre la chaîne principale de la molécule. Or, on constate curieusement que l'AcMo que nous avons produit est orienté contre une fraction riche en galactose et glucose. Comment expliquer l'absence d'Ac contre la chaîne principale de xylose?

Le polysaccharide Fa, après injection aux souris, perd son intégrité au niveau des macrophages. En effet, dans l'élaboration d'une réponse immunitaire antigène-dépendante, ce n'est pas l'antigène tout entier qui est reconnu comme étranger, mais seulement un ou plusieurs sites particuliers de celui-ci. Ces sites sont découpés dans l'antigène au niveau des macrophages. Dans le cas du polysaccharides Fa, il est hautement probable que cette dégradation ait réussi à débarrasser la chaîne principale de xylose de ses chaînes latérales, et donc d'exposer aux lymphocytes T à la fois des fragments de chaînes latérales et des fragments de la chaîne principale. Si tel est le cas, les souris peuvent très bien avoir produit des anticorps contre la chaîne principale de xylose. Pourquoi ces anticorps n'ont-ils pas été détectés lors du criblage?

On se rappellera que le criblage des surnageants de culture des hybridomes a été réalisé sur le polysaccharide Fa entier immobilisé au fond des micropuits. Il est probable que les chaînes latérales ont constitué un obstacle stérique à l'approche d'éventuels anticorps spécifiques de la chaîne principale de xylose. Ces éventuels anticorps n'auraient simplement pas été détectés lors du criblage.

Une deuxième hypothèse, moins plausible, postule que le polysaccharide Fa ait conservé partiellement sa conformation de molécule branchée au niveau des cellules présentatrices de l'antigène. La chaîne principale de xylose aurait été masquée par la présence des chaînes latérales et il n'y aurait donc pas eu d'anticorps produit contre la fraction xylose majoritaire.

La vérification la plus simple de ces hypothèses consisterait à tester un sérum de souris immunisée avec le polysaccharide Fa contre le résidu d'hydrolyse de 120 heures à l'hémicellulase. Une réponse positive confirmerait le modèle proposé sur la conformation du polysaccharide ainsi que la production d'anticorps contre la chaîne principale de xylose.

Conclusions et perspectives.

Le but de ce travail était de produire des anticorps monoclonaux contre une hémicellulose du surnageant de culture de cellules cultivées en suspension de *Silene alba*, le compagnon blanc.

Nous avons séparé un polysaccharide Fa par précipitation à l'éthanol, chromatographie d'échange d'ions et tamis moléculaire. Par chromatographie en phase gazeuse, nous avons déterminé que ce polysaccharide contenait 37,8 % de xylose, 24,3 % de glucose, 17,9 % de galactose, 16,3 % d'arabinose ainsi que des traces de rhamnose et de mannose. Ce polysaccharide contient également 3,2 % d'acides uroniques et 3,7 % de ses monomères constitutifs sont réducteurs. Sensible à la digestion à la driselase, le polysaccharide Fa est une xylane qui ne correspond pas aux xylanes décrites dans la littérature.

Nous avons produit un sérum et un anticorps monoclonal contre cette xylane. L'épitope est porté par des chaînes latérales composées de glucose et de galactose, greffées sur le squelette linéaire de xylose. Cet épitope est formé de deux à quatre monomères.

Des perspectives à court et à long terme se dégagent de ce travail. En ce qui concerne la xylane que nous avons purifiée, des analyses par méthylation, chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse et des analyses par RMN du ^{13}C permettraient de caractériser le type de liaisons présentes dans le polysaccharide et de déterminer la séquence exacte de l'épitope reconnu par l'AcMo 6G3.

Le fait que cet anticorps monoclonal 6G3 est une IgM ne nous permet pas d'envisager son couplage à un gel pour la réalisation de chromatographies d'affinité. Cet anticorps, intact ou réduit à l'état de monomères, peut cependant être utilisé pour des marquages immunocytochimiques. On pourrait ainsi localiser *in situ* le polysaccharide aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique, et étudier ses voies de synthèse.

Un couplage du polysaccharide natif ou de fragments de celui-ci à une protéine "porteur" aurait vraisemblablement permis d'isoler plus de clones lors du criblage et de diversifier l'isotypie des immunoglobulines produites. Le criblage, lui-même, aurait pu être optimisé en testant les surnageants de culture des hybridomes sur des fragments polysaccharidiques plutôt que sur le polymère natif.

A long terme, la production d'une gamme d'AcMo caractéristiques de motifs oligosaccharidiques déterminés permettrait de reconstruire par de simples tests ELISA, épitope par épitope, la structure et la conformation d'un polysaccharide inconnu. L'avantage, en effet, de ces sondes immunologiques est de reconnaître aussi bien des séquences que des conformations particulières. La mise au point d'une telle méthodologie faciliterait grandement l'étude de la paroi cellulaire végétale, des relations entre ses polymères constitutifs et de la signification physiologique à accorder à des molécules aussi diversifiées.

Références bibliographiques.

- 1 York W.S. , A.G. Darvill, M. McNeil, T.T. Stevenson, and P. Albersheim(1986)
Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components
Methods in Enzymology **118** : 3-40
A. Weissbach and H. Weissbach Eds
- 2 Albersheim P. and A. Darvill(1985)
Les oligosaccharines
Pour La Science **11** : 18-26
- 3 McNeil M. , A.G. Darvill, S.C. Fry, and P. Albersheim (1984)
Structure and function of the primary cell walls of plants
Ann. Rev. Biochem. **53** : 625-663
- 4 Ahmed A.E. and J.M. Labavitch(1980)
Cell wall metabolism in ripening fruit
I. Cell wall changes in ripening 'Bartlett' pears
Plant Physiol. **65** : 1009-1013
- 5 Parham P. (1986)
Preparation and purification of active fragments from mouse monoclonal antibodies.
Handbook of experimental immunology vol.1 : 14.1-14.19
D.M. Weir Eds. Blackwell Scientific Publications.
- 6 DuPont M.S. and R.R. Selvendran (1987)
Hemicellulosic polymers from the cell walls of beeswing wheat bran:Part I, polymers solubilised by alkali at 2°
Carbohydrate Research **163** : 99-113
- 7 McNeil M. , A.G. Darvill et P. Albersheim (1979)
The structural 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 367 pp
- 8 Kato Y. , S. Ito, K. Iki et K. Matsuda (1982)
Xyloglucan and β -D-glucan en cell walls of rice seedlings
Plant and Cell Physiol. **23(3)** : 351-364
- 9 Vian B. , D. Reis, M. Mosiniak et J.C. Roland (1986)
The glucuronoxylans and the helicoidal shift in cellulose microfibrils in linden wood. Cytochemistry *in muro* and on isolated molecules.
Protoplasma **131** : 185-199

- 10 Darvill J.E. , M. McNeil, A.G. Darvill, and P. Albersheim (1980)
Structure of plant cell walls
XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells
Plant Physiol. **66** : 1135-1139

- 11 Nishitani K. et D.J. Nevine (1988)
Enzymic analysis of feruloylated arabinoxylans (feraxans) derived from *Zea mays* cell walls. Purification of novel enzymes capable of dissociating feraxan fragments from *Zea mays* coleoptile cell walls.
Plant Physiol. **87** : 883-890

- 12 Maltby D. , N.C. Carpita, D. Montezinos, C. Kulowet D.P. Delmer (1979)
 β -1,3-glucan in developing cotton fibers. Structure, localization and relationship of synthesis to that of secondary wall cellulose.
Plant Physiol. **63** : 1158-1164

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

- 14 Thomas J.R. , M. McNeil, A.G. Darvill, and P. Albersheim (1987)
Structure of plant cell walls
XIX. Isolation and characterization of wall polysaccharides from suspension cultured Douglas fir cells
Plant Physiol. **83** : 659-671

- 15 Joseleau J-P et G. Chambat (1984)
Structure of the primary cell walls of suspension cultured *Rosa glauca* cells. II. Multiple forms of xyloglucans.
Plant Physiol. **74** : 694-700

- 16 Carpita N.C. (1986)
Cell wall development in graminaceous monocots.
Cell walls 180-183

- 17 Kato Y. et K Matsuda (1985)
Xyloglucan in the cell walls of suspension-cultured rice cells.
Plant Cell Physiol. **26(3)** : 437-445

- 18 Massiot P. , X. Rouau and J-F. Thibault (1988)
Isolation and characterisation of the cell-wall fibres of carrot
Carbohydrate research **172** : 217-227

- 19 Smith M.M. et R.D. Hartley (1983)
Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell wall polysaccharides in graminaceous plants.
Carbohydrate Research **118** : 65-80
- 20 Nevins D.J. , D.J. Huber, R. Yamamoto et W.H. Loescher (1977)
 β -D-glucan of *Avena* coleoptile cell walls
Plant Physiol. **60** : 617-621
- 21 Eda S. , Y. Akiyama et K. Kato (1985)
A galactoglucomannan from cell walls of suspension-cultured tobacco cells.
Carbohydrate Research **137** : 173-181
- 22 Keegstra K. , K.W. Talmadge, W.D. Bauer et P. Albersheim (1973)
The structure of plant cell walls
A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnection of the macromolecular components.
Plant Physiol. **51** : 188-196
- 23 Bauer W.D. ,K.W. Talmadge,K. Keegstra, and P. Albersheim (1973)
The structure of plant cell walls
II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells
Plant Physiol. **51** : 174-187
- 24 Bartley I.M. (1976)
Changes in the glucans of ripening apples
Phytochemistry vol.**15** : 625-626
- 25 Bolwell G.P. et D.H. Northcote (1981)
Control of hemicellulose and pectin synthesis during differentiation of vascular tissue in bean (*Phaseolus vulgaris*) callus and in bean hypocotyl.
Planta **152** : 225-233
- 26 Rombouts F.M. and J-F Thibault (1986)
Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp.
Carbohydrate Research **154** : 189-203
- 27 Stevenson T.T. , M. McNeil, A.G. Darvill, and P. Albersheim(1986)
Structure of plant cell wall
XVIII. An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension-cultured sycamore cells
Plant Physiol. **80** : 1012-1019

- 28 de Vries J.A. , F.M. Rombouts, A.G.J. Voragen et W. Pilnik (1983)
Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances
Carbohydrate Polymers **3** : 245-258
- 29 Jarvis M.C. (1984)
Structure and properties of pectin gels in plant cell walls
Plant, Cell and Environment **7** : 153-164
- 30 Fry S.C. (1983)
Feruloyated pectins from the primary cell wall: their structure
and possible functions
Planta **157** : 111-123
- 31 Dubois M. , K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers et F. Smith (1956)
Colorimetric method for determination of sugars and related
substances.
Analytical Chemistry vol.**28(3)** : 350-356
- 32 Massiot P., X. Rouau and J-F. Thibault(1988)
Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the
cell wall of carrot
Carbohydrate Research **172** : 229-242
- 33 Vian B. (1986)
Ultrastructural localization of carbohydrates. Recent developments in
cytochemistry and affinity methods
NATO ASI Series, Vol. **H1**
Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions
Edited by J. Bailey
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- 34 Bateman D.F. et H.G. Basham (1976)
Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes.
In Encyclopedia of plant physiology, Physiological Plant Pathology
Ed. par R. Heitefuss et P.H. Williams vol.**4** : 316-355
Springer-Verlag, Berlin
- 35 Clark M.F. , R.M. Lister , M. Bar-Joseph (1986)
ELISA techniques
Methods in Enzymology **118** : 743-766
A.H. Weissbach Eds

- 36 Thomas J.E. (1988)
The use of ELISA to detect viruses of crop plants
Animal and Plant Sciences 137-142
- 37 Tijssen 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
- 38 Liners F. (1988)
Production et caractérisation d'anticorps poly- ou monoclonaux contre l'acide α -1,4-homopolygalacturonique.
Mémoire de 2^{ème} Licence en Sciences biologiques, FUNDP
- 39 Milstein C. (1986)
Overview : Monoclonal antibodies
in Handbook of Experimental Immunology 4 : 107
D.M. Weir Eds
- 40 Fry S.C. (1989)
The structure and function of xyloglucan
Journal of Experimental Botany vol.40(210) : 1-11
- 41 Hayashi T. et G. Maclachlan (1984)
Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organisation.
Plant Physiol. 75 : 596-604
- 42 Labavitch et Ray (1974)
Turnover of cell wall polysaccharides in elongating pea stem segments.
Plant Physiol. 53 : 669-673
- 43 York W.S. , A.G. Darvill et P. Albersheim (1984)
Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation by a xyloglucan oligosaccharide
Plant Physiol. 75 : 295-297
- 44 Moore P.J. et L.A. Staehelin (1988)
Immunogold localization of the cell wall matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense*L. ; implication for secretory pathways.
Planta 174 : 433-445

- 45 Hayashi Y. et K. Ueda (1987)
Localisation of mannose, N-acetylglucosamine and galactose in the Golgi apparatus, plasma membrane and cell walls of *Scenedesmus acuminatus*.
Plant Cell Physiol. **28(8)** : 1357-1362
- 46 Förster H. et K. Mendgen (1987)
Immunocytochemical localization of pectinesterases in hyphae of *Phytophthora infestans*
Can. J. Bot. **65** : 2607-2613
- 47 Irvin R.T. et H. Ceri (1985)
Immunochemical examination of the *Pseudomonas aeruginosa* glycocalyx : a monoclonal antibody which recognizes L-guluronic acid residues of alginic acid.
Can. J. Microbiol. **31** : 268-275
- 48 Zopf D. , K. Schroer, G. Hansson, J. Dakour et A. Lundblad (1987)
Affinity purification of oligosaccharides using monoclonal antibodies.
In Methods in Enzymology **138** : 307-313
- 49 Vreeland V. , M. Slomich et W.M. Laetsch (1984)
Monoclonal antibodies as molecular probes for cell wall antigens of the brown alga, *Fucus*
Planta **162** : 506-517
- 50 Northcote D.H. (1985)
Control of cell wall formation during growth.
In Biochemistry of plant cell walls.
Society for Experimental Biology. Seminar Series 28 : 177-197
Ed. by C.T. Brett et J.R. Hillman
- 51 Mc Dougall G.J. et S.C. Fry (1989)
Anti-auxin activity of xyloglucan oligosaccharides: the rôle of groups other than the terminal α -L-fucose residue.
Journal of Experimental Botany vol.**40(221)** : 233-238
- 52 Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A. Lewis Farr et R.J. Rendall (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., **193** : 265-275
- 53 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. , accepted for publication.

- 54 Rees D.A. (1977)
Polysaccharide Shapes.
Outline Studies in Biology, Chapman and Hall, p. 52
- 55 Alberts B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J.D. Watson (1983)
In Biologie moléculaire de la cellule, p. 1102
Flammarion Médecine Sciences
- 56 Waldron K.W. et C.T. Brett (1985)
Interaction of enzymes involved in cell-wall heteropolysaccharide biosynthesis.
In Biochemistry of plant cell walls.
Society for Experimental Biology. Seminar Series **28** : 79-98
Ed. by C.T. Brett et J.R. Hillman
- 57 Köhler G. et C. Milstein (1975)
Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature, **256** : 595-597