

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Stratégie d'isolement et de couplage de fragments oligosaccharidiques en vue de la production d'anticorps dirigés contre les chaînes latérales de pectines natives

Perpète, Philippe

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

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

**Stratégie d'isolement et de couplage de fragments
oligosaccharidiques en vue produire des anticorps dirigés
contre des chaînes latérales de pectines natives.**

PERPETE Philippe

Résumé

Nous avons isolé des chaînes latérales de pectines à partir du surnageant de cellules de *Lactaria lactis* en suspension par passage sur une colonne échangeuse d'anions et β -élimination. Une analyse en chromatographie en phase gazeuse montre que le produit de cet isolement contenait du rhamnose, du glucose, de l'arabinose, du galactose, du xylose, des traces de fucose et encore quelques résidus galacturoniques.

Un couplage à l'albumine sérique bovine méthylée et l'injection par voie intrapéritonéale de ce complexe avec l'adjuvant de Freund nous a permis d'obtenir un polysérum dirigé contre le polysaccharide isolé. Le polysérum ne reconnaît pas la pectine acide.

Summary

We have isolated side-chains of pectins from the supernatant of cell suspension cultures of *Lactaria lactis* by anion exchange chromatography and β -elimination. By gas chromatography, we have determine the composition of these chains : they contain rhamnose, glucose, arabinose, galactose, xylose, traces of fucose and some galacturonic residues.

After coupling with methylated bovine serum albumin and intraperitoneal injection of the mixture emulsified in Freund's adjuvant, we have recovered a polyserum the recognises the purified oligosaccharidic fraction. The serum does not coss-react with pectic acid.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1990

Promoteur : P. Van Cutsem

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, plus particulièrement M Van Cutsem pour l'accueil et l'aide que j'ai reçus dans son laboratoire, ainsi que tous les membres du laboratoire de Biotechnologie théorique.

Je remercie mes parents et Laurence pour leur soutien moral tout au long de ce travail.

TABLE DES MATIERES

1. PRELIMINAIRES	1
2. INTRODUCTION	2
2.1 Structure générale et composants principaux de la paroi	2
2.1.1 Structure.....	2
2.1.2 Composants de la paroi primaire.....	2
2.1.3 Modèle de la paroi.....	3
2.1.4 Rôles de la paroi.....	3
2.2 Les pectines	3
2.2.1 Composition chimique.....	3
2.2.2 Les propriétés des pectines.....	4
2.2.3 Biosynthèse des polysaccharides pectiques.....	4
2.2.4 Les chaînes latérales.....	5
2.3 Isolement du matériel polysaccharidique à partir du surnageant de culture de cellules de <i>Daucus carotta</i>	6
2.4 Technique de production d'un polysérum	7
2.4.1 L'haptène.....	7
2.4.2 L'effet Carrier.....	7
2.4.3 Les antigènes T-indépendants.....	7
2.4.4 Couplage des haptènes aux molécules porteuses.....	8
2.4.5 Cinétique de la réponse anticorps.....	8
2.4.6 Techniques d'immunisation.....	9
2.5 But du travail et stratégie de couplage	10
3. MATERIELS ET METHODES	
3.1 Culture en suspension de cellules de <i>Daucus carotta</i>	11
3.1.1 Mode de culture.....	11
3.1.2 Mode de repiquage.....	12

3.2 Purification des polysaccharides pectiques	12
3.2.1 Purification du surnageant.....	12
3.2.2 Extraction des polysaccharides pectiques.....	13
3.2.2.1 Précipitation à l'acétate de cuivre.....	13
3.2.2.2 Précipitation à l'éthanol.....	13
3.2.2.3 Séparation sur colonne échangeuse d'anions.....	13
3.2.3 Isolement des chaînes latérales.....	14
3.2.3.1 Par digestion enzymatique.....	14
3.2.3.2 Par β -élimination.....	15
3.3 Analyse chimique	15
3.3.1 Dosages colorimétriques.....	15
3.3.1.1 Dosage des oses neutres par la méthode de Dubois.....	15
3.3.1.2 Dosage des acides uroniques par la méthode au méthahydroxybiphénile.....	15
3.3.2.3 Dosage des sucres réducteurs par la méthode à l'acide dinitrosalicylique.....	16
3.3.2.4 Dosage des protéines par la méthode de Folin.....	16
3.3.2 Dosage qualitatif sur couche mince: révélation à l'orcinol sulfurique.....	16
3.3.3 Analyse du polysaccharide en chromatographie en phase gazeuse.....	17
3.3.3.1 Méthode des acétates d'alditols.....	17
3.3.3.2 Dérivés Triméthylsilyls (TMS).....	19
3.4 Techniques d'immunisation	20
3.4.1 Immunisation par voie intrapéritonéale.....	20
3.4.1.1 Couplage du polysaccharide.....	20
3.4.1.2 Formation du mélange d'immunisation intrapéritonéale.....	21
3.4.2 Immunisation par voie intrasplénique.....	21
3.4.2.1 Adsorption de l'antigène sur nitrocellulose.....	21
3.4.2.2 Couplage de l'antigène au sépharose 4B.....	21
3.4.2.3 Immunisation intrasplénique.....	22

3.5 Analyse des polyséras et tests ayant recours aux anticorps	23
3.5.1 Test en <i>dot blot</i> sur nitrocellulose.....	23
3.5.2 Test ELISA.....	24

4. RESULTATS ET DISCUSSION.....26

4.1 Isolement des chaînes latérales	26
4.1.1 Isolement par précipitation et digestion enzymatique.....	26
4.1.1.1 Par acétate de cuivre.....	26
4.1.1.2 Par éthanol.....	28
4.1.1.3 Influence du tampon d'éluion.....	29
4.1.2 Isolement par β -élimination.....	29
4.1.2.1 β -élimination.....	30
4.1.2.2 Influence du tampon d'éluion.....	31
4.1.3 Analyse des échantillons par chromatographie en phase gazeuse.....	32
4.2 Amélioration du rendement	34
4.2.1 Concentration des échantillons.....	34
4.2.2 Influence du gel échangeur d'anions.....	35
4.2.2.1 DEAE Séphadex A50.....	36
4.2.2.2 DEAE Séphacel.....	36
4.2.2.3 Choix du gel échangeur d'anions.....	37
4.2.3 Analyse des échantillons par chromatographie en phase gazeuse.....	38
4.2.3.1 F(QAE).....	39
4.2.3.2 F(DEAE).....	39
4.3 Discussion générale concernant l'isolement des chaînes latérales	41
4.4 Analyse des polyséras	41
4.4.1 Calendrier des immunisations.....	41
4.4.2 Vérification de la présence d'anticorps anti-polysaccharides par test en <i>dot blot</i>	43
4.4.2.1 Effet du tampon.....	43
4.4.2.2 Test en <i>dot blot</i> après le premier rappel..	43
4.4.2.3 Test en <i>dot blot</i> après le second rappel..	43
4.4.3 Tests sur la reconnaissance du polysérum et la structure de l'antigène.....	45
4.4.3.1 Séparation de l'antigène sur Biogel P10....	45
4.4.3.2 Reconnaissance par le polysérum des souris immunisées en intrapéritonéale.....	46

4.4.3.3 Reconnaissance par le 2F4.....	46
4.4.3.4 Reconnaissance par le 6G3.....	46
<u>4.5 Discussion générale concernant le polysérum obtenu</u>	47
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	48
6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49

1. Préliminaires

Des structures riches en sucres se retrouvent sur la face externe de la membrane plasmique chez la plupart des cellules vivantes. Chez les cellules végétales des plantes supérieures, les polysaccharides forment une paroi.

L'étude de la structure de la paroi végétale se heurte au problème de la complexité des polysaccharides constitutifs. A la diversité des sucres qui constituent la paroi, s'ajoute la complexité des liaisons entre les unités monosaccharidiques. Ainsi, deux sucres à 6 carbones peuvent se lier de 64 façons différentes entre eux, trois sucres à 6 carbones, de plus de 1000 façons différentes.... (Albersheim and Darvill, 1985).

Il existe des techniques cytochimiques permettant de situer une structure chimique globale, mais ces substances ne sont pas suffisamment spécifiques pour permettre une reconnaissance structurale de la matrice polysaccharidique. On peut citer comme exemple l'acide hydroxamique pour les groupements carboxyliques estérifiés, le periodate pour les groupes glycols, l'or colloïdal pour les groupes acides...(Roland, 1987).

D'autre part, il existe quelques marqueurs immunocytochimiques spécifiques donnant la localisation, ainsi qu'une indication quant à la structure primaire et/ou secondaire, du polysaccharide. Ces sondes sont peu nombreuses, ce qui a amené le laboratoire à produire des anticorps monoclonaux contre l'acide pectique (Liners, 1988) et une xylane (Messiaen, 1989). Mais aucune production d'anticorps n'a encore été tentée contre les chaînes latérales des pectines.

C'est pourquoi nous avons voulu isoler des chaînes latérales de pectines natives, les coupler pour les rendre immunogènes et essayer différentes techniques d'immunisation en vue de produire un polysérum contre ces chaînes latérales.

2. Introduction

2.1 Structure générale et composants principaux de la paroi

2.1.1 Structure

La paroi est un élément fondamental de la cellule végétale. Elle est composée d'un assemblage complexe de polysaccharides. On distingue la paroi primaire, caractéristique des cellules en croissance, de la paroi secondaire, déterminant la taille et la forme des cellules matures.

La paroi primaire est, en fait, un réseau de microfibrilles de cellulose enchassées dans une matrice amorphe de polysaccharides et de quelques glycoprotéines. Dans la paroi secondaire on observe une plus grande proportion de cellulose, ainsi que de la lignification (McNeil *et al.*, 1984).

2.1.2 Composants de la paroi primaire

La paroi est composée de 90 % de polysaccharides et de 10 % de glycoprotéines. Parmi les polysaccharides, on retrouve :

* La cellulose : composée de $\beta(1-4)$ -glucoses qui s'associent en microfibrilles par des ponts hydrogènes.

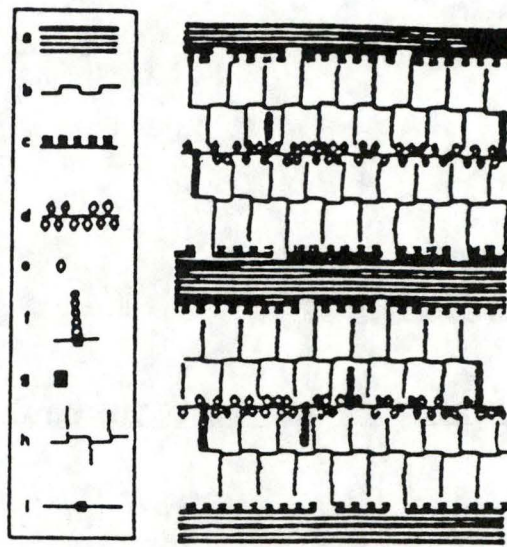
* Les hémicelluloses : elles sont généralement définies comme n'étant ni des pectines, ni de la cellulose. On distingue,

- les xyloglucanes : squelette de $\beta(1-4)$ -D-glucoses à chaînes latérales $\alpha(1-6)$ - D-xyloses;

- les xylanes : D-xyloses reliées en $\beta(1-4)$ à chaînes latérales riches en arabinofuranoses reliées au niveau des C(O)-2 et C(O)-3;

- les β -glucanes : mélange de $\beta(1-3)$ et $\beta(1-4)$ glucanes.

* Les pectines : Il s'agit de chaînes d'acides $\alpha(1-4)$ D-galacturoniques où l'on retrouve intégrés des résidus L-rhamnoses liés en $\alpha(1-2)$ dont le C(O)-4 est branché à une chaîne latérale neutre. Nous détaillerons leur structure dans le chapitre qui leur est consacré.

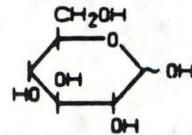


- a: microfibrilles de cellulose
 b: rhamnogalacturonanes (squelette pectique)
 c: xyloglucanes
 d: protéines de paroi avec tétra-arabino-sides
 e: arabinosides liés à l'hydroxyproline
 f: arabinogalactanes de type II liés au résidu sérine
 g: résidus sérine des protéines de paroi
 h: polyosides pectiques: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

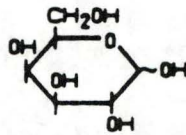
Fig 2.1 Organisation des polysaccharides de la paroi primaire (Saulnier, 1987).

Oses à 6 atomes de carbone

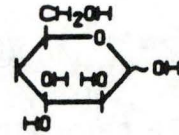
HEXOSES



D-glucose=D-Glcp⁽¹⁾

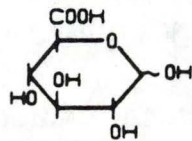


D-galactose=D-Galp

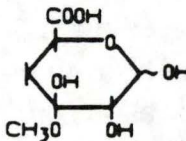


D-mannose=D-Manp

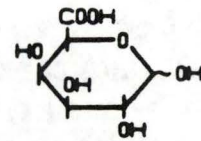
ACIDES URONIQUES



Acide D-glucuronique = D-GlcpA⁽¹⁾

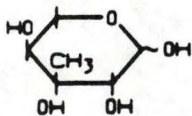


Acide 4-O-méthyle-D-glucuronique = (4-Me)-D-GlcpA

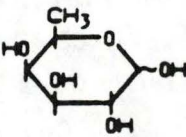


Acide D-galacturonique = D-GalpA

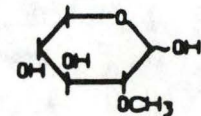
METHYLE PENTOSES



L-rhamnose = L-Rhap

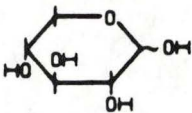


D-fucose = D-Fucp

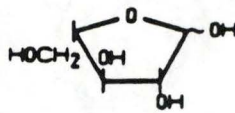


2-O-méthyle-D-xylose = (2-Me)-D-Xylp

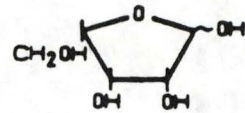
Oses à 5 atomes de carbone



D-xylose=D-Xylp



L-arabino=L-Araf⁽¹⁾



D-apiose=D-Apif

(1) D-Glcp=D-glucopyranose, D-GlcpA=Acide D-glucopyranosyluronique, L-Araf=L-arabinofuranose

Fig 2.2 Oses constitutifs des polysaccharides pectiques (Saulnier, 1987).

2.1.3 Modèle de la paroi

Nous ne décrivons ici que le modèle de la paroi primaire. Celle-ci serait composée d'une matrice, mélange d'hétéropolymères à capacité variable en ce qui concerne la formation d'un gel, formant un réseau hydraté où les enzymes oxydatives et hydrolytiques jouent un rôle non négligeable pour son assemblage. Ce modèle, incomplet, ne tient pas compte des changements mécaniques lors de l'extension en taille de la cellule (Bacic, A. *et al*, 1988).

2.1.4 Rôles de la paroi

Tous les rôles de la paroi ne sont pas encore élucidés, on peut toutefois citer :

(a) un rôle mécanique : la paroi forme une enceinte autour du plasmalemme de la cellule végétale, lui permettant ainsi de résister à la pression de turgescence (York *et al*, 1986) ;

(b) un rôle protecteur : la paroi forme une barrière physique contre les microorganismes et autres pathogènes (Jarvis *et al*, 1984) ;

(c) un rôle régulateur : la paroi jouerait un rôle particulier au moyen de substances dérivées de sa structure : les oligosaccharines (Mc Neil *et al*, 1984 ; Albersheim and Darvill, 1985).

2.2 Les pectines

2.2.1 Composition chimique

Les pectines forment un tiers de la paroi primaire des dicotylées (Guillon and Thibault, 1989) mais seulement 10 % de celle des monocotylées (Saulnier, 1987). Comme nous venons de le voir, il s'agit de chaînes d'acides galacturoniques, interrompues par des résidus rhamnoses. On distingue les rhamnogalacturonanes de type I et II.

Les rhamnogalacturonanes de type I : Les unités L-rhamnoses sont reliées aux chaînes homopolysaccharidiques par des liens $\alpha(1-2)$ (Saulnier, 1987). Ces chaînes d'acides galacturoniques peuvent être estérifiées (Stevenson *et al*, 1986). On retrouve,

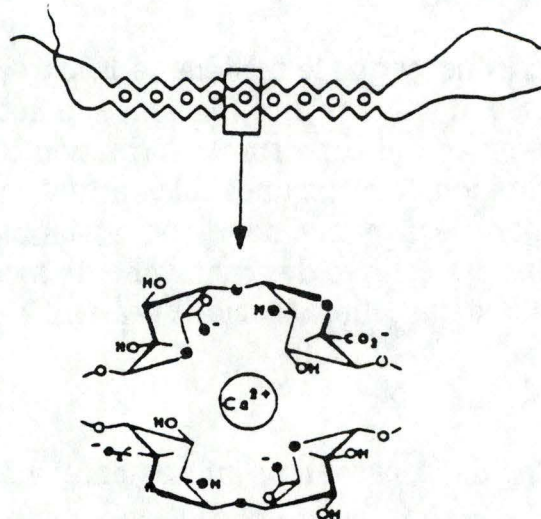


Fig 2.3 Association des pectines par l'intermédiaire de cations calcium (Saulnier, 1987).

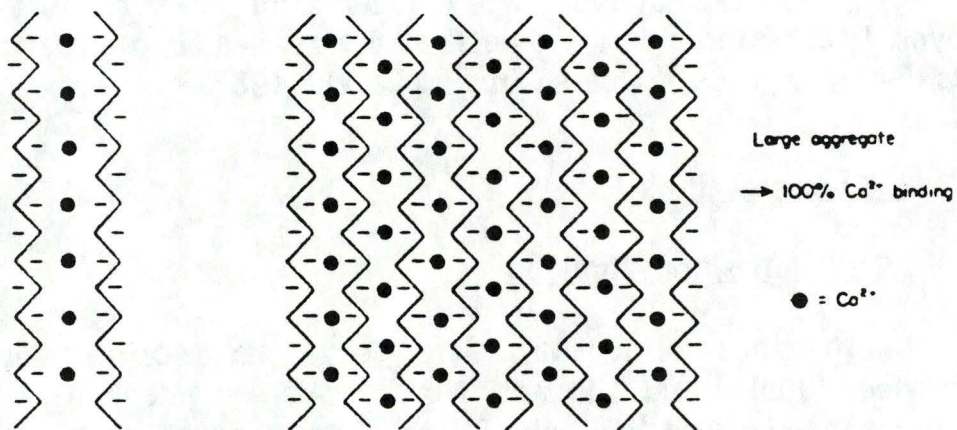


Fig 2.4 Dimère et multimère pectiques (Saulnier, 1987).

branchés sur les rhamnoses, des chaînes latérales neutres composées d'arabinoses et de galactoses en liaison 4 ou 6 (De Vries *et al* , 1983), ainsi que du D-xylose et du L-fucose. Ces chaînes latérales ne sont présentes que sur une partie du squelette d'acides galacturoniques, dite "hairy" ou hétéropolygalacturonique, où le degré d'estérification est de 100 % (Kohn and Luknar, 1977), par opposition aux chaînes "smooth", ou homopolygalacturoniques.

Les rhamnogalacturonanes de type II sont moins nombreux dans la paroi et sont caractérisés par une composition en sucres atypiques tels que 2-O-méthylfucose, 2-O-méthylxylose, apiose, 3-C-carboxy-5-déoxy-L-xylose, acide 3-C-déoxy-mano-octulosique (Mc Neil *et al* , 1984).

2.2.2 Les propriétés des pectines

Non seulement les pectines contribuent à la cohésion de la paroi, comme les autres éléments de la matrice polysaccharidique, mais en plus, elles jouent un rôle considérable dans la protection de l'organisme végétal (Mc Neil *et al* , 1984) ainsi que comme régulateur de la croissance en taille de la cellule végétale (Mc Neil *et al* , 1984 ; Carpita and Gibeaut, 1988).

Les pectines peuvent s'associer , en présence de cations calcium, par des jonctions intermoléculaires adoptant ainsi une configuration coopérative. L'association est coopérative car la liaison du premier cation entre une paire de chaînes provoque un alignement qui facilite la liaison des cations suivants.

Plus la pectine est hérissée de chaînes latérales ou est estérifiée, moins elle aura tendance à prendre cette configuration coopérative. Celles-ci auraient donc une action solubilisante. Le résidu rhamnose, quant à lui, limiterait les possibilités de précipitation en imposant des changements de direction à la chaîne d'acides uroniques (Jarvis , 1984).

2.2.3. Biosynthèse des polysaccharides pectiques

Les pectines suivent le même schéma de synthèse que les autres éléments polysaccharidiques de la paroi. La synthèse de ces

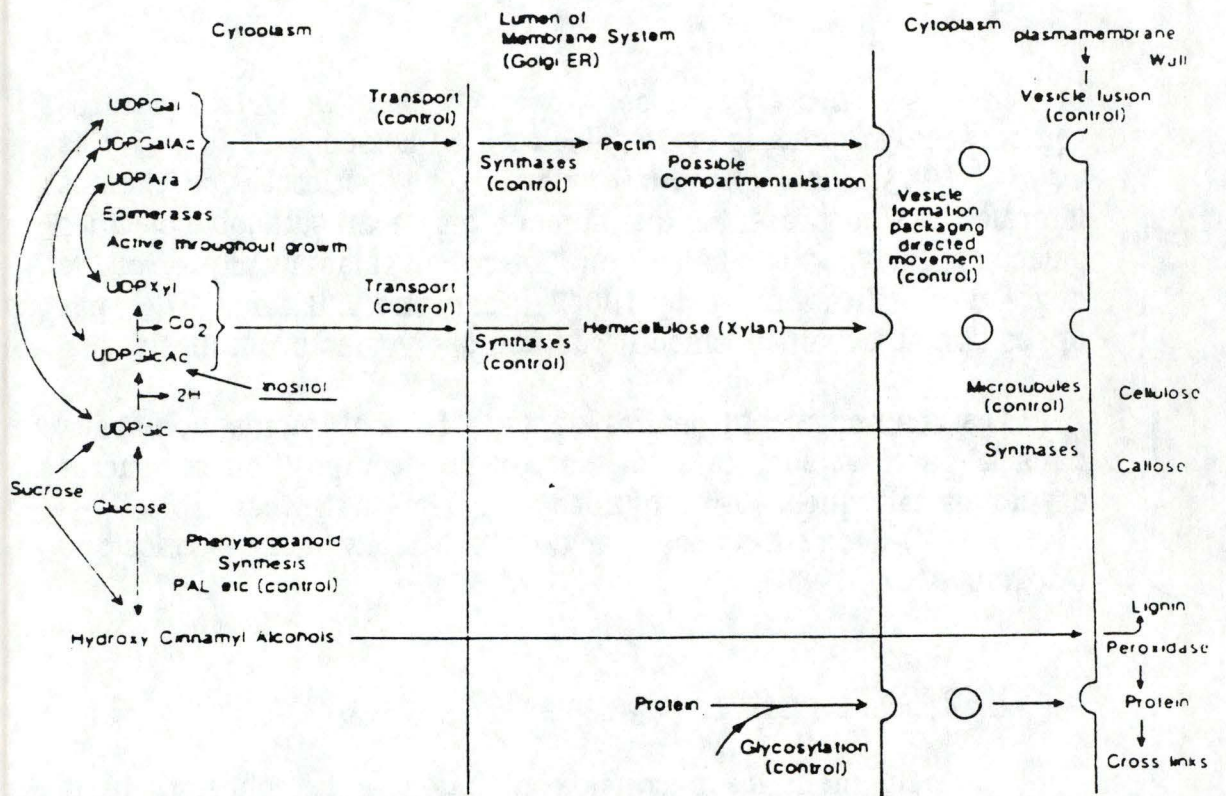


Fig 2.5 Schéma représentant les voies de synthèse principales des polysaccharides (Northcote, 1985).

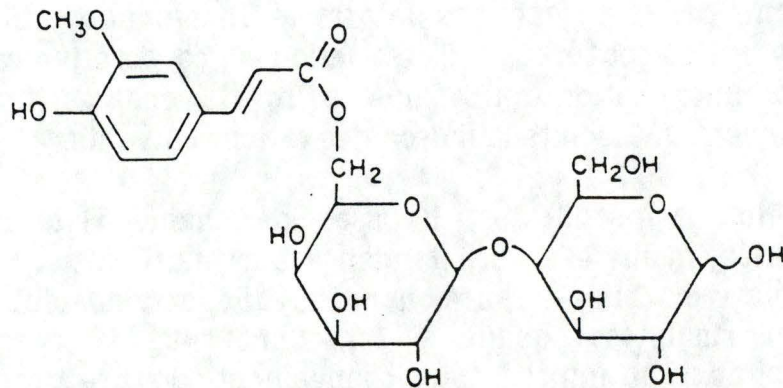


Fig 2.6 Exemple de substitution d'un disaccharide par un ester féruloyle (Fry, 1983).

éléments démarre par l'activation de monomères provenant des tissus photosynthétiques ou de stockage tels que glucoses, sucroses, fructoses. Dans le cas de culture en suspension, il peut s'agir du glucose et, dans une moindre mesure, du D-galactose, L-arabinose et D-xylose présents dans le milieu. Ces monomères sont activés en nucléosides diphospho-monosaccharides par des pyrophosphatases cytoplasmiques. On retrouve ainsi de l'UDP-glucose et de l'UDP-galactose. L'UDP-glucose est le substrat de formation des dérivés UDP-gal_p, UDP-glc_pUA, UDP-xyl_p, UDP-gal_pUA, UDP-L-ara_f, UDP-L-ara_p, UDP-L-rha_p.

Alors que la cellulose est synthétisée en surface de la cellule par transport du complexe enzymatique jusqu'au plasmalemme, les monomères des autres polysaccharides sont polymérisés dans l'appareil de Golgi. Les produits de synthèse sont ensuite transférés vers le plasmalemme par des vésicules. La nature des polysaccharides sera fonction du flux de monomères et d'un contrôle au niveau de la synthèse dans l'appareil de Golgi.

2.2.4. Les chaînes latérales

Les chaînes latérales peuvent être longues, jusqu'à 15 oses neutres branchés, reliées par un lien 0-4 au résidu L-rhamnose. Elles comportent principalement des unités arabinoses et de galactoses et presque tous les groupes féruloyls que l'on retrouve dans la paroi. Ces dérivés phénoliques se retrouveraient aux extrémités des chaînes latérales, liées aux résidus galactopyranoses ou arabinopyranoses, formant ainsi des (3)-0-(3-0-féruloyl α -L-arabinopyranosyl)-L-arabinoses ou des 4-0-(4-0-féruloyl- β -D-galactopyranosyl)-D-galactoses. Le taux d'estérification par ces groupements féruloyls est de 1/60 (Fry, 1983). Leur rôle serait d'ancrer par des liens covalents les polymères entre eux. Ils constitueraient aussi des précurseurs de la lignine (Bacic *et al*, 1988).

Suivant la composition et les liens entre les composants, on distingue deux types de chaînes latérales :

* Les arabinanes : On retrouve des chaînes en $\alpha(1\rightarrow5)$ arabinofuranosyl à branchements nombreux en C(O)-2, C(O)-3 ou les deux. Ce type de structure est retrouvé chez *Sinapsis alba*, ainsi que chez *Rosa glauca* (Bacic *et al*, 1988). Chez *Beta vulgaris* les branchements se font en (1 \rightarrow 3) et (1 \rightarrow 5) (Guillon and Thibault, 1989). Les polymères latéraux sont reliés au C(O)-2 du L-

Rhamnose et parfois au C(O)-4 comme c'est le cas chez *Brassica oleracea* (Bacic *et al.*, 1988).

* Les arabinogalactanes : On distingue les arabinogalactanes de type 1 et les arabinogalactanes de type 2. Le type 1 est formé de chaînes (1→4)-β-D-galactopyranoses à ramifications α-L-arabinofuranose. On en retrouve chez *Solanum tuberosum* (Bacic *et al.*, 1988) et *Beta vulgaris* (Guillon and Thibault, 1989). Le type 2 consiste en des chaînes (1→3)-β-D-galactopyranoses à branchements (1→3) et (1→6). On en retrouve également chez *Beta vulgaris* (Guillon and Thibault, 1989).

Chez *Daucus carotta*, qui nous fournit le surnageant de culture duquel nous allons extraire les chaînes latérales, on retrouve le même type de structure. En effet, Massiot et Thibault qui ont analysé les parties hérissées de la pectine de *Daucus carotta* par digestion enzymatique, ont montré la présence de (1→4) et de (1→3,4)-galactoses liés ou terminaux, de (1→5)-arabinoses et de (1→2,4)-rhamnoses, ainsi que de petites quantités de glucoses, de xyloses et des traces de fucoses et de mannoses formant des arabinogalactanes de type 1. Ils ont également identifié des arabinogalactanes de type 2 caractérisés par des (1→4), (1→3), (1→6) et (1→3,6)-galactoses, des (1→5) arabinoses, des (1→4), (1→3,4)-xyloses liés ou terminaux et enfin du (1→2,4)-rhamnose (Massiot and Thibault, 1989).

2.3 Isolement du matériel polysaccharidique à partir du surnageant de culture de cellules de *Daucus carotta*.

Différents éléments polysaccharidiques sont facilement isolables à partir de la paroi des cellules végétales. De nombreuses méthodes d'extractions des pectines sont décrites : chélatants (Fry, 1988), base diluée à 4°C (Massiot *et al.*, 1987)...

Un autre moyen d'obtenir des pectines est de partir du surnageant de cellules en suspension qui contient toutes les substances constitutives de la paroi primaire (Bacic *et al.*, 1988).

On procède habituellement par précipitation sélective et/ou techniques chromatographiques pour séparer des chaînes latérales de pectines. C'est contre ces chaînes latérales issues de

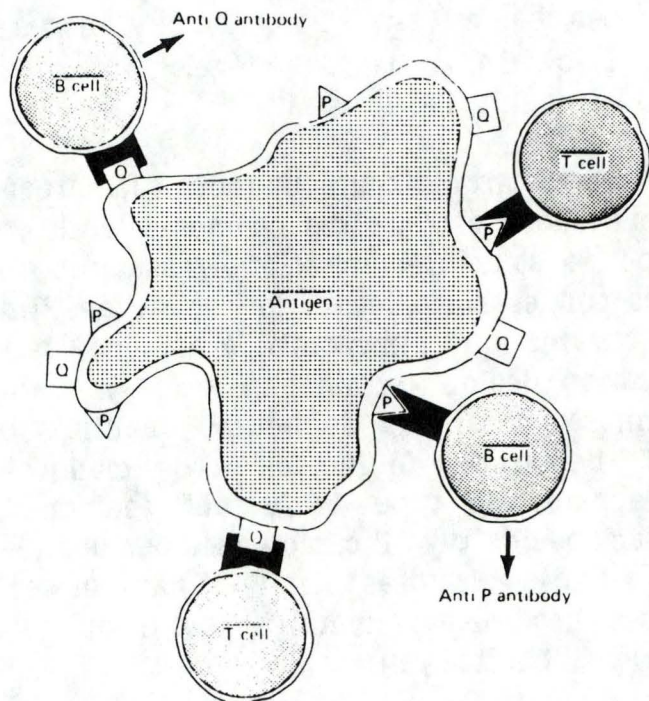


Fig 2.8 Epitopes B et T sur la même molécule d'antigène (Roitt et al ,1989).

polysaccharides excrétés par les cellules en suspension que nous envisageons de tester différentes techniques d'immunisation

2.4 Techniques de production d'un polyserum

2.4.1 L'haptène

Toute substance étrangère injectée dans un organisme est appelée antigène. Si cet antigène peut amener une réponse anticorps, on l'appelle immunogène. Un antigène qui, seul, ne provoque aucune réponse immunitaire mais qui, une fois couplé à une molécule (protéine...), peut alors mettre en branle la réaction anticorps est appelée haptène. La protéine sur laquelle est greffé cet haptène est appelée protéine-porteuse ou protéine-carrier.

2.4.2 L'effet Carrier

Pour obtenir une réponse anticorps, il faut que les cellules dérivées du thymus et les cellules dérivées de la moëlle osseuse réagissent avec les divers déterminants antigéniques sur la molécule d'antigène. Ces deux types cellulaires coopèrent et, in fine, deux signaux d'activations sont transmis aux cellules B, productrices d'anticorps. Un premier signal provient de l'interaction entre l'antigène et la cellule B. Un second signal provient des cellules T auxiliaires lorsqu'elles reconnaissent d'une deuxième portion du même antigène. Elles fournissent aux cellules B des facteurs de développement optimal. Les cellules T peuvent reconnaître les déterminants protéiques et peptidiques, mais, à part quelques exceptions, pas les hydrates de carbone (Berzofsky, 1988).

Il faut donc que l'antigène ait deux sites antigéniques : l'un pour les cellules T, l'autre pour les cellules B (Golub, 1976). La nécessité de deux sites de reconnaissance distincts explique l'impossibilité des réponses immunes contre des haptènes et montre aussi qu'il faut utiliser la même molécule-carrier durant toute l'opération d'immunisation.

2.4.3 Les antigènes T-indépendants

Les antigènes T-indépendants ont habituellement plusieurs copies du même déterminant antigénique et sont capables de se lier

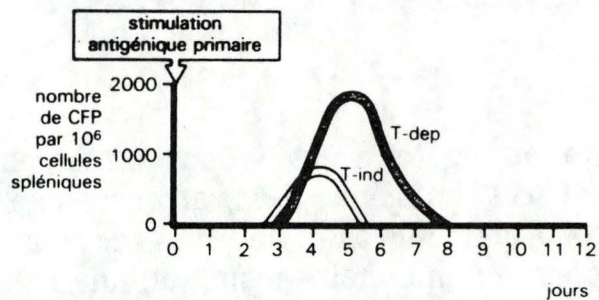


Fig 2.9 Cinétique de la réponse anticorps à la première exposition de l'antigène au sujet (Roitt et al, 1989).

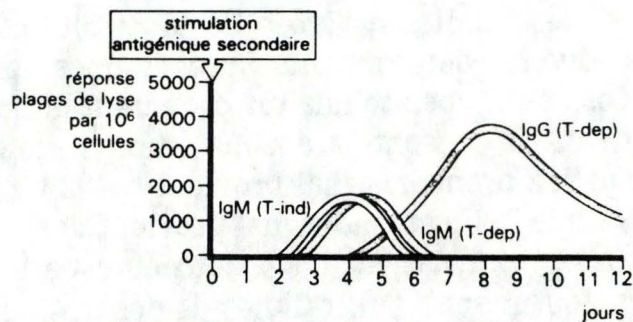


Fig 2.10 Cinétique de la réponse anticorps à la deuxième exposition de l'antigène au sujet (Roitt et al, 1989).

à plusieurs récepteurs de la même cellule B activant celle-ci sans que la cellule T auxiliaire ne soit nécessaire (De Franco, 1987).

2.4.4 Couplage des haptènes aux molécules porteuses

Le couplage des haptènes se fait par divers moyens chimiques suivant les groupements réactionnels disponibles aussi bien sur l'haptène lui-même que sur la molécule porteuse. La stabilité et la solubilité de l'antigène à coupler peuvent aussi influencer le rendement du couplage. Pour l'immunisation, il existe parfois un nombre optimal de groupements hapténiques par molécules-porteuses (Ashwell, 1978).

Il est évident que le polysérum obtenu contiendra aussi bien des anticorps contre l'haptène ou contre la molécule porteuse que contre la zone de couplage.

La réaction de couplage utilise, en général, le groupement le plus réactionnel de l'haptène. Le couplage utilisé pour les haptènes polysaccharidiques dérivés des pectines est le couplage à l'albumine sérique bovine méthylée, qui implique les fonctions carboxyliques des unités d'acides galacturoniques. (Liners *et al.*, 1990)

2.4.5 Cinétique de la réponse anticorps

La réponse humorale peut être divisée en réponse primaire et secondaire. La réponse primaire a lieu après la première exposition à l'immunogène et correspond à un pic d'immunoglobuline d'isotypie μ . Après un temps, une seconde exposition à l'immunogène amène la réponse secondaire, d'immunoglobuline d'isotypie γ , ainsi que d'autres isotypes minoritaires. Cette réponse apparaît avec un temps de latence moindre, et un titre d'anticorps plus élevé et des anticorps de plus forte affinité. On entrevoit donc l'avantage d'une telle réponse secondaire. Toutefois, certains antigènes et, apparemment, certaines techniques d'immunisation ne provoquent que des réponses d'immunoglobulines de type IgM. Ce serait le cas des antigènes T-indépendants (Roitt, 1989).

2.4.6 Techniques d'immunisation

Les méthodes de production d'anticorps sont encore largement empiriques et le résultat d'une immunisation dépend de nombreux facteurs. On peut classer ces facteurs en trois catégories :

- propre à l'antigène : nature, pureté, immunogénicité...
- intrinsèque à l'expérimentation : doses, adjuvants, voies d'inoculation, calendrier des rappels...
- dépendant du sujet immunisé : espèce, âge, état du système immunitaire

Les techniques les plus courantes sont les injections de mélanges d'antigènes et de potentiateurs du système immunitaire que sont les adjuvants. L'avantage général est de conserver l'antigène par la formation de dépôts et par une diminution de sa dégradation (Tijssen, 1985).

Quatre exemples d'adjuvants couramment utilisés sont repris ci-dessous :

* L'adjuvant de Freund (FA): Il s'agit d'une huile minérale formant une émulsion avec l'immunogène. La première injection se fait avec FA complet qui en plus du FA incomplet contient une dispersion de *Mycobacterium tuberculosis* tués à la chaleur. Les rappels s'effectuent avec le FA incomplet.

* Les sels d'aluminium : Leur avantage est de procurer une large surface d'adsorption pour les antigènes protéiques. Ils possèdent aussi un effet de mobilisation des cellules phagocytaires.

* L'Albumine sérique bovine méthylée : En plus de l'effet carrier que nous apporte cette molécule, la BSA méthylée fournit une adjuvantité grâce à sa capacité de s'associer par lien ionique à des complexes chargés négativement (protéines, polynucléotides...).

* Le δ -mercaptoguanosine : cette substance permettrait la production d'IgG contre des antigènes T-indépendant. Son mode d'action n'est pas encore connu, mais il activerait les

cellules B, les cellules T, les macrophages (Mond *et al*, 1989).

Une dernière technique, utilisée sans adjuvant, évitant ainsi les problèmes de toxicité liés à l'emploi de ces substances (Nilsson and Larsson, 1990), consiste à adsorber l'antigène sur un support tel que de la nitrocellulose ou à le coupler à des billes de sépharoses (Nilsson *et al*, 1987). Il s'agit ici d'un dépôt intrasplénique impliquant une anesthésie de la souris. L'avantage d'une telle technique serait de réduire considérablement la quantité d'antigène nécessaire (Nilsson and Larsson, 1990).

2.5 But du travail et stratégie de couplage

L'utilisation des anticorps comme marqueurs cytochimiques pour reconnaître des épitopes séquentiels ou conformationnels est devenue courante. Les techniques de séparations à partir de colonne d'immunoaffinité ne le sont pas moins. Mais toutes ces techniques sont basées sur la possibilité d'obtenir des anticorps contre des haptènes, parfois obtenus en de très faibles quantités.

C'est dans le but de mettre au point une technique simple de production d'anticorps à partir de faibles quantités de polysaccharidiques que ce travail a été entrepris.

Ainsi, au départ de chaînes latérales de pectines natives isolées du surnageant de cultures de cellules, plusieurs techniques d'immunisation ont été réalisées afin de déterminer le polysérum offrant le plus de possibilités quant à son contenu en anticorps.

COMPOSITION DES SELS DE MURASHIGE ET SKOOG

CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00 mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 mg/l
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/l
FeNaEDTA	36,70 mg/l
H ₃ B ₃ O ₃	6,20 mg/l
KH ₂ PO ₄	170,00 mg/l
KI	0,83 mg/l
KNO ₃	1900,00 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00 mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30 mg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/l
NH ₄ NO ₃	1650,00 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60 mg/l
Inositol	100,00 mg/l
Acide nicotinique	0,50 mg/l
Thiamine HCl	0,10 mg/l
Pyridoxine HCl	0,50 mg/l
Glycine	2,00 mg/l

Tableau 3.1 Ensemble des sels entrant dans la composition du milieu de culture.

MATERIELS ET METHODES

3.1 Culture en suspension de cellules de *Daucus carotta* (Zryd, 1988)

3.1.1 Mode de culture

La culture de cellules en suspension de *Daucus carotta* nécessite le passage en phase cal. La callogénèse est amorcée sur une boîte de Pétri stérile contenant un milieu autoclavé à 121 °C (1 bar) pendant 20 minutes. On dépose sur ce milieu solide des cubes de racine désinfectée comprenant une portion de cambium.

Désinfection de la racine :

- Tremper la racine, lavée et épluchée, pendant 10 secondes dans une solution d'éthanol à 70 % ;
- Laisser tremper la racine pendant 15 minutes dans une solution d'hypochlorite de sodium à 50 % et 0,2 % de Tween 80 (Fluka) en agitant de temps en temps.

Composition du milieu de callogenèse : (pour 1 litre de milieu)

- Milieu de Murashige and Skoog (Flow laboratories)	4,708 g
- Sucrose (Merck)	30,000 g
- 2,4-D (Sigma)	0,001 g
- kinétine (Fluka)	0,0002 g
- agar (Sigma)	8,000 g

Le pH de la solution finale est ajusté à 5,7.

Initiation des cultures en suspension :

Des cals âgés de 4 semaines sont hachés à l'aide de lames de scalpel stériles et déposés dans des erlenmeyers de 250 ml à col large contenant un milieu de culture liquide autoclavé à 121°C (1 bar) pendant 20 minutes. Le volume de culture est de 100 ml. L'oxygénation des cultures se fait sur un agitateur horizontal VSK 75 Edmund Bühler à 100 tours / minute en chambre de culture (luminosité 1000 lux et température constante de 25°C).

Composition du milieu de culture liquide : (pour 1 litre de milieu)

- Milieu de Murashige and Skoog (Flow)	4,708 g
- Sucrose (Merck)	30,000 g
- 2,4-D (Sigma)	0,001 g

La solution finale est ajustée à un pH de 5,7.

3.1.2 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 frais dans un rapport 1:10.

2. Repiquage "à la spatule" : les cellules sont récupérées 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.

3.2 Purification des polysaccharides pectiques

3.2.1 Purification du surnageant

- Prélever le surnageant des cultures en suspension de *Daucus carotta* après 15 jours ;
- centrifuger ;
- Filtrer sur verre fritté ;
- Filtrer sur Whatman GF/A ;
- Filtrer sur papier Whatman 42 ;
- Le surnageant est ensuite concentré et dialysé au moyen d'un concentrateur AMICON CH2/CH2A à fibres creuses.

Utilisation du concentrateur amicon :

- Rincer la cartouche au moyen d'eau déminéralisée (résistivité de l'eau : $1,5 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) durant 15 minutes ;
- Rincer la cartouche au moyen de NaOH 0,1 N durant 15 minutes ;
- Rincer la cartouche au moyen d'eau déminéralisée durant 15 minutes ;

- Concentrer la solution jusqu'à obtenir le volume désiré. Pour dialyser (diafiltrer), ajouter à la solution un volume de tampon et concentrer à nouveau.

3.2.2 Extraction des polysaccharides pectiques

Plusieurs types de méthodes sont couramment employés. Un premier se base sur la précipitation sélective par acétate de cuivre (Cartier, 1986) ou par éthanol (Mc Neil *et al*, 1984). On peut aussi utiliser une colonne échangeuse d'anions qui retiendra les pectines.

3.2.2.1 Précipitation à l'acétate de cuivre (Cartier, 1986)

- Ajouter au surnageant filtré et dialysé de l'acétate de cuivre 8% (UCB) dans un rapport volumique de 1:8. Placer la solution une nuit à 4° C;
- Centrifuger durant 5 minutes à 1600 g;
- Laver le précipité à l'éthanol 50% ;
- Décomplexer le cuivre dans une solution éthanol 80%, HCl 5% ;
- Dialyser contre de l'eau déminéralisée. On utilise un sac à dialyse en cellulose avec un cut-off de 10000 daltons (Medicell international Ltd., 3-20/32").

3.2.2.2 Précipitation à l'éthanol (Mc Neil *et al*, 1984)

- Ajouter au surnageant filtré et dialysé 2,33 volumes d'éthanol. Placer la solution une nuit à 4°C;
- Centrifuger durant 5 minutes à 1600 g;
- Récupérer le précipité dans un tampon KH_2PO_4 10 mM, pH7.0 ;
- Dialyser contre de l'eau déminéralisée.

3.2.2.3 Séparation par colonne échangeuse d'anions

Ce protocole nous a été communiqué par le Dr Thibault de l'Université de Nantes.

Le gel utilisé est un gel fortement basique : Sephadex QAE A25 (Pharmacia). La capacité totale du gel est de 3 meq/g et la capacité accessible est de 5 g/100 ml. Le gel est utilisé dans de l'eau désionisée. On utilise une colonne de 20 x 0,75 cm (18 cm de gel, soit un volume de 31 ml et une capacité d'échange totale de 4,65 meq.). Un débit de 25 ml. h⁻¹ est assuré par une pompe péristaltique LKB

2132 (débit naturel de la colonne 40 ml. h⁻¹). L'élution n'a lieu que lorsque tous les polysaccharides non fixés ont été lavés du gel. On réalise la lecture à 273 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 µl. L'élution se réalise au moyen d'un gradient GRADIENT MIXER GM-1 en tampon CH₃COONa allant d'une concentration nulle à celle de 0,8 M en récoltant des fractions de 3 ml.

Après dosage des sucres totaux et des acides uroniques, on récolte les fractions révélant une grande proportion d'acides uroniques. On concentre alors les fractions rassemblées au moyen d'un ROTAVAPOR Büchi RE111 à 40°C jusqu'à obtenir un volume d'environ 20 ml.

3.2.3 Isolement des chaînes latérales

Diverses techniques sont utilisables. On peut faire une digestion enzymatique du squelette d'acides uroniques grâce à une endopolygalacturonase (Mc Neil *et al.*, 1984). On peut aussi β-éliminer à partir des acides uroniques terminaux ou estérifiés (Thibault, 1983). Cette méthode détachera les unités d'acides uroniques, ne laissant que les chaînes latérales puisque tous les acides uroniques des pectines hérissées sont estérifiés (Kohn and Luknar, 1977).

3.2.3.1 Par digestion enzymatique (Mc Neil *et al.*, 1984)

Pour digérer le squelette d'acides uroniques, nous avons utilisé une endopolygalacturonase (Sigma). Une unité d'enzyme libère 1 micromôle d'acide galacturonique à partir d'acide polygalacturonique en 1 minute, à pH 4,0 et à 25°C. Cependant, l'enzyme ne peut digérer la pectine estérifiée (Thibault, 1983). L'échantillon a donc été préalablement déestérifié.

Déestérification

- Amener le pH de la solution à déestérifier à 12,0 par ajout de NaOH et laisser 2 heures dans de la glace salée ;
- Neutraliser par de l'acide acétique ;
- Dialyser contre CH₃COONa 50 mM, pH5,2.

Digestion enzymatique

- Pour un volume de 50 ml de tampon CH₃COONa 50 mM, pH 5,2, ajouter 0,11 unité d'endopolygalacturonase (Sigma). Incuber 3 heures à 30 °C ;
- Centrifuger à 10000 g pendant 15 minutes ;

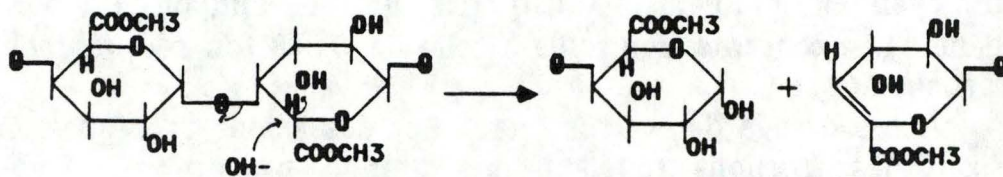


Fig 3.1 Réaction de β -élimination (Saulnier, 1987).

Gamme étalon pour le dosage des sucres neutres

$$y = -0,0172 + 0,0201x \quad R = 1,00$$

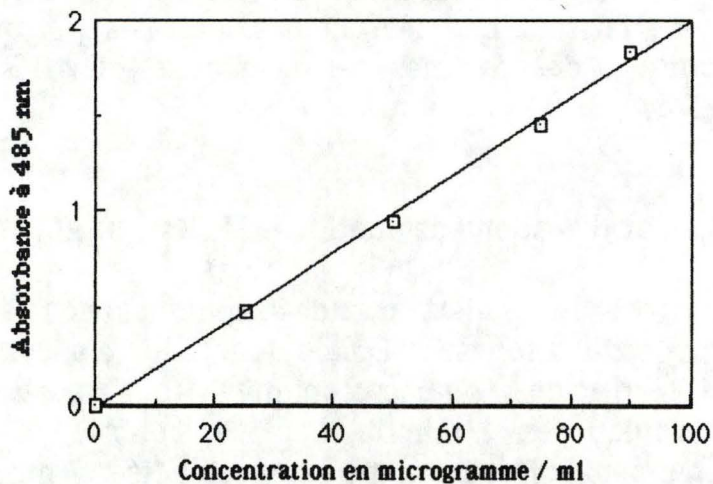


Fig 3.2 Gamme étalon pour le dosage des sucres neutres par la méthode de Dubois. La droite d'étalonnage a été construite par mélange des différents sucres susceptibles de se retrouver dans le polysaccharide.

- Collecter le surnageant et digérer une nouvelle fois le culot de la même manière que précédemment ;
- Filtrer les surnageants réunis sur filtre Whatman GF/A ;
- Dialyser les filtrats contre de l'eau déminéralisée.

3.2.3.2 Par β -élimination (Thibault, 1983)

Il s'agit ici d'une dégradation chimique du squelette d'acides uroniques. Pour pouvoir être β -éliminés, les unités d'acides uroniques doivent être terminales ou estérifiées :

- Amener l'échantillon à un volume de 50 ml dans un tampon Na_2HPO_4 100 mM, pH 5,6 ;
- β -éliminer 2 heures à 85 °C ;
- Dialyser contre de l'eau déminéralisée.

3.3 Analyse chimique

3.3.1 Dosages colorimétriques

2.3.1.1 Dosage des oses neutres par la méthode de Dubois (Dubois *et al* , 1956)

Réactifs

Acide sulfurique P.A. 97-98%(Merck)
Phénol (Merck)

Mode opératoire

On prépare une solution de phénol à 80%. Dans un volume de 400 μl de solution de sucre, on ajoute 10 μl de phénol à 80 % et 1 ml d'acide sulfurique à 98%. 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 485 nm.

La gamme étalon utilisée est une solution à 1 mg/ml de chacun des sucres susceptibles de se retrouver dans le polysaccharide étudié, c'est à dire : glucose, galactose, arabinose, fucose, xylose, mannose, rhamnose.

3.3.1.2 Dosage des acides uroniques au méthahydroxybiphényle (Mc Neil *et al* , 1984)

Réactifs

Solution de méthahydroxybiphényle (3-phényl phénol 90% (Aldrich) à 0,15% dans du NaOH 0,05%)
Acide sulfurique P.A. 97-98% (Merck)

Gamme Etalon pour dosage au MHBP

$$y = -0,0128 + 0,0173x \quad R = 1,00$$

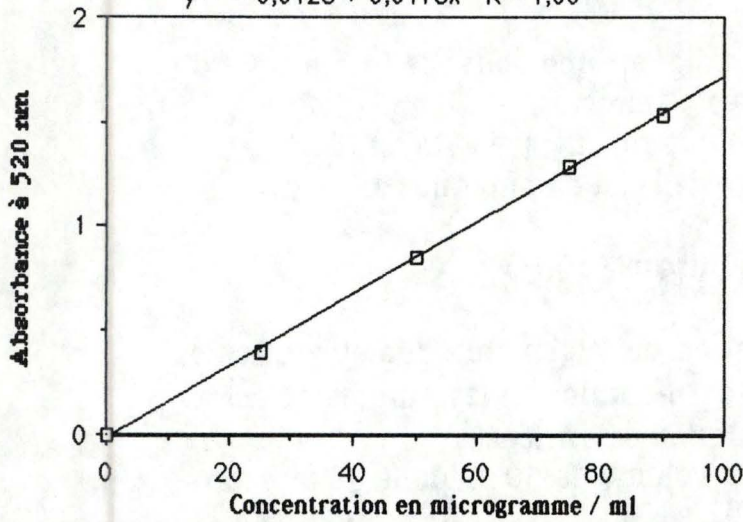


Fig 3.3 Gamme étalon d'acide homopolylacturonique (sigma) pour le dosage des acides uroniques par la méthode au méthahydroxybiphényle.

Gamme étalon pour le dosage au DNSA

$$y = -0,0463 + 0,0014x \quad R = 1,00$$

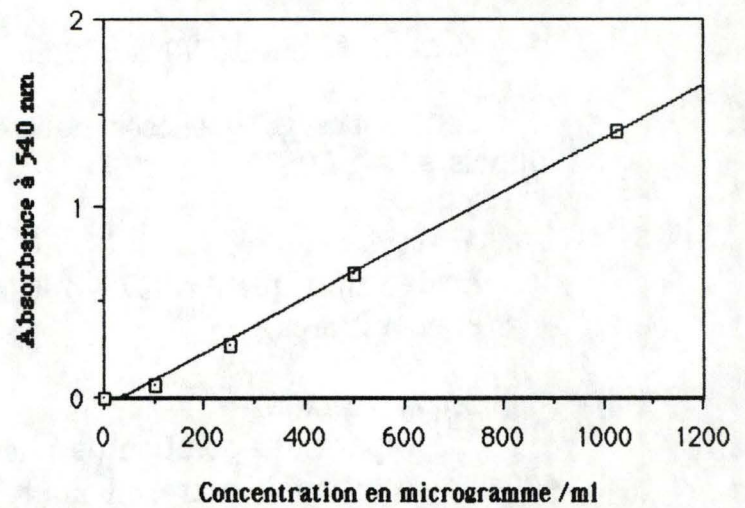


Fig 3.4 Gamme étalon d'acide galacturonique (sigma) pour le dosage des sucres réducteurs.

Gamme étalon pour le dosage des protéines

$$y = 0,0139 + 0,0018x \quad R = 1,00$$

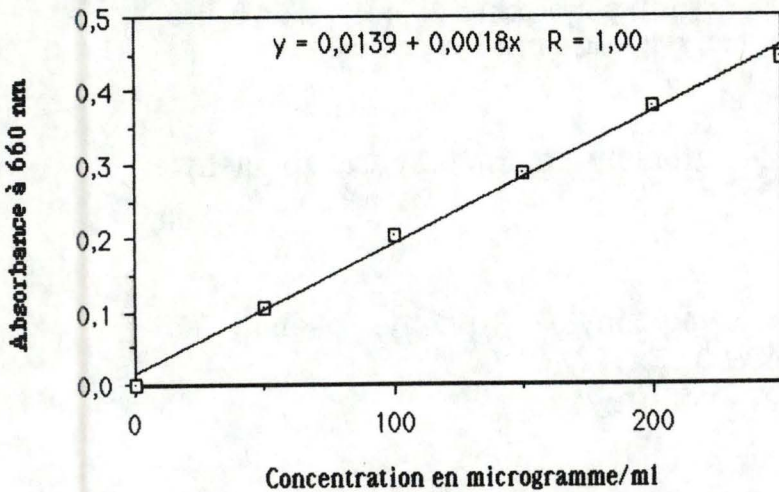


Fig 3.5 Gamme étalon de BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Folin.

Mode opératoire

On ajoute à 200 µl de solution, dans un bain de glace, 1 ml d'acide sulfurique concentré à 98%. Les tubes sont agités puis placés durant 5 minutes dans un bain chauffant à 100°C. Après refroidissement dans de la glace, on ajoute 20 µl de solution de méthahydroxybiphénile. On place ensuite les tubes durant 15 minutes à l'obscurité. On lit l'absorbance, après homogénéisation, à 520 nm.

Pour le dosage des acides uroniques, nous avons utilisé une gamme étalon d'acides pectiques (Sigma). Il existe cependant une très légère interférence due aux oses neutres.

3.3.1.3 Dosage des sucres réducteurs par la méthode à l'acide dinitrosalicylique (DNSA) (Fry, 1988)

Réactifs

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

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 5ml d'eau déminéralisée et on lit l'absorbance à 540 nm.

Nous avons utilisé une gamme étalon sur acide galacturonique.

3.3.1.4 Dosage des protéines par la méthode de Folin (Lowry *et al*, 1951)

Le dosage des protéines a été réalisé suivant la méthode de Lowry.

Nous avons utilisé une gamme étalon sur BSA (Sigma).

3.3.2 Dosage qualitatif sur couche mince : révélation à l'orcinoï sulfureux

Réactifs

Solution d'orcinoï (UCB) à 0,1% dans de l'acide sulfurique à 70%

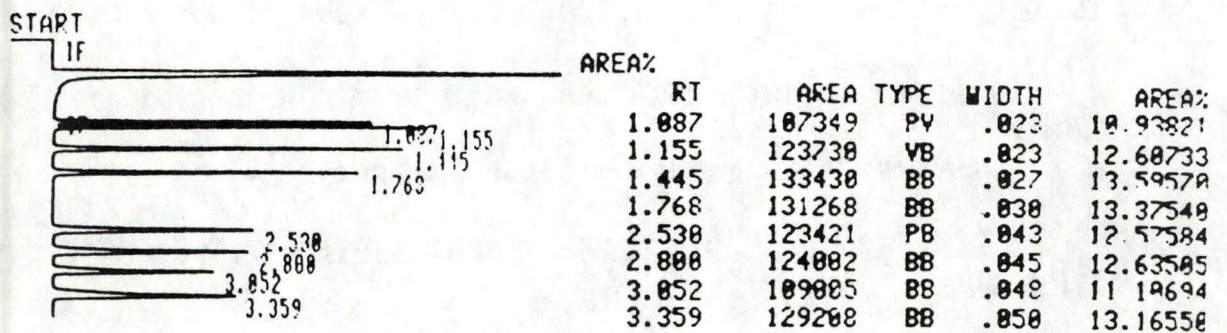


Fig 3.6 Chromatogramme des acétates d'alditols d'un mélange de quantités équivalentes d'oses neutres. L'ordre de sortie des oses neutres est le suivant : rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose et inositol.

Mode opératoire

On dépose 3 µl de chaque fraction sur une plaque de silice en couche mince (TLC aluminium sheets silica gel 60 20x20 - 0,2 mm silice Merck). La solution d'orcinol sulfurique est vaporisée et la plaque est ensuite incubée à 100°C pendant 15 minutes. Les fractions positives sont rapidement repérées par un changement de coloration de la solution d'orcinol.

3.3.3 Analyse 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, deux méthodes seront utilisées. La première, par transformation en acétates d'alditols, nous donne un chromatographe facilement interprétable, mais ne permet pas de détecter la présence d'acides uroniques. La seconde, par dérivation en Trimethylsilyl, permet de détecter de tels sucres. Toutefois, le chromatographe est complexe car plusieurs dérivés peuvent se former à partir d'un même résidu (Mc Neil *et al* , 1984 ; Sweeley *et al* , 1963).

Principe

Les échantillons volatils sont injectés dans le chromatographe, vaporisés au niveau de la chambre d'injection et entraînés par un gaz porteur (Hélium) constituant la phase mobile. L'échantillon passe alors dans une colonne contenant la phase stationnaire. Les différentes molécules contenues dans l'échantillon interagissent avec cette phase stationnaire, ce qui se donne par un temps de rétention plus ou moins long. 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.

3.3.3.1 Méthode des acétates d'alditols

Dans cette méthode, les monomères sont d'abord réduits puis acétylés afin de les rendre volatils.

Protocole expérimental :

- Hydrolyse du polysaccharide avec du TFA (Aldrich) 2N pendant 2 heures à 120°C dans un tube 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 (Janssen) à 10 mg/ml dans du NH_4OH (Merck) 1 M. Au résidu sec, on ajoute 250 μl de la solution réductrice. Les tubes sont alors placés, ouverts, dans un bain thermostaté à 60°C pendant 1 heure;
- Arrêt de la réduction par 3 ou 4 gouttes d'acide acétique glacial (UCB) ;
- Première évaporation jusqu'à obtention d'une pâte ;
- Resuspension de cette pâte dans 250 μl d'un mélange méthanol (Merck)/acide acétique (Merck) dans un rapport 9:1 et évaporation sous flux d'azote. On recommence cette opération deux fois en veillant à ce que le résidu soit sec entre les 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 (Merck) et de 100 μl de pyridine (Merck) comme catalyseur. Après 20 minutes à 120 °C, les tubes sont refroidis sous eau courante ;
- Ajout de deux fois 400 μl de toluène (Merck), avec évaporation à sec ;
- On ajoute ensuite au résidu sec 0,5 ml de dichlorométhane (Rathburn) et 0,5 ml d'eau déminéralisée. Il se forme alors deux phases (il est parfois nécessaire de centrifuger pour bien séparer les deux phases).
- On récupère la phase organique inférieure à l'aide d'une pipette Pasteur et on évapore le dichlorométhane sous flux d'azote. On réalise encore deux ajouts et deux évaporations 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 Hewlett 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, très polaire, est constituée de bicyanopropylphényl polysilosane sous la forme d'un film de 0,20 μm d'épaisseur.

Les paramètres d'analyse sont :

- split : 12:1
- colonne : type SP2330 (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 µl

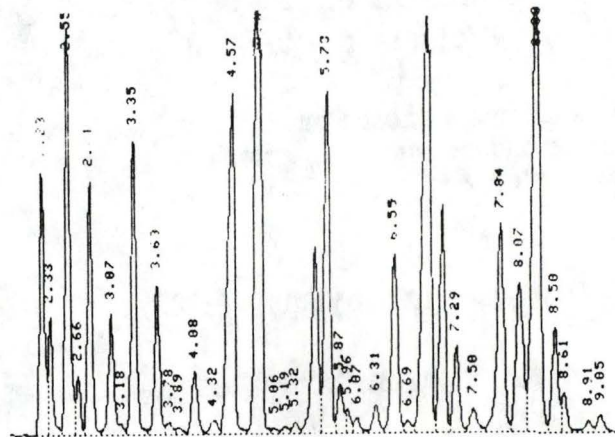
On utilise comme standard, un mélange des oses neutres : rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose et inositol, ce dernier comme standard interne.

3.3.3.2 Dérivés Triméthylsilyls (TMS)

Cette dérivation transforme les monomères en éthers de méthyls glycosides.

Protocole expérimental :

- Hydrolyser le polysaccharide avec du TFA 2N pendant 2 heures à 120°C dans un tube pyrex hermétiquement fermé ;
- Evaporer le TFA sous vide à 40°C, au moyen d'un rotavapor, évaporer trois fois à l'éthanol (jusqu'à dessiccation complète du résidu final) ;
- Estérification : ajouter 500 µl de méthanol-HCl (Fluka) et placer dans une étuve à 80°C pendant 15 heures. On stoppe la réaction en ajoutant 200 µl de ter-butyl alcool (Janssen) . On évapore ensuite sous flux d'azote, à température ambiante
- Silylation : on ajoute ensuite 500 µl de mélange TMS (0,5 ml de pyridine, 0,05 ml de triméthylchlorosilane (Aldrich), 0,01 ml d'hexaméthylidisilazane (Aldrich)) et on incube 20 minutes à 80°C ;
- On évapore sous flux d'azote et on ajoute 1 ml d'hexane (Aldrich). On centrifuge et on récupère 500 µl de surnageant que l'on évapore à nouveau ;
- on récupère le résidu sec dans 100µl d'hexane.



Time	Area	Height	Conc.	Name
2.23	30250	7848	2.2555	Ara
2.33	12995	3519	0.9689	Ara
2.55	48528	12086	3.6183	Rha
2.66	6474	1787	0.4827	Rha
2.81	29025	7520	2.1641	Fuc
3.07	17765	3582	1.3246	Fuc
3.35	36913	8754	2.7523	Xyl
3.63	19193	4476	1.4311	Xyl
4.08	9780	1856	0.7292	GlcUA
4.57	59630	10247	4.4460	GlcUA
4.90	92009	19166	6.8602	GalUA
5.57	30639	5530	2.2845	GalUA
5.73	48749	10193	3.6347	Man
5.87	7291	1449	0.5436	Gal
6.13	4367	826	0.3457	Man
6.55	29426	5305	2.1940	Gal
6.97	92281	14443	6.8805	GalUA
7.14	31599	6684	2.3560	GalUA
7.29	12924	2574	0.9636	Gal
7.84	38218	6178	2.8495	Glc
8.07	29570	4427	2.047	GlcUA
8.30	87593	13517	6.5309	GlcUA
8.50	15867	3065	1.1831	Glc
9.05	2961	498	0.2208	Gal
15.02	517330	38149	38.5723	Inositol

Fig 3.7 Chromatogramme des dérivés TMS d'un mélange de quantités équivalentes d'oses neutres et d'acides uroniques. L'ordre de sortie est donné par le rapport analytique. Le pic d'inositol n'est pas montré sur la figure.

On injecte dans le chromatographe en phase gazeuse. Les dérivés TMS sont séparés sur une colonne capillaire de 12 m de long sur 0,2 mm de diamètre intérieur. La phase stationnaire est constituée de méthylsilicone apolaire sous la forme d'un film de 0,33 μm d'épaisseur. La colonne nous a été aimablement prêtée par le laboratoire de biochimie cellulaire (Prof. J. Remacle).

Les paramètres d'analyse sont :

- split : 12:1
- colonne : type HP-1 (Hewlett Packard)
- température du four : on démarre à une température initiale de 150°C, la température grimpe ensuite à un taux de 2 °C/minute jusqu'à 180°C, puis à un taux de 30°C/minute jusqu'à 275°C. La température décroît alors à un taux de 30°C/minute jusqu'à revenir à la température initiale.
- température du détecteur : 300°C
- température de l'injecteur : 300°C
- Pression en tête de colonne : 170 kPa
- Volume injecté : 1 μl

On utilise la même gamme de standard que pour les acétates d'alditols, en y ajoutant de l'acide galacturonique.

3.4 Techniques d'immunisation

3.4.1 Immunisation par voie intrapéritonéale

3.4.1.1 Couplage du polysaccharide

Le polysaccharide isolé a été couplé à l'albumine sérique bovine méthylée, qui réagit avec les groupements carboxyliques des derniers acides uroniques de la chaîne latérale de pectine, formant ainsi une liaison (Liners *et al* , 1989)

Matériel

Albumine bovine méthylée (Sigma)

Solution de chaînes latérales à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Protocole (Liners *et al* , 1989)

Ajouter 0,2 mg de BSA méthylée par ml de solution de chaînes latérales à 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sous agitation.

3.4.1.2 Formation du mélange d'immunisation intrapéritonéale

Matériel

Adjuvant de Freund complet (FAC) (Gibco)

Adjuvant de Freund incomplet (FA) (Gibco)

Protocole

L'immunisation primaire se fait avec l'émulsion que forme le mélange de l'antigène et du FAC (rapport des volumes : 1:1). Un lot de 4 souris syngéniques BALB/c a été immunisé par une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de ce mélange.

Les rappels se font selon le protocole de Moore *et al* (1986), c'est à dire 1, 2 puis 9 semaines après l'immunisation primaire en remplaçant l'adjuvant complet par de l'incomplet.

3.4.2 Immunisation par voie intrasplénique (Nilsson *et al* , 1987)

3.4.2.1 Adsorption de l'antigène sur la nitrocellulose

Adsorption de chaînes latérales seules :

Des morceaux de nitrocellulose (Millipore) de 1 cm² sont saturés une nuit dans une solution de chaînes latérales à 200 µg /ml. On dépose ensuite, par voie intrasplénique, des morceaux de 1 mm² chez 2 souris syngéniques BALB/c.

Adsorption de chaînes latérales couplées à la BSA méthylée :

Même protocole en remplaçant les chaînes latérales par une solution de chaînes couplées à la BSA méthylée. On immunise ainsi 2 souris syngéniques BALB/c par dépôt intrasplénique.

3.4.2.2 Couplage de l'antigène au Sépharose 4B

Pour réaliser ce couplage, les chaînes latérales doivent obligatoirement être déjà couplées à la BSA méthylée. En effet, puisqu'il s'agit d'un couplage au bromure de cyanogène, il faut intervenir les groupements -OH du Sépharose et les extrémités -NH₂ d'une protéine.

Matériel

Sépharose 4B (Pharmacia)

Solution de chaînes latérales-BSA méthylée

Solution de BrCN 1M (Fluka)

Acétone (Vel)

Triéthylamine (Resco-Trade)

Tampon CBS (carbonate buffer saline) : NaCl 0,2M
 NaHCO₃ 0,1M
 pH 9,0

Ethanolamine (Resco-Trade)

Tampon PBS (phosphate buffer saline) : NaH₂PO₄ 1,44g/l
 KH₂PO₄ 0,2 g/l
 KCl 0,2 g/l
 NaCl 0,2 g/l
 pH 7,5

Protocole

- Laver 6 fois le sépharose 4B dans de l'acétone 60% ;
- Ajouter au goutte à goutte, 100 µl de bromure de cyanogène 1 M à 403 µl de sépharose 4B dans un milieu à - 17°C (alcool préalablement placé à - 17°C) ;
- Laisser 2 minutes à - 17°C ;
- Ajouter 100 µl de triéthylamine 1,5 M ;
- Laisser 5 minutes à température ambiante ;
- Laver successivement 3 fois à l'acétone 60%, 3 fois à l'acétone 30%, 3 fois dans de l'eau déminéralisée, 3 fois dans du tampon CBS ;
- Ajouter 1 ml de solution de chaînes latérales-BSA méthylée ;
- Laisser 1 nuit à 4°C ;
- Laver 6 fois dans du tampon CBS ;
- Laver 6 fois dans du tampon PBS.

On injecte ensuite 10 µl d'antigènes couplés au sépharose par voie intrasplénique, chez 4 souris syngéniques BALB/c.

3.4.2.3 Immunisation intrasplénique

L'immunisation intrasplénique est une opération qui nécessite l'anesthésie de la souris. Les conditions de stérilité doivent également être remplies puisqu'il faut inciser la cavité abdominale. A cet effet, les instruments sont préalablement stérilisés dans un four à chaleur sèche (50 minutes à 120°C).

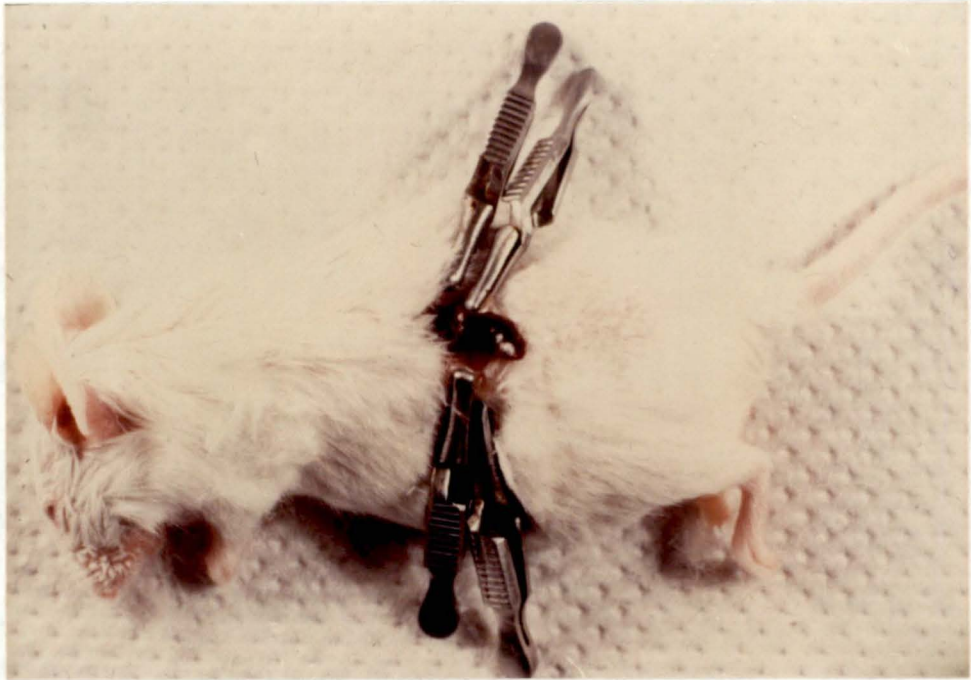


Photo 3.1 : Cliché d'une souris BALB/c anesthésiée. La rate a été exposée en vue de l'immunisation intrasplénique.

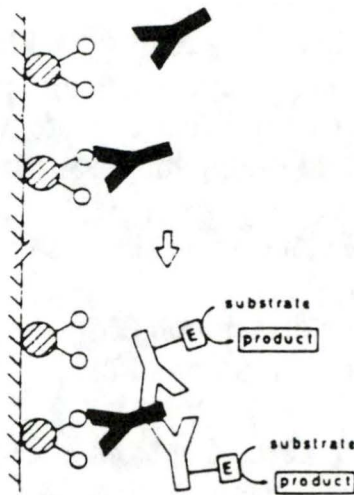


Fig 3.8 Test en dot blot : L'antigène est immobilisé sur de la nitrocellulose et sera reconnu par un anticorps spécifique. Cet anticorps est ensuite lui-même reconnu par un anti-anticorps couplé à une enzyme.

Matériel

Atropine sulfate (Sterop)
 Nembutal® (Pentobarbital sodique, CEVA)
 Isobétadine (Polyvidone-iode 10%, Belgana)
 Trousse de dissection stérile
 Spitalen (Smith-Kline-RIT)
 Fil à suturer résorbable (5,0 Vicryl, Ethicon)
 Fil à suturer non résorbable (6,6 Polyamide, Ethicon)
 Solution spray d'aluminium (Vétoquinol, Psyphac)

Protocole

- Peser la souris ;
- Prémédication : injecter par voie intrapéritonéale 1 mg/kg de sulfate d'atropine concentré à 0,5 mg/ml ; Laisser agir pendant 8 minutes ;
- Anesthésie : injecter par voie intrapéritonéale 0,05 mg/g de Nembutal concentré à 60 mg/ml ; Laisser agir pendant 10 minutes ;
- Opération : Raser l'animal sur le flanc gauche, de la ceinture scapulaire jusqu'au niveau du diaphragme ; Appliquer de l'Isobétadine sur la peau ;
- Inciser la peau à gauche de la ligne mi-scapulaire sur environ 10 mm. Inciser les muscles abdominaux de la même manière ;
- Repérer puis isoler la rate ;
- Immunisation : Enfouir les morceaux de nitrocellulose dans les tissus internes de la rate. S'il s'agit du dépôt des billes de Sépharose, injecter 10 µl par une aiguille large ;
- Suturer les plans musculaires au moyen de fil résorbable ;
- Saupoudrer le plan musculaire de Spitalen ;
- Suturer l'incision cutanée au moyen de fil non résorbable ;
- Appliquer la solution d'aluminium.

3.5 Analyse des polysérums et tests ayant recours aux anticorps (Clark *et al* , 1986)

3.5.1 Test en dot blot sur nitrocellulose

Ce test consiste à faire adsorber l'antigène sur une membrane de nitrocellulose. On incube ensuite la membrane dans les antiséras, l'excès d'anticorps non fixé est éliminé. La présence d'anticorps fixés est révélée par la liaison d'un deuxième anticorps couplé à une enzyme et reconnaissant le premier : l'activité de l'enzyme indique s'il y a eu reconnaissance de l'antisérum (résultat qualitatif).

Matériel

- nitrocellulose (Millipore)
- sérum de cheval (Gibco)
- Ig de cheval anti-souris couplée à la peroxydase (Amersham)
- diaminobenzidine (Sigma)
- eau oxygénée (UCB)
- tampon TBS
 TRIS (Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane) (Fluka) 20 mM
 NaCl (Merck) 500 mM
 ajusté à pH 7,5
- Tween 20 (Merck)

Protocole

- Déposer 4 µl de chaque solution sur la membrane de nitrocellulose et laisser pénétrer l'échantillon jusqu'à disparition du dépôt ;
- Incuber une nuit à 4°C dans une solution de saturation : 10% sérum de cheval en TBS ;
- Incuber les membranes 1 heure à température ambiante dans les polyséras dilués 20 fois dans 1% de sérum de cheval en TBS ;
- Effectuer trois lavages de 10 minutes dans 0,1% de Tween en TBS sous agitation ;
- Incuber ensuite les membranes dans le deuxième anticorps couplé à la peroxydase dilué 500 fois dans du sérum de cheval à 1 % en TBS ;
- Effectuer trois lavages de 10 minutes dans 0,1% de Tween en TBS sous agitation ;
- Révéler par : Tampon Tris -HCl 50 mM, pH 7,5
 DAB 0,05%
 H₂O₂ 0,03%
- Stopper la réaction enzymatique en trempant les membranes de nitrocellulose dans HCl 0,1 N.

3.5.2 Test ELISA

Ce test a été réalisé au moyen d'un anticorps dirigé contre la pectine acide : le 2F4 (Liners *et al.*, 1989). Le principe est identique à celui du dot blot, mais le test se fait dans des puits (plaque de microtitration PVC, Flow).

Matériel

- Poly-L-lysine (Sigma)
- Solution de pectine à 200 µg/ml
- Tampon NaCa NaCl (Merck) 150 mM
 CaCl₂ (Merck) 1 mM
- Gélatine (Sigma)
- Ig de cheval anti-souris couplé à la peroxydase (Amersham)
- 2,2-Azino-di-(3-éthyl-benzothiazolinsulfonate)(ABTS)
(Boehringer)
- H₂O₂ (UCB)
- Tampon citrate Na₂HPO₄ (Merck) 20,5 g/l
 Acide citrique (UCB) 8,9 g/l
 ajusté à pH 5,6

Protocole

Par puits

- Déposer 50 µl de poly-L-lysine 0,05 mg/ml, laisser une heure à température ambiante ;
- Eliminer la poly-L-lysine et déposer 50 µl d'échantillon en tampon NaCa, laisser une nuit à 4°C ;
- Eliminer les échantillon ; saturer par 200 µl de gélatine à 200 µg/ml, laisser 2 heures à 37°C ;
- Eliminer la gélatine ; déposer 50 µl d'anticorps primaire dilué 80 fois dans du NaCa, laisser 1 heure à 37°C ;
- Laver 6 fois dans du tampon NaCa ;
- Déposer 50 µl d'anticorps secondaire, laisser 1 heure à 37°C ;
- Laver 6 fois dans du tampon NaCa ;
- Déposer 100 µl de solution de révélation :

ABTS	8 mg
H ₂ O ₂	50 µl
Tp citrate	12 ml
- Laisser 15 minutes à 37°C ;
- Lire l'absorbance à 405 nm sur un lecteur ELISA Titertek

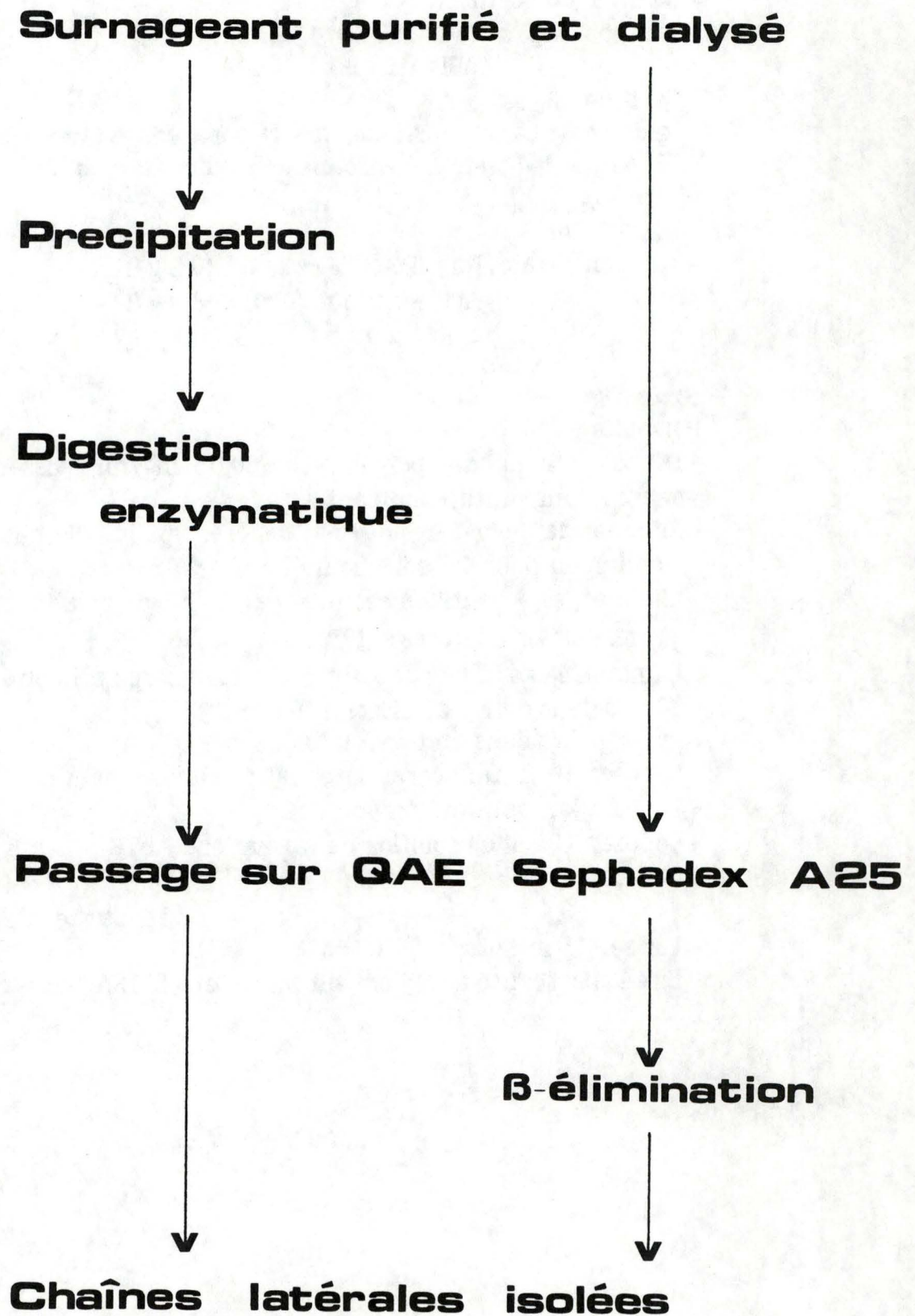


Fig 4.1 Schéma général des étapes d'isolement du polysaccharide.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre comprend deux parties principales : la première s'intéressera à l'isolement des chaînes latérales et à l'analyse du matériau d'immunisation. La seconde partie sera consacrée aux analyses des polyséras obtenus.

4.1 Isolement des chaînes latérales

Dans le but d'obtenir une méthode d'isolement valable et d'un rendement suffisant, nous avons testé différents protocoles. Au départ de 50 ml de surnageant de cellules en suspension, nous avons effectué l'isolement et transformé les échantillons en acétates d'alditols pour connaître leur composition en sucres.

Dans chacun des isollements, nous avons tenté de prélever les fractions susceptibles de contenir des chaînes latérales. Pour cela, nous avons dû séparer les parties hérissées, à chaînes latérales nombreuses, des parties lisses, sans chaînes latérales. Nous avons ensuite réduit au maximum la quantité d'acides uroniques (par digestion enzymatique ou β -élimination).

Malgré des méthodes de cultures identiques, la composition en polysaccharides des surnageants varie. Ces variations pourraient avoir une influence sur le résultat des séparations. De plus, les techniques utilisées ne se basent pas sur une seule propriété physico-chimique précise, mais elles permettent des séparations qualitatives difficilement réalisables par d'autres moyens (Fry, 1988).

Nous avons utilisé la méthode au métahydroxybiphényle pour la détection des acides uroniques. Ceux-ci peuvent se retrouver sous forme estérifiée (dans les parties hérissées des pectines) ou non (dans les parties lisses des pectines). Le degré d'estérification influencerait la précision du dosage des acides uroniques dans le sens d'une sous-estimation (Thibault, 1983). Les résultats de ces dosages doivent donc être pris avec une certaine prudence.

REMARQUE : La charge en protéines du surnageant a été dosée et s'est avérée trop faible pour interférer avec le dosage des polysaccharides.

4.1.1 Isolement par précipitation et digestion enzymatique

4.1.1.1 Précipitation par acétate de cuivre

Les étapes de séparation suivies étaient :

- 1/ Précipitation par acétate de cuivre;
- 2/ Désestérification

- 3/ Digestion enzymatique à l'endopolygalacturonase;
- 4/ Passage sur colonne QAE Sephadex A25.
Elution par un gradient en chlorure d'imidazole allant de 0,0 à 0,8 M.

Echange d'ions sur QAE Sephadex A25

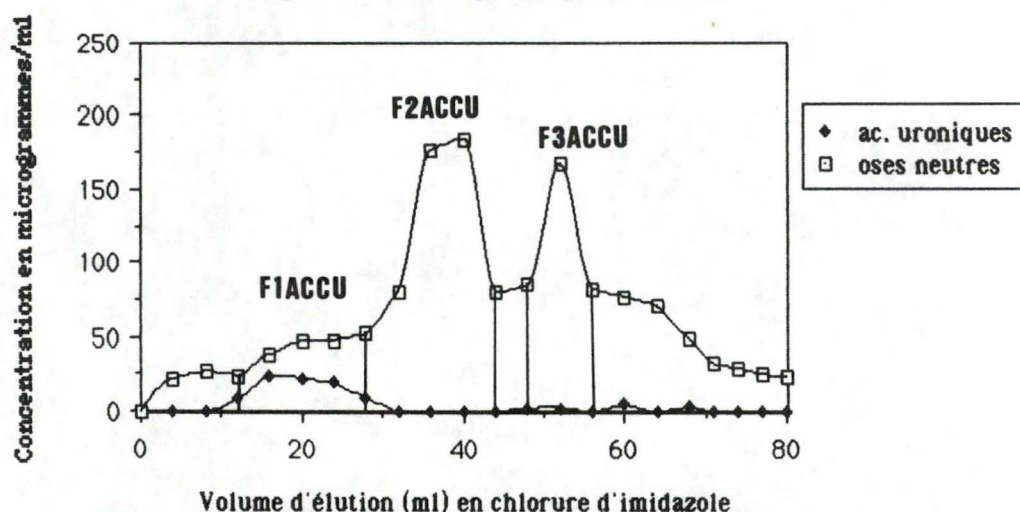


Fig 4.2 Dosage des oses neutres et acides uroniques des fractions en sortie de colonne échangeuse d'anions QAE Sephadex A25. L'échantillon a été précipité à l'acétate de cuivre et digéré à l'EPG.

Le chromatogramme montre une élution d'acides uroniques aux faibles forces ioniques (fraction F1AcCu), suivie vers la moitié du gradient, par deux pics d'oses neutres (fractions F2AcCu et F3AcCu). Ces deux dernières fractions semblaient quitter le gel indépendamment d'acides uroniques, pour autant que le dosage au méthahydroxybiphényle soit fiable.

L'élution rapide de F1AcCu pourrait s'expliquer par son faible contenu en acides uroniques non estérifiés et leur distribution par rapport aux acides méthylestérifiés et aux sucres neutres dans la chaîne pectique. Une meilleure fixation des acides uroniques non estérifiés, même en petite quantité, mais disposés en chaîne homopolygalacturonique, retarderait la désorption des fractions F2AcCu et F3AcCu.

Ces trois échantillons contenaient des oses neutres et des acides uroniques : 0,766 mg et 0,296 mg respectivement pour F1AcCu ; 1,1 mg et 0,0 mg pour F2AcCu ; 1,0 mg et 0,0 mg pour F3AcCu. Le pourcentage relatif d'oses neutres par rapport aux sucres totaux était de 72 % pour F1AcCu, 100% pour F2AcCu et F3AcCu.

4.1.1.2 Précipitation à l'éthanol

Nous avons suivi les mêmes étapes de séparation que pour la précipitation à l'acétate de cuivre, si l'on excepte l'éthanol utilisé pour la précipitation. Le dosage des fractions en sortie de colonne nous a donné le schéma suivant :

Echange d'ions sur QAE Sephadex A25

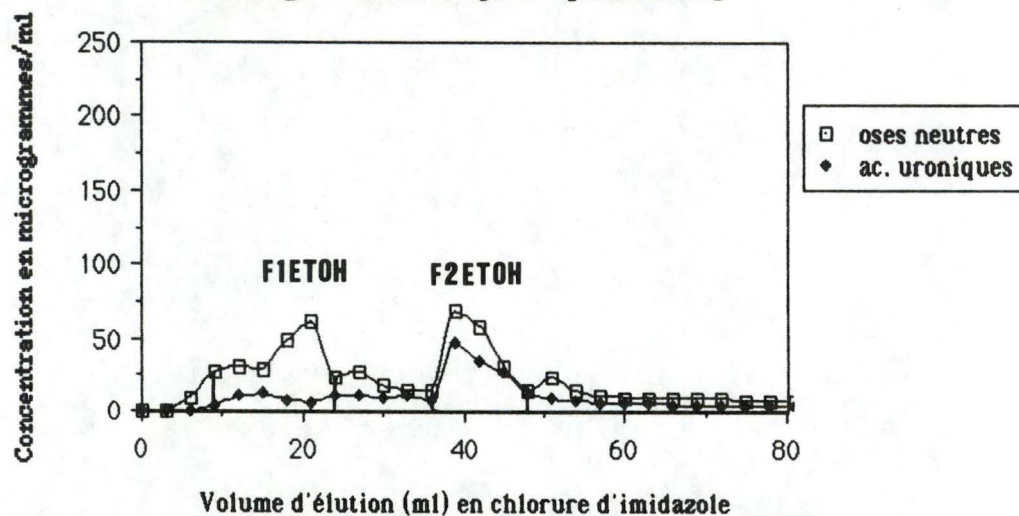


Fig 4.3 Dosage des oses neutres et des acides uroniques des fractions en sortie de colonne QAE Sephadex A25. L'échantillon a été précipité à l'éthanol et digéré à l'EPG.

La quantité totale d'oses neutres récupérés était plus faible que dans le cas d'une précipitation à l'acétate de cuivre, par le dosage au méthahydroxybiphényle, on détecte plus d'acides uroniques en sortie de colonne.

Les fractions ont été rassemblées en deux échantillons nommés F1EtOH (fraction 1, éthanol) et F2EtOH (fraction 2, éthanol) selon leurs teneurs en oses neutres.

Leur composition en oses neutres et acides uroniques était respectivement de 0,42 mg et 0,10 mg pour F1EtOH et de 0,42 mg et 0,32 mg pour F2EtOH. Le pourcentage relatif d'oses neutres par rapport aux sucres totaux était donc de 80% pour F1EtOH et de 56% pour F2EtOH.

La présence de chaînes latérales et un taux d'estérification plus élevé ont probablement permis une élution plus rapide de F1EtOH, gênant une interaction forte entre le gel et les unités uroniques acides.

4.1.1.3 Influence du tampon d'éluion

Nous avons tenté d'isoler des chaînes latérales en utilisant, pour l'éluion de la colonne QAE Sephadex A25, de l'acétate de sodium en gradient de 0,0 à 0,8M, au lieu du chlorure d'imidazole utilisé précédemment.

Aucun changement significatif n'a été observé quand le surnageant était précipité à éthanol et digéré à l'EPG. Par contre, le schéma d'éluion du surnageant précipité à l'acétate de cuivre et digéré à l'EPG en était complètement modifié.

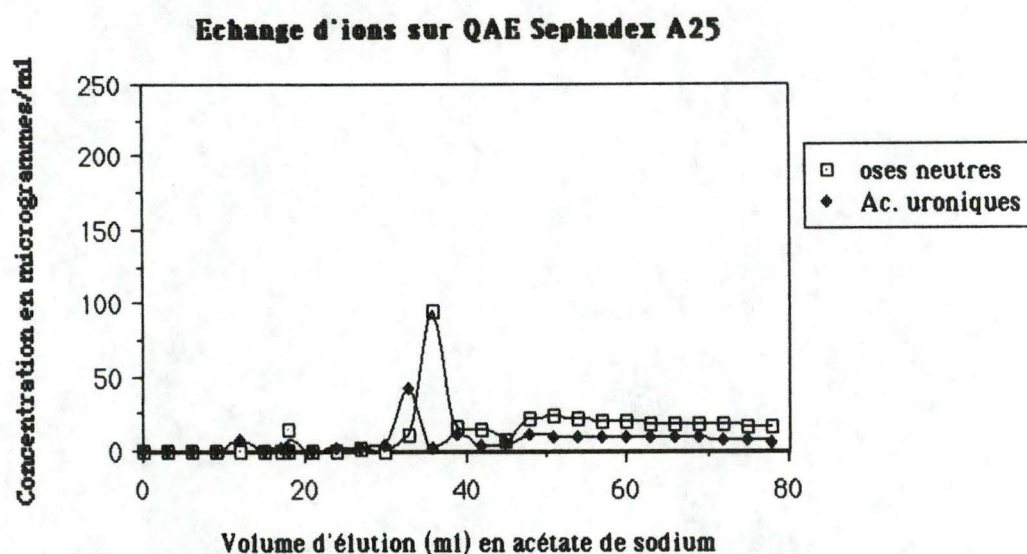


Fig 4.4 Dosage des oses neutres et des acides uroniques des fractions en sortie de colonne échangeuse d'anions QAE Sephadex A25. Elution par un tampon acétate de sodium de l'échantillon précipité à l'acétate de cuivre et digéré à l'EPG.

Très peu d'acides uroniques ont quitté le gel. Ceci s'explique par le fait que les pectines non estérifiées, solubles dans un tampon de chlorure d'imidazole, précipitent dans un tampon d'acétate de sodium concentré (supérieur à 0,5M). Les pectines non estérifiées, qui forment des agrégats ou/et des gels en présence de cations métalliques, peuvent en effet précipiter en présence de sodium concentré. Seules les pectines hérissées, à haut taux d'estérification, seront ainsi décrochées (Mc Neil *et al.*, 1984).

4.1.2 Méthode par β -élimination

L'isolement a été effectué comme suit :

- 1/ Passage sur une colonne QAE Sephadex A25, éluion en gradient d'acétate de sodium

allant de 0,0 à 0,8 M ;

2/ β -élimination de l'échantillon recueilli.

Les fractions recueillies en sortie de colonne échangeuse d'anions ont été dosées.

Echange d'ions sur QAE Sephadex A25

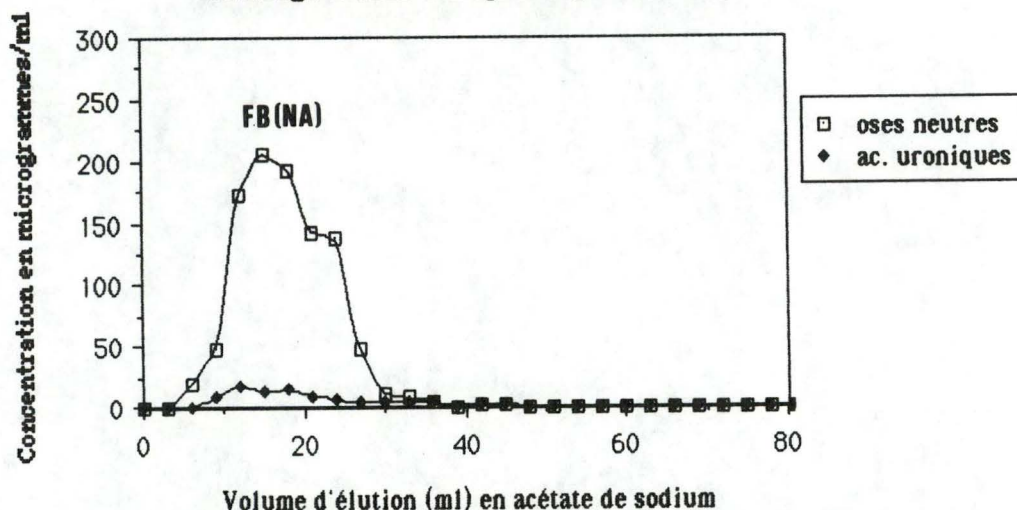


Fig 4.5 Dosage des oses neutres et des acides uroniques en sortie de colonne QAE Sephadex A25. Le surnageant a été déposé dialysé (cfr texte).

L'élution en tampon acétate de sodium n'a permis que l'élution des parties hérissées des pectines.

Les fractions ont été collectées et rassemblées en un échantillon nommé F β (Na) (fraction β -éliminée, tampon acétate de sodium pour élution). Sa composition en oses neutres et acides uroniques, après β -élimination, était de 1,7 mg et 0,21 mg respectivement. Le pourcentage relatif d'oses neutres par rapport aux sucres totaux était donc de 89%.

4.1.2.1 La β -élimination

Cette réaction chimique élimine les acides uroniques terminaux ou estérifiés en créant des unités insaturées. On peut suivre l'évolution quantitative de ces groupements en mesurant l'absorbance de la solution β -éliminée à 235 nm (Thibault, 1983). Cette réaction se déroule normalement en milieu basique. Pourtant, nous avons dû dégrader les chaînes pectiques estérifiées à pH 5,6. En effet, il nous fallait réaliser un compromis entre la β -élimination et la préservation des groupements esters, la désestérification se passant également en milieu basique (Thibault, 1983 ; Fry, 1988)

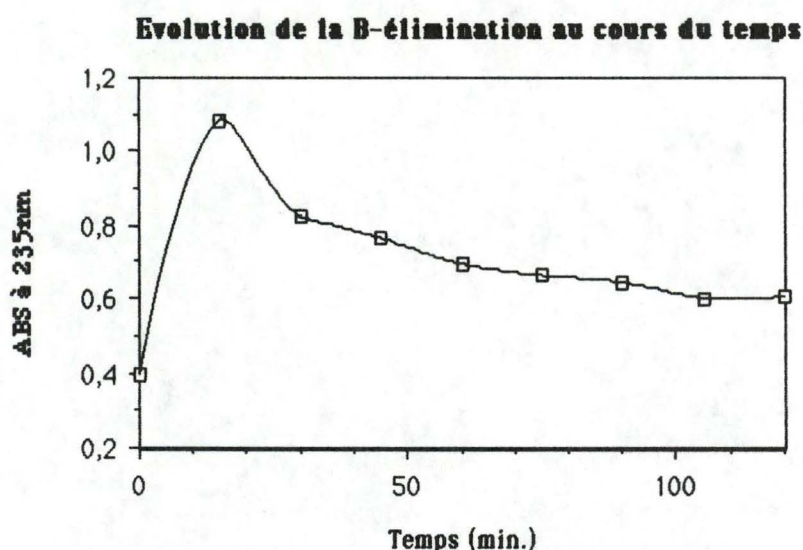


Fig 4.6 Evolution du nombre de groupements insaturés au cours d'une β -élimination sur un échantillon de pectines isolées sur DEAE Sephadex A50.

La β -élimination est surtout effective durant les 15 premières minutes. Une dégradation oxydative des produits serait la cause de la diminution d'absorbance observée après cette période (Pazur, 1986).

D'autre part, nous avons effectué un test en *dot blot* au moyen du 2F4 qui reconnaît la pectine acide (Liners *et al*, 1989). Une aliquote de pectine estérifiée a été β -éliminée puis séparée en deux parties, dont une a été désestérifiée à pH 12,0 afin de permettre une reconnaissance par le 2F4 de portions non dégradées éventuelles. Nous avons ainsi vérifié qu'après β -élimination, aucun fragment de pectine acide n'est plus reconnu par cet anticorps (cfr photo 4.1, page 39)

4.1.2.2 Influence du tampon d'éluion

Nous avons effectué un nouvel isolement en éluant au moyen d'un tampon de chlorure d'imidazole. Le résultat attendu est une sortie plus massive d'acides uroniques que lorsque nous utilisons un tampon acétate de sodium. En effet, à force ionique élevée, les portions lisses ne précipitent plus dans le gel et peuvent donc quitter le gel tout autant que les parties hérissées des pectines.

Chaque fraction a été dosée au méthahydroxybiphényle et par la méthode de Dubois en sortie de colonne QAE Sephadex A25.

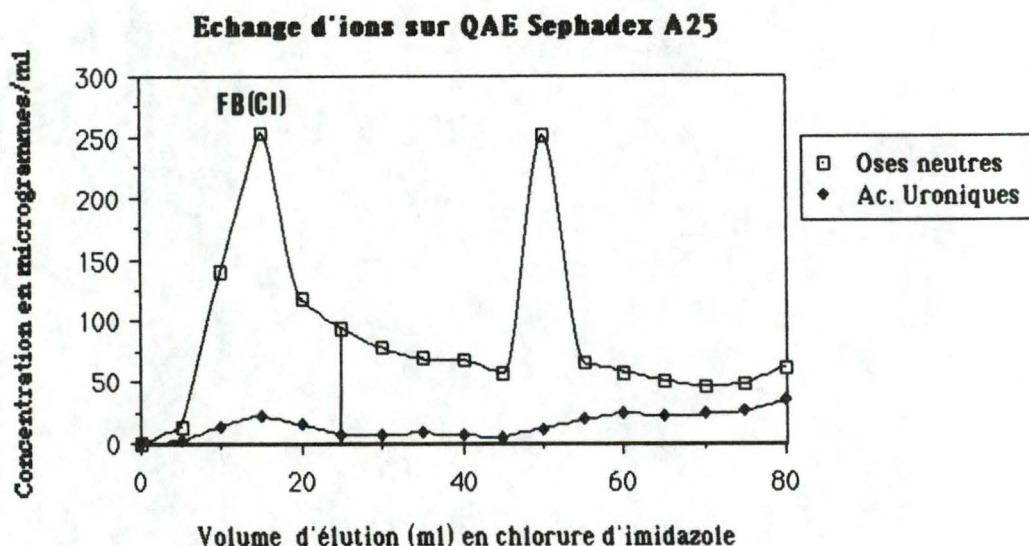


Fig 4.7 Dosage des oses neutres et des acides uroniques des fractions en sortie de colonne QAE Sephadex A25. L'élution du surnageant dialysé déposé s'est faite par un tampon chlorure d'imidazole.

Nous avons observé deux zones d'élution des pectines. La première, au début du gradient, correspond probablement à des acides uroniques très estérifiés, accompagnés d'oses neutres, sans doute des chaînes latérales. Une seconde zone d'acides uroniques non estérifiés, qui n'a pas été observée dans l'élution à l'acétate de sodium, quittait le gel aux forces ioniques plus élevées, ce qui était possible avec le chlorure d'imidazole.

Les fractions ont été collectées et rassemblées en un échantillon nommé F β (CII) (fraction β -éliminé, tampon chlorure d'imidazole pour l'élution). Nous aurions pu prélever un second échantillon correspondant au second pic d'oses neutres, mais s'éluant tard, il est cependant peu probable qu'il soit composé de portions hérissées de pectines.

F β (CII) était composé, après β -élimination, de 1,50 mg d'oses neutres et 0,15 mg d'acides uroniques, soit 90% d'oses neutres.

4.1.3 Analyse des échantillons en chromatographie en phase gazeuse (méthode des acétates d'alditols)

Les méthodes décrites précédemment nous ont permis d'isoler 7 échantillons.

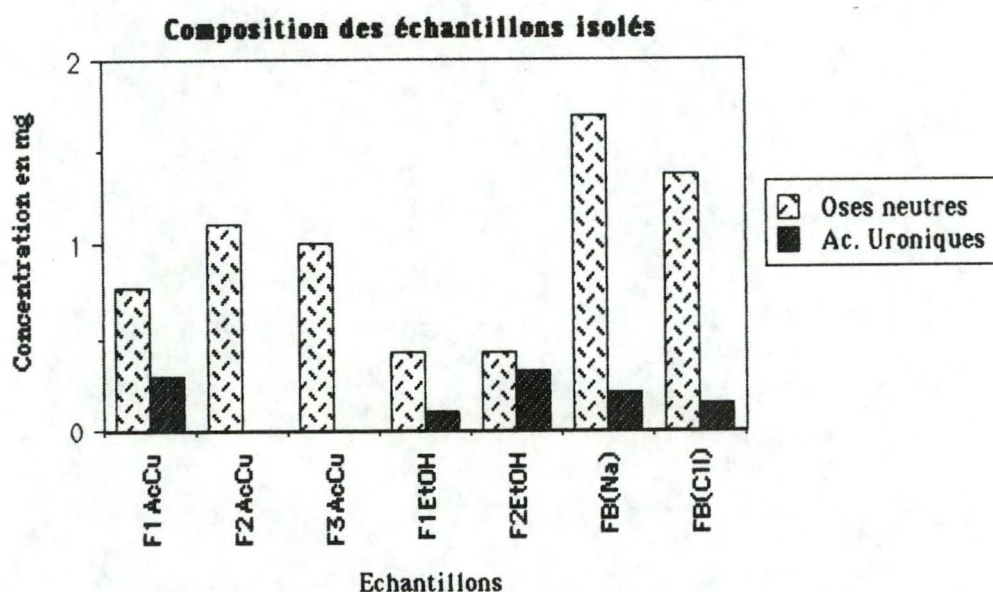


Fig 4.8 Histogramme donnant la composition en oses neutres et acides uroniques des 7 échantillons isolés

Ceux-ci ont été hydrolysés au TFA 2 N et transformés en acétates d'alditols. Un seul échantillon nous a donné un chromatogramme utilisable.

Le chromatogramme montrait des traces de glucose, les sucres majoritaires étant le xylose, le galactose et l'arabinose. Cette composition correspond partiellement à celle des chaînes latérales de pectines extraites de racines de *Daucus carotta*. En effet, ces chaînes latérales sont composées de 4% de rhamnose, 29% d'arabinose, 51% de galactose, 15% de xylose et 1,5% de glucose (Massiot *et al.* 1989). Le polysaccharide que nous avons isolé contenait 19% d'arabinose, 69% de galactose, 12% de xylose et des traces de glucoses. Nous n'avons pas détecté la présence de rhamnose. Toutefois, nous devons tenir compte du fait que nous ne travaillons pas sur des racines, ni même sur des parois isolées, mais sur un surnageant de cellules en suspensions. Ceci pourrait être la cause des différences observées.

La méthode des acétates d'alditols ne fournit aucun renseignement quant au contenu en acides uroniques.

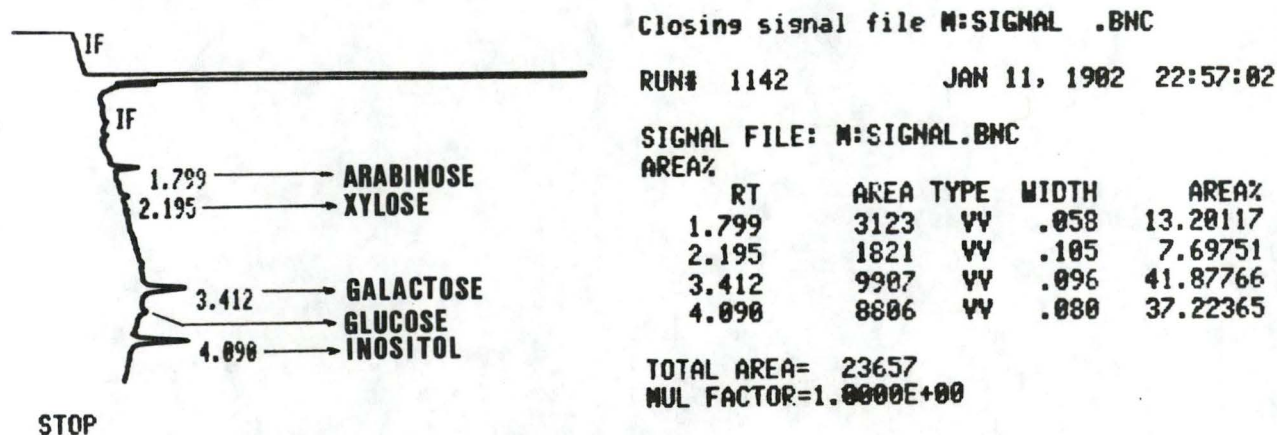


Fig 4.9 Chromatogramme des acétates d'alditols obtenu à partir de l'échantillon Fb(ac).

4.2 Amélioration du rendement dans l'isolement des chaînes latérales

Pour tous les isolements suivants, nous avons utilisé la méthode d'isolement des chaînes latérales par échange d'anions et β -élimination. Pour rappel, le surnageant est dialysé, déposé sur colonne échangeuse d'anions, élué par gradient d'acétate de sodium, puis la fraction pectique récupérée est β -éliminée. Nous avons obtenu 1,7 mg de chaînes latérales à partir de 50 ml de surnageant non concentré.

4.2.1 Concentration des échantillons

En vue d'isoler des quantités plus importantes de polysaccharides, nous avons concentré le surnageant à l'aide de fibres creuses AMICON. Nous avons ainsi obtenu des aliquotes de 50 ml, correspondant chacune à 300 ml de surnageant initial. Ces aliquotes contenaient 51,0 mg d'oses neutres et 4,1 mg d'acides uroniques.

Le passage sur colonne QAE Sephadex A25 s'est effectué comme précédemment, mais nous n'avons pas obtenu le même chromatogramme, quoique le pic d'acides uroniques soit sorti à la même force ionique. Nous n'avons récupéré que 17 % des 4,1 mg d'acides uroniques déposés, vraisemblablement suite au tampon d'éluion utilisé (acétate de sodium).

En ce qui concerne l'éluion des oses neutres, le schéma de sortie était profondément modifié. Nous avons observé un pic de sucres non chargés accompagnant la sortie des sucres chargés aux faibles forces ioniques, mais en plus, certains oses neutres quittaient le gel, apparemment, indépendamment des pectines.

Outre les possibilités d'adsorption non spécifique des oses neutres sur le gel (il s'agit d'un gel de glucose polymérisé en $\alpha(1-6)$), il est probable que les conditions du dosage au méthahydroxybiphényle n'aient pas permis de détecter la présence d'acides uroniques dans ces fractions. En effet, un test ELISA utilisant le 2F4, a reconnu toutes les fractions éluées. Le taux de reconnaissance par l'anticorps n'a pas donné d'information sur la quantité de pectines acides par fraction, le test n'étant pas quantitatif (cfr schéma 4.2.2.3).

Echange d'ions sur QAE Sephadex A25

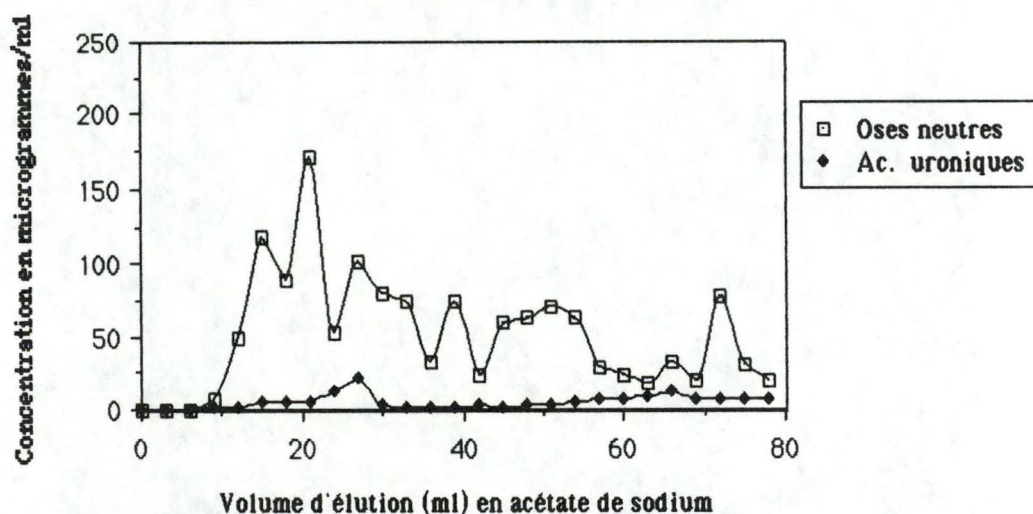


Fig 4.10 Dosage des oses neutres et des acides uroniques des fractions en sortie de colonne QAE Sephadex A25. L'échantillon déposé, d'un volume de 50 ml était concentré à partir de 300 ml de surnageant pur.

La force du gel utilisé influençant la rétention des groupements uroniques, nous nous sommes tournés vers des colonnes échangeuses d'anions plus faibles que le QAE Sephadex A25.

4.2.2 Influence du gel échangeur d'anions

Comme nous venons de le voir, la majeure partie (83%) des acides uroniques d'un surnageant simplement dialysé n'a pas pu être décrochée du gel QAE. Nous avons donc tenté de récupérer plus de pectines à haut taux d'estérification, et donc plus de chaînes latérales, en utilisant un échangeur moins fort.

4.2.2.1 DEAE Sephadex A50

Ce gel, moins fort que le QAE Sephadex A25, a un taux de gonflement environ 9 fois plus élevé (80 ml pour un gramme de gel, dans de l'eau déminéralisée). Nous avons donc dû utiliser une colonne de plus grand volume (30 cm x 1,50 cm, 28 cm de gel) et un gradient en acétate de sodium adapté à ce volume (300 ml).

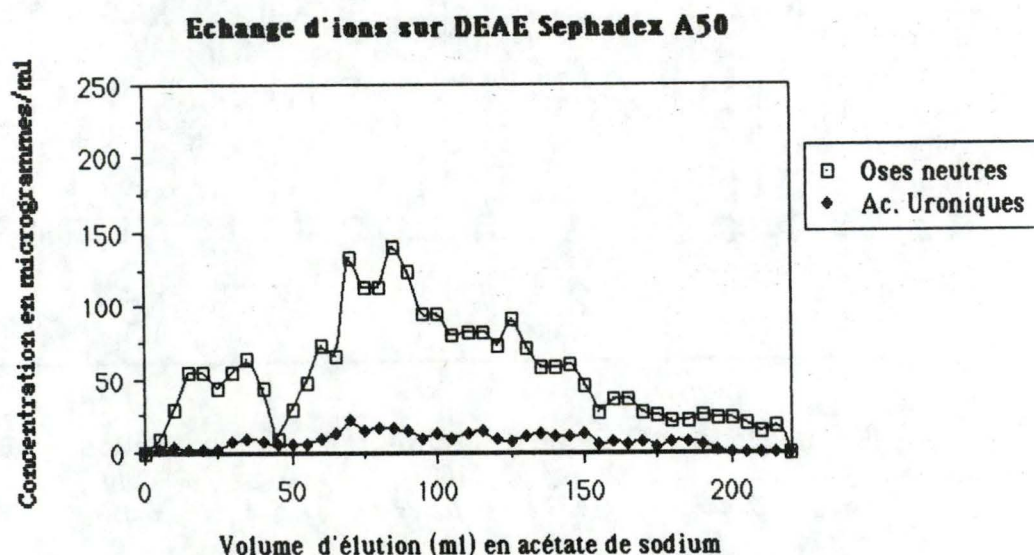


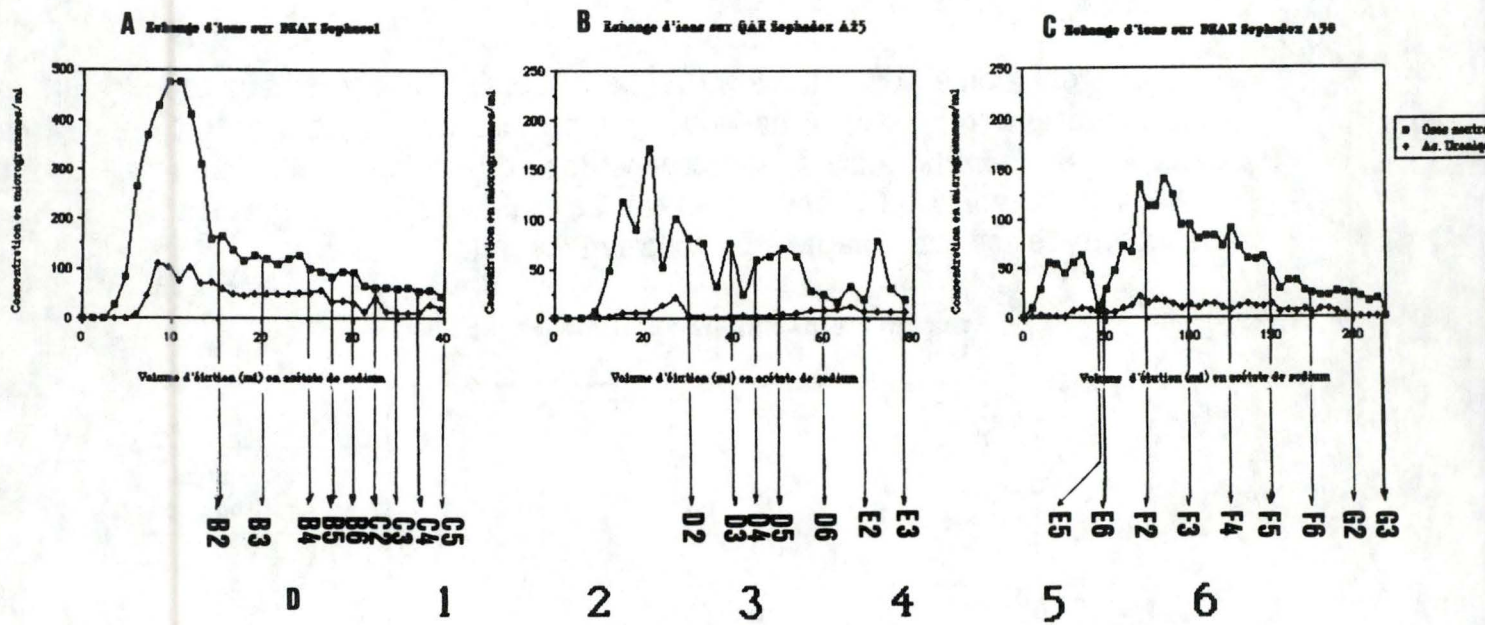
Fig 4.11 Dosage des acides uroniques et des oses neutres des fractions en sortie de colonne DEAE Sephadex A50. L'échantillon déposé contenait 51 mg d'oses neutres et 4,1 mg d'acides uroniques.

Le gel DEAE Sephadex a libéré 2,5 mg d'acides uroniques, ce qui correspondait à 60 % de la quantité déposée. Nous avons à nouveau observé un pic qui quittait le gel aux faibles forces ioniques du gradient d'acétate de sodium, suivi immédiatement d'un second pic beaucoup plus large. La suite de l'élution nous a donné un plateau d'à peu près 10 µg/ml d'acides uroniques.

A nouveau, les deux pics seraient des pectines hérissées et/ou fortement estérifiées, la fraction de plus forte concentration en oses neutres correspondant alors aux chaînes latérales de pectines.

4.2.2.2 DEAE Séphacel

L'emploi de la colonne DEAE Séphacel a été préconisé par Thibault (communication personnelle). Le volume de gel prégonflé utilisé était de 1,25 ml. Tous les paramètres d'élution ont été adaptés au volume de cette colonne.



A	Blanc	Pectine 200µg	Pectine 100µg	Pectine 50µg	Pectine 25µg	Blanc
	0,000	0,437	0,522	0,611	0,492	0,084
B	Blanc	B2	B3	B4	B5	B6
	0,061	0,322	0,336	0,316	0,411	0,295
C	Blanc	C2	C3	C4	C5	Blanc
	0,047	0,230	0,610	0,381	0,612	0,078
D	Blanc	D2	D3	D4	D5	D6
	0,062	0,244	0,419	0,306	0,296	0,216
E	Blanc	E2	E3	Blanc	E5	E6
	0,052	0,039	0,299	0,076	0,592	0,539
F	Blanc	F2	F3	F4	F5	F6
	0,053	0,492	0,500	0,567	0,575	0,821
G	Blanc	G2	G3	Sans anticorps primaire	Blanc	Blanc
	0,081	0,565	0,558	0,042	0,073	0,099

Fig. 4.12 Résultats du test ELISA réalisé au moyen du 2F4. Les schéma d'élutions en A, B et C indiquent les fractions prélevées comme échantillons et déposés dans les puits comme antigène.

La grille D nous indique l'agencement des puits et les absorbances à 405 nm. On remarque une reconnaissance du 2F4 sur toutes les fractions des trois colonnes utilisées pour l'isolement des portions hérissées des pectines.

Echange d'ions sur DEAE Sephacel

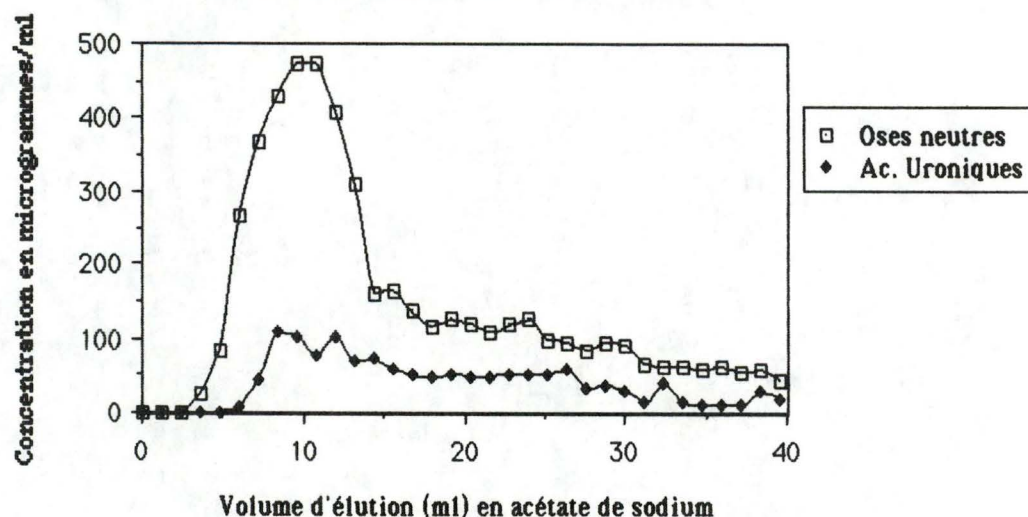


Fig 4.13 Dosage des oses neutres et des acides uroniques des fractions en sortie de colonne DEAE Séphacel. L'échantillon déposé contenait 51 mg d'oses neutres et 4,1 mg d'acides uroniques.

La sortie du premier pic était semblable à celle des éluions précédentes (cfr Fig 4.9 et 4.10). Nous avons récupéré 1,5 mg d'acides uroniques en sortie de colonne, soit 38% de la quantité initiale.

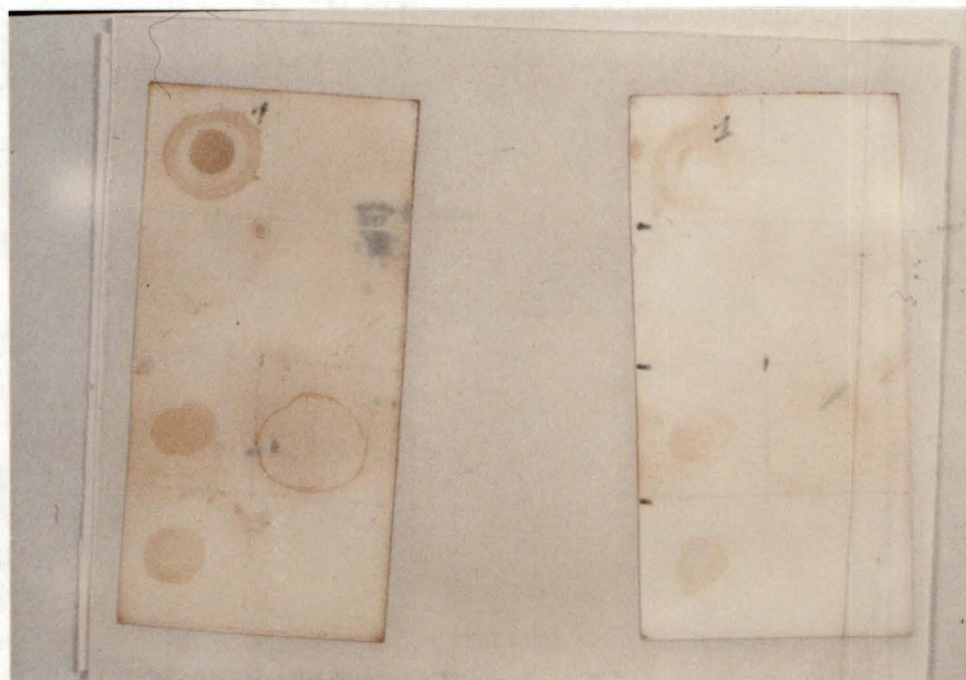
4.2.2.3 Choix du gel échangeur d'anions

En conclusion, chaque colonne nous a donné un schéma d'élution comparable : un pic de pectine quittait la colonne aux faibles forces ioniques en acétate de sodium, accompagné par des sucres non chargés. Pour chacune des trois colonnes, nous avons donc récupéré les fractions correspondant aux pics d'acides uroniques quittant tôt le gel.

Ces trois fractions ont ensuite été débarrassées de la majeure partie de leurs acides uroniques par β -élimination pour former F(QAE) (fraction QAE Sephadex), F(DEAE_d) (fraction DEAE Sephadex) et F(DEAE_c) (fraction DEAE Séphacel).

Les oses neutres qui quittent le gel après ce premier pic d'acides uroniques très estérifiés seraient reliés à des portions de pectines acides. Ces fragments ont été reconnus par le 2F4, comme nous le montre le test ELISA (cfr fig 4.12).

Le meilleur rendement global en acides uroniques nous est apporté par une colonne de DEAE Sephadex A50 (60 % des acides uroniques sont récupérés). Le moins bon rendement est obtenu par



1	2
3	4
5	6
7	

Photo 4.1 Cliché d'un test en dot blot au moyen du 2F4 comme anticorps primaire. La deuxième bandelette de nitrocellulose (à droite) est un contrôle négatif (sans anticorps primaire). Chacune des deux bandelettes comprend les dépôts indiqués ci-dessous :

- 1/ pectine acide ;
- 2/ pectine estérifiée ;
- 3/ pectine estérifiée et β -éliminée ;
- 4/ pectine estérifiée β -éliminée et déestérifiée 10 minutes à pH 12,0 ;
- 5/ fraction F(DEAEc) ;
- 6/ fraction F(DEAEc) β -éliminée ;
- 7/ fraction F(DEAEc) β -éliminée et déestérifiée 10 minutes à pH 12,0 ;

une colonne QAE Sephadex A25 (17% des acides uroniques quittent le gel). Un rendement intermédiaire de 38% est à l'actif du gel DEAE Sephacel.

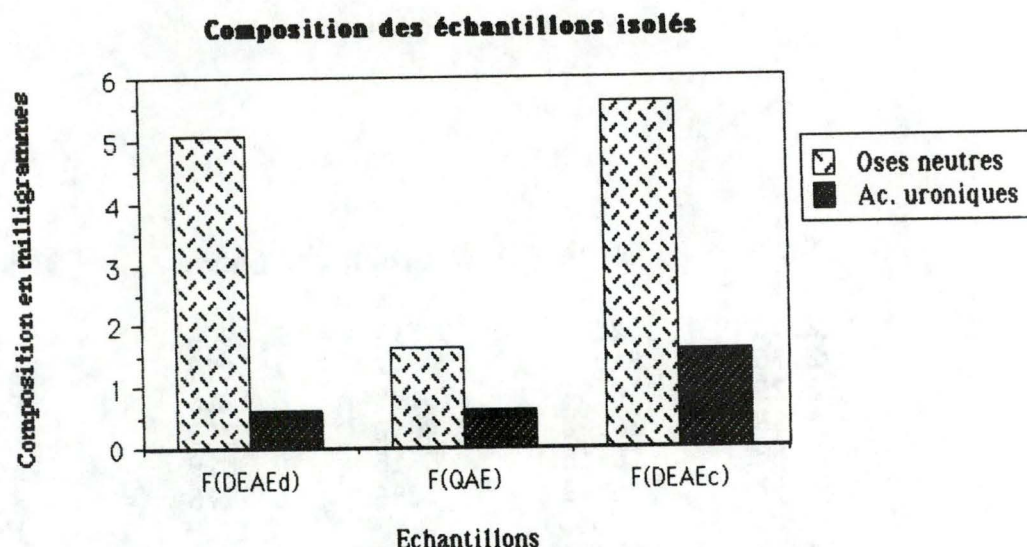


Fig 4.14 Histogramme de la composition en oses neutres et en acides uroniques des trois fractions isolées après β -élimination.

Le but de la β -élimination étant de libérer les chaînes latérales des séquences homopolygalacturoniques, nous n'avons pris en compte que les échantillons F(QAE) et F(DEAEd). En effet, l'échantillon F(DEAEc) contenait encore de nombreux acides uroniques, sans doute arrangés en chaînes non estérifiées non dégradables par β -élimination et donc gênantes pour l'immunisation. Un test en *dot blot* au moyen du 2F4 a montré en effet que la fraction isolée sur DEAE Sephacel présente des chaînes d'acides pectiques reconnues après β -élimination (cfr photo 4.1).

Une analyse en chromatographie en phase gazeuse des deux échantillons retenus (F(QAE) et F(DEAEd)) a été entreprise afin de déterminer si les polysaccharides isolés contenaient bien des chaînes latérales.

4.2.3 Analyse des échantillons en chromatographie en phase gazeuse par la dérivation en triméthylsilyls (TMS)

La dérivation TMS nous permet d'analyser les sucres neutres et uroniques des polysaccharides. Les deux échantillons retenus, F(DEAEd) et F(QAE) ont été hydrolysés au TFA 2N et dérivés en TMS.

Time	Area	Height	Conc.	Name
2.83	102021	39517	2.3954	Ara
2.96	51873	18822	1.2179	Ara
3.25	218132	78149	5.1216	Rha
3.38	26460	8890	0.6213	Rha
3.58	15415	5315	0.3619	Fuc
3.92	24599	6896	0.5776	Fuc
4.12	7350	2069	0.1726	N. I.
4.28	27394	7708	0.6432	Xyl
4.37	21361	6189	0.5015	N. I.
4.64	13632	3484	0.3201	Xyl
4.82	11685	1681	0.2743	N. I.
5.32	8149	1629	0.1913	N. I.
5.56	5544	987	0.1302	N. I.
5.83	21463	4430	0.5039	N. I.
6.33	27926	5830	0.6557	GalUA
6.52	13423	2525	0.3152	N. I.
6.75	5471	931	0.1285	N. I.
7.19	5994	1060	0.1407	N. I.
7.40	658467	111407	15.4060	GalUA
7.65	62116	7342	1.4584	Gal
8.50	683883	109323	16.0571	Gal
8.63	17138	3028	0.4024	N. I.
8.91	109022	18288	2.5598	GalUA
9.12	49814	7328	1.1696	GalUA
9.37	255185	42168	5.9915	Gal
9.92	140595	16922	3.3011	Glc
10.27	23250	3522	0.5459	N. I.
10.47	73843	10846	1.7338	Glc
10.60	400279	6689	0.9399	N. I.
11.29	123079	14877	2.8898	Gal
11.52	6381	1058	0.1498	N. I.
17.93	1002956	105174	23.5487	Inositol

Tableau 4.1 Rapport de sortie des pics de l'échantillon F(QAE) en dérivés TMS.

4.2.3.1 Echantillon F(QAE)

Nous observons pour cet échantillon une composition comparable à celle fournie par la méthode des acétates d'alditols complétée ici par les pics correspondant aux acides uroniques (GalUA : temps de rétention 6,34 ; 7,40 ; 8,92 ; 9,12). En effet, nous observons du rhamnose, du galactose, de l'arabinose, du xylose et du glucose qui entrent dans la composition des chaînes latérales de pectines de *Daucus carotta* (Massiot *et al*, 1989). Nous observons aussi des traces de fucose. Ce sucre pourrait entrer dans la composition de certaines chaînes latérales atypiques, ou, en faible proportion, de chaînes latérales arabinogalactanes de type I ou encore de xyloglucanes (cfr introduction, 2.2.4).

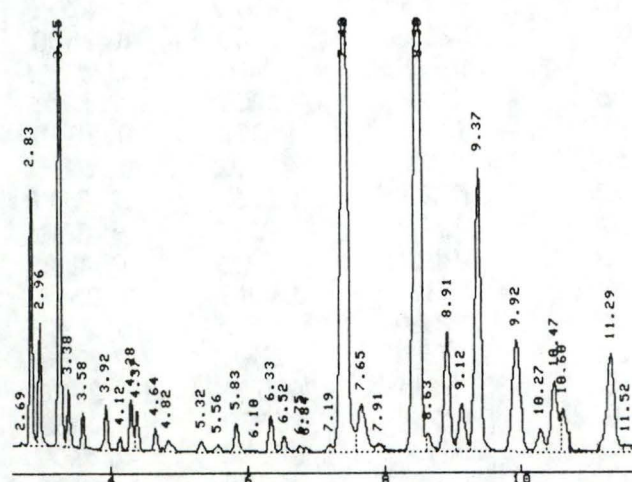


Fig 4.15 Chromatogramme des dérivés TMS obtenus à partir de l'échantillon F(QAE).

4.2.4.2 Echantillon F(DEAEd)

Ce dernier échantillon nous indique, quant à lui, une composition comparable à celle de l'échantillon F(QAE). Cependant, nous observons une plus forte teneur en fucose, ainsi que la présence de mannose, qui entreraient dans la composition des chaînes latérales arabinogalactanes de type I de *Daucus carotta*.

Time	Area	Height	Conc.	Name
2.83	131852	47318	4.1445	Ara
2.96	74614	24273	2.3453	Ara
3.14	7023	2163	0.2207	N. I.
3.26	284368	92370	8.9385	Rha
3.38	54016	13371	1.6979	Rha
3.59	70647	17944	2.2200	Fuc
3.84	7214	2029	0.2267	N. I.
3.92	34665	9741	1.0896	Fuc
4.12	9209	2413	0.2895	N. I.
4.28	5211	1609	0.1638	Xyl
4.37	26547	7032	0.8344	N. I.
4.58	3844	1237	0.1208	N. I.
4.64	5233	1372	0.1645	Xyl
4.88	34272	1162	1.0773	N. I.
5.32	8523	1650	0.2679	N. I.
5.57	7288	1287	0.2291	N. I.
5.83	24492	3923	0.7698	N. I.
6.34	96437	18543	3.0310	GalUA
6.85	8764	365	0.2755	N. I.
7.18	28533	5047	0.8960	N. I.
7.40	358541	62514	11.2700	GalUA
7.65	54271	5350	1.7059	Gal
7.90	22049	2958	0.6931	N. I.
8.07	37752	6239	1.1867	Man
8.44	204974	33403	6.4429	Gal
8.61	14858	2198	0.4670	N. I.
8.92	230364	36509	7.2410	GalUA
9.12	94778	14503	2.9791	GalUA
9.34	98989	14016	3.1115	Gal
9.92	70620	7164	2.2198	Glc
10.27	13823	2166	0.4345	N. I.
10.46	38221	6431	1.2014	Glc
10.59	66462	9862	2.0891	N. I.
10.74	12379	2419	0.3891	N. I.
10.88	54428	8157	1.7108	N. I.
11.27	29428	4147	0.9267	Gal
11.50	12081	385	0.3797	N. I.
17.87	639757	71348	20.1094	Inositol

Tableau 4.2 Rapport de sortie des pics de l'échantillon F(DEAEd) en dérivés TMS.

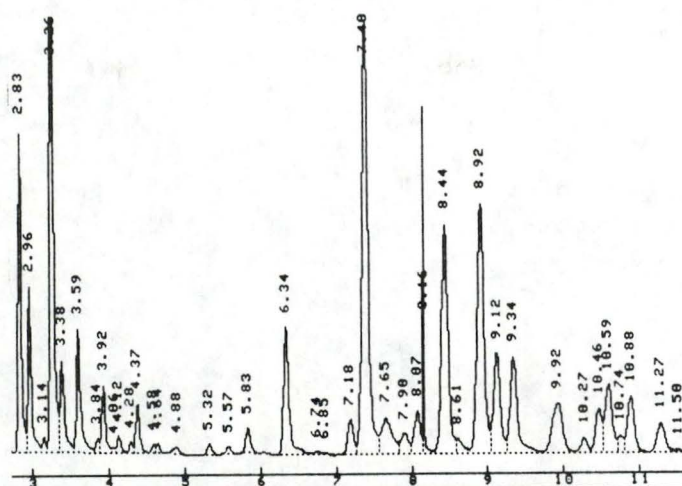


Fig 4.16 Chromatogramme des dérivés TMS obtenus à partir de l'échantillon F(DEAE).

Les deux échantillons sont proches si l'on excepte un taux plus élevé de chaînes arabinogalactanes de type I dans l'échantillon isolé sur DEAE Sephadex A50.

Composition en sucres neutres des chaînes latérales

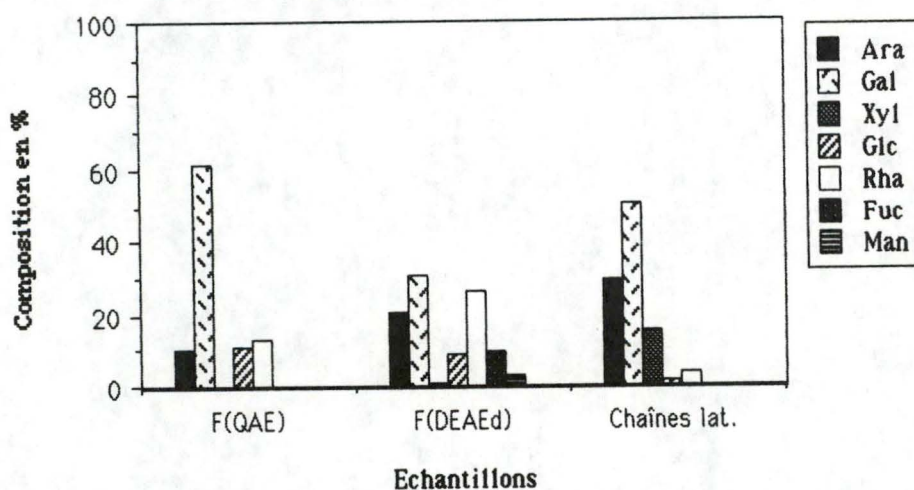


Fig 4.17 Histogramme de la composition en sucre neutre des échantillons F(QAE) et F(DEAE), ainsi que la composition des chaînes latérales de *Daucus carotta*, arabinogalactanes de type I et II confondus (Massiot et Thibault, 1989).

Nous avons donc obtenu, à partir de l'échantillon F(QAE), des polysaccharides composés de 10,3% d'arabinose, 61,5% de galactose, 12% de rhamnose, 10,7% de glucose, et des traces de fucose et de xylose. Ces polysaccharides contiennent encore des acides galacturoniques (9 % des sucres totaux).

Les polysaccharides obtenus à partir de l'échantillon F(DEAE) étaient composés de 20,3% d'arabinose, 32% de galactose, 26% de rhamnose, 8,6% de glucose, 0,8% de xylose, et 9,5% de fucose. Cet

échantillon contenait en plus, 3% de mannose. Les acides galacturoniques constituaient encore 12% des sucres totaux.

4.3 Discussion générale concernant l'isolement des chaînes latérales de pectines

L'isolement effectué sur le surnageant de culture de cellules de *Daucus carotta* nous a permis d'obtenir des polysaccharides composés des oses neutres décrits comme appartenant à des chaînes latérales de pectines (Thibault, 1989). Il semblerait que les chaînes latérales isolées soient un mélange d'arabinogalactanes de type I et II. La proportion de ces deux types changerait selon qu'ils sont séparés sur un échangeur fort (peu de fucose et pas de mannose) ou sur un échangeur faible (mannose et fucose présents).

Toutefois, ces opérations n'éliminent pas tous les acides uroniques. Des acides galacturoniques, désestérifiés lors de la β -élimination pourraient subsister à la base des chaînes latérales, via le résidu rhamnose. Ces dernières unités peuvent être utiles pour le couplage qui sera réalisé dans le cadre des immunisations. En effet, c'est par l'extrémité carboxylique d'un sucre chargé que nous couplerons les chaînes latérales à de l'albumine sérique bovine méthylée.

4.4 Analyse des polyséras

Les polysaccharides utilisés pour les couplages ont été isolés sur QAE Sephadex A25 et β -éliminés.

4.4.1 Calendrier des immunisations et rappels

Pour toutes les immunisations, nous avons utilisé des souris mâles de lignée syngénique BALB/c.

Un premier lot de 4 souris n'a subi que des injections intrapéritonéales du polysaccharide couplé à la BSA et de l'adjuvant de Freund selon le protocole détaillé page 20. Les rappels ont été effectués aux 4^{ème} et 9^{ème} semaines.

Un second lot de 4 souris a reçu une première dose d'antigène par voie intrasplénique. Ces antigènes avaient été couplés au Sépharose 4B selon la méthode décrite par Nilsson et Larsson (1987). Il nous a été impossible d'effectuer les rappels de ces souris par une seconde immunisation intrasplénique du fait d'infections au niveau de l'incision. Les rappels ont été effectués au moyen de l'émulsion Ag-BSA et adjuvant de Freund incomplet aux 3^{ème} et 5^{ème} semaines, en remplacement des opérations intraspléniques.

Un troisième et un quatrième lot ont été formés de souris immunisées intraspléniquement par des morceaux de nitrocellulose saturés en antigène seul pour le lot 3, en antigène couplé à de la BSA pour le lot 4. Ces deux derniers groupes ont été chacun divisés en deux sous-groupes. La première moitié de chaque sous-groupe a subi le premier rappel par voie intrasplénique en 3ème semaine. Puis du fait d'infections, le rappel suivant en 5ème semaine a été effectué par injection intrapéritonéale (émulsion du polysaccharide et de l'adjuvant de Freund incomplet). Les rappels pour les deux autres sous-groupes ont été accomplis par voie intrapéritonéale aux 3ème et 5ème semaines (polysaccharide et adjuvant de Freund incomplet).

Lot	1		2		3		4	
	BSA		BSA-NC		NC		BSA - Seph	
Immunisation	IP		IS	IS	IS	IS	IS	
Rappels sem.	1							
	2							
	3	IP	IP	IS	IP	IS	IP	
	4							
	5		IP	IP	IP	IP	IP	
	6							
	7							
	8							
	9	IP						

Fig 4.18 Schéma récapitulatif du calendrier des immunisations et rappels effectués sur les souris BALB/c.

4.4.2 Vérification de la présence d'anticorps par test en *dot blot* sur nitrocellulose

Nous avons testé la présence d'anticorps en dot blot après le 1er et le second rappel pour chacun des groupes de souris BALB/c. Pour chacun des *dot blot*, nous avons également incubé une bandelette de nitrocellulose avec le polysérum d'une souris non immunisée et une autre bandelette, sans anticorps primaire, en tant que tests négatifs.

4.4.2.1 Effet du tampon

Trois tampons ont été utilisés afin d'optimiser la présence d'anticorps en *dot blot* sur nitrocellulose. Parmi les tampons TRIS-NaCl, TRIS-NaCl-CaCl₂ (TRIS NaCa) et PBS, seul le tampon TRIS NaCa nous a donné des résultats satisfaisants.

4.4.2.2 Test en *dot blot* après le premier rappel

Polysérum des souris immunisées en intrapéritonéale

Dès le premier rappel par la méthode intrapéritonéale, nous avons pu observer une réponse anticorps dirigée contre les chaînes latérales ainsi que contre ces chaînes couplées à la BSA méthylée. Une légère réponse était observée contre la BSA méthylée seule, mais nous avons pu l'observer dans tous les tests, même sans anticorps primaire, peut-être à cause d'adsorption non spécifique (Photo 4.2, page 44).

Polysérum des souris immunisées en intrasplénique

Outre les réponses non spécifiques contre la BSA méthylée, aucun anticorps spécifique d'aucun groupe de ces souris n'a pu être détecté (photo 4.3, page 44).

4.4.2.3 Test en *dot blot* après le second rappel

Polysérum des souris immunisées en intrapéritonéale

Comme lors du premier rappel, nous observons une réponse anticorps dirigée contre les chaînes latérales de pectines, contre la BSA et contre le produit de couplage (photo 4.4, page 44).

1	2	3
---	---	---

Photo 4.2 : Cliché d'un test dot blot au moyen du polysérum de souris immunisées par voie intrapéritonéale, après le premier rappel. Sur chaque bandelette, nous avons déposé :

- 1/ des chaînes latérales ;
- 2/ des chaînes latérales couplées à la BSA méthylée ;
- 3/ de l'acide homopolygalacturonique.

La bandelette A a été incubée dans le 2F4 ;

B a été incubée dans le polysérum à tester ;

C a été incubée dans le polysérum d'une souris non immunisée ;

D a été incubée dans du TrisNaCa seul.

Nous avons observé une réponse en B1 et B2.

1	2	3	4
---	---	---	---

Photo 4.3 : Cliché d'un test dot blot au moyen du polysérum des souris immunisées, après le premier rappel. Sur chaque bandelette, nous avons effectué les dépôts suivants :

- 1/ chaînes latérales ;
- 2/ chaînes latérales couplées à la BSA méthylée
- 3/ BSA méthylée
- 4/ acide homopolygalacturonique

Chaque bandelette a ensuite été incubée dans un milieu différent :

A/ Polysérum de souris immunisées au moyen de nitrocellulose saturée en chaînes latérales seules, 1er rappel en intrapéritonéale (SISIP) ;

B/ idem que A, mais le premier rappel s'est fait en intrasplénique (SISIS) ;

C/ Polysérum des souris immunisées au moyen de nitrocellulose saturée en chaînes latérales couplées à la BSA méthylée, 1er rappel en intrasplénique (SISIS) ;

D/ Idem que C, mais le premier rappel s'est fait en intrapéritonéal (SISIP) ;

E/ Polysérum de souris non immunisée ;

F/ tampon .

Aucune réponse spécifique n'est observée.

1	2
3	4
5	6
7	8
9	10
11	
12	

Photo 4.4 : Cliché d'un test en dot blot aux moyens des polyséras obtenus après le second rappel. Les dépôts effectués sont :

- 1/3/5 chaînes latérales ;
- 2/4/6 chaînes latérales couplées à de la BSA méthylée ;
- 7/ pectine acide ;
- 8/ BSA ;
- 9/ CL1 ;
- 10/ CL2 ;
- 11/ CL3 ;
- 12/ Chaînes latérales isolées sur DEAE Sephadex A50 ;

Les polyséras utilisés sont :

en A : souris immunisées en intrapéritonéale, (chaînes latérales/BSA méthylée) ;

B : souris immunisées en intrasplénique, (chaînes latérales sur nitrocellulose), rappel IP ;

C : idem que B, mais rappel en IS ;

D : souris immunisées en intrasplénique, (chaînes latérales/BSA méthylée sur nitrocellulose), rappel IP ;

E : idem que D, mais rappel en IS ;

F : souris immunisées en intrasplénique, (chaînes latérales/BSA méthylée/sepharose 4B) ;

G : 2F4, les dépôts ont été désestérifiés avant la saturation ;

H et I : contrôles négatifs.

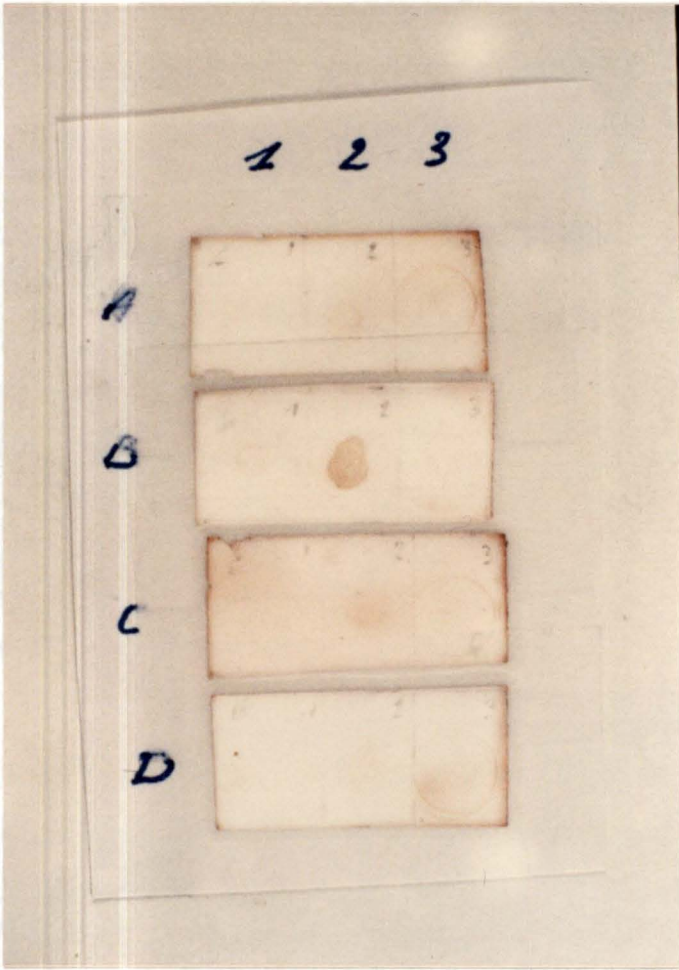


PHOTO 4.2

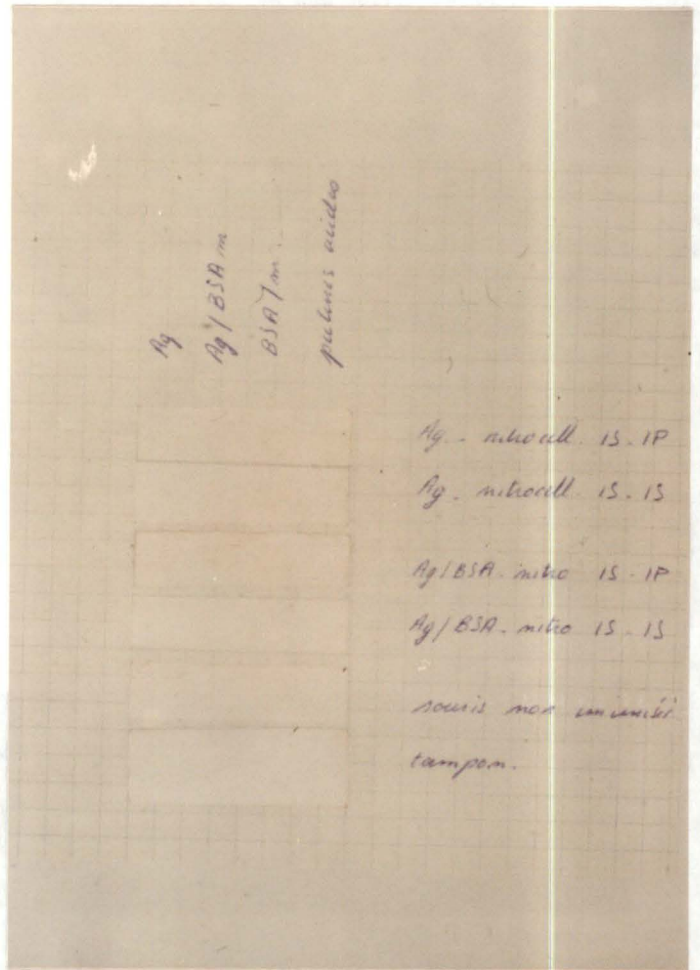
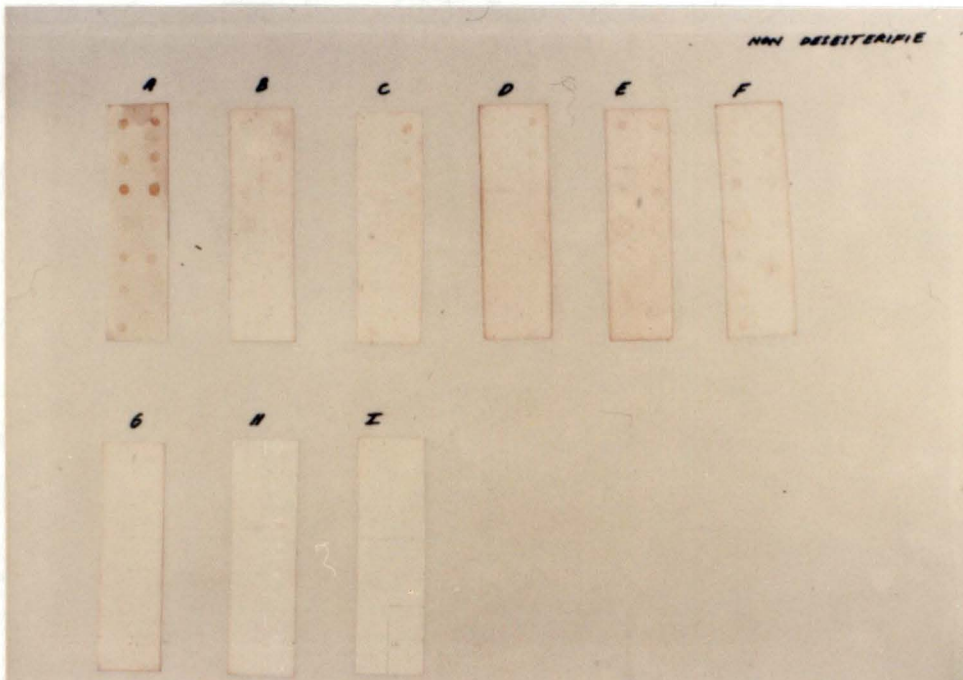


PHOTO 4.3

PHOTO 4.4



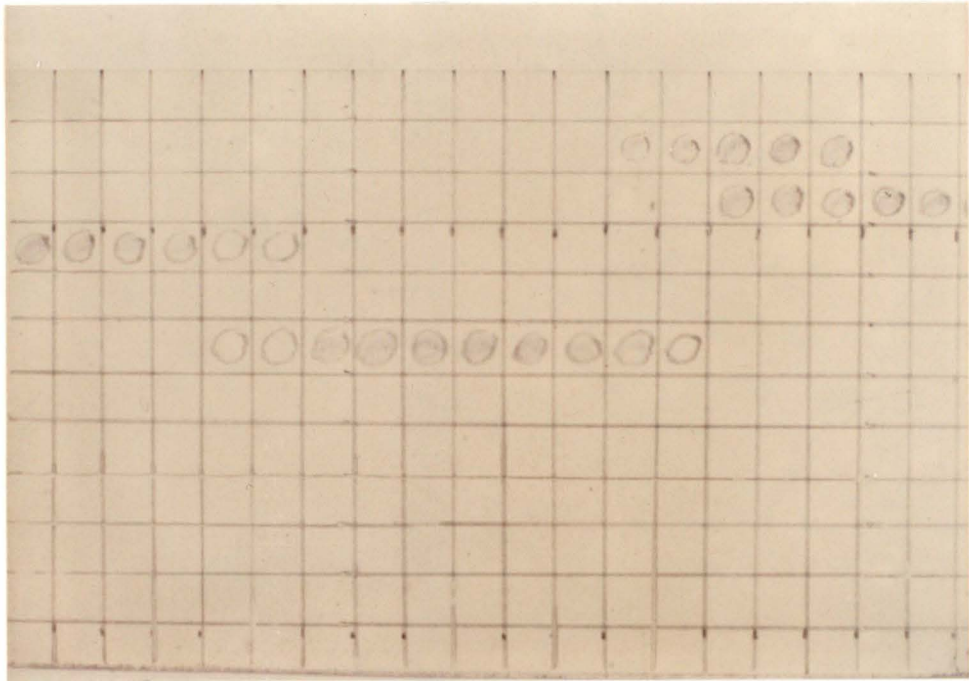


Photo 4.5 Révélation sur couche mince de la présence de sucres par orcinol sulfurique. Les taches violettes indiquent les fractions positives.

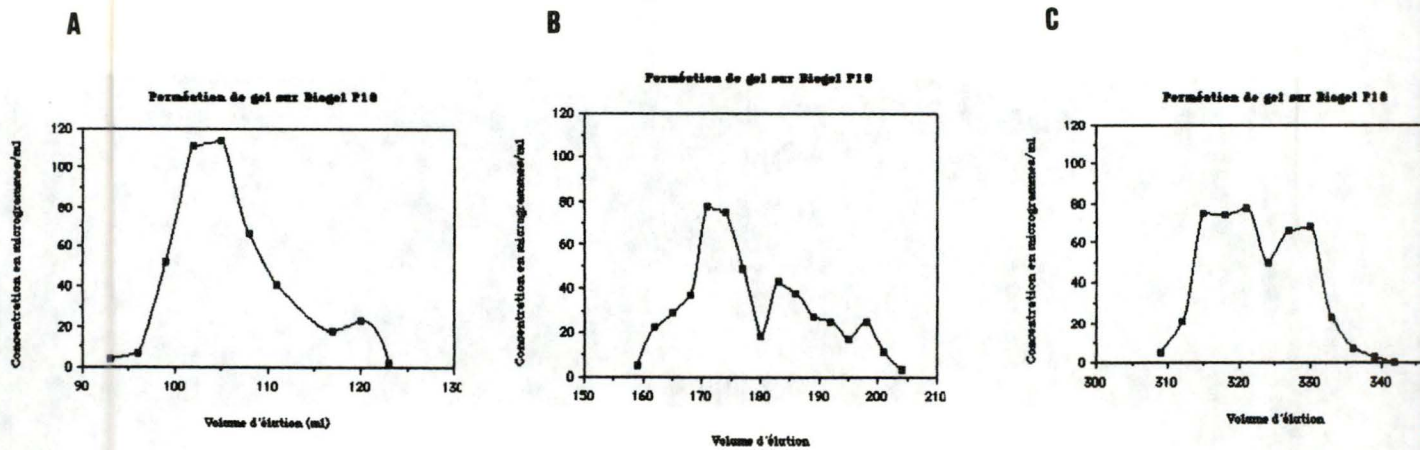


Fig 4.19 Dosages des oses neutres par la méthode de Dubois des fractions positives à l'orcinol sulfurique d'un lot de chaînes latérales digérées 20 heures à l'endopolygalacturonase et chromatographié sur une colonne de BP10 (Biorad).

- (A) la fraction CL1 est éluée au volume mort de la colonne (115 ml) ;
- (B) la fraction CL2 est éluée vers 170 ml ;
- (C) la fraction CL3 est éluée vers 320 ml ;

Polysérum des souris immunisées en intrasplénique

Le résultat de ce dernier test doit être pris avec certaines précautions : la réponse observée est très faible, comparativement au résultat obtenu pour les souris immunisées par voie intrapéritonéale, et peut-être le résultat du mode de rappel : suite aux infections, celui-ci a été effectué par injection intrapéritonéale. On peut se demander si ce dernier rappel ne joue pas le rôle d'une immunisation primaire, les immunisations intraspléniques n'ayant pu amener une réponse anticorps primaire (photo 4.3).

4.4.3 Tests sur la reconnaissance du polysérum et la structure de l'antigène

4.4.3.1 Séparation de l'antigène sur Biogel P10 (biorad)

Un lot de chaînes latérales, isolées comme décrit ci-dessus par échanges d'anions et β -élimination, a été chromatographié sur Biogel P10. L'ensemble des polysaccharides a quitté le gel au volume mort de la colonne (115 ml) (Photo XX). Ces polysaccharides n'étaient pas reconnus par un anticorps dirigé contre la pectine acide (cfr 4.4.3.3).

Après une digestion de 20 heures par une endopolygalacturonase (sigma) et une nouvelle chromatographie sur Biogel P10, nous avons récupéré trois fractions appelées CL1 (chaînes latérales 1), CL2 et CL3 (photo 4.5). Le fait qu'une séparation après digestion ait été possible, indique la présence de fragments d'acides homopolygalacturoniques résiduels, qui toutefois n'étaient pas reconnu par un anticorps anti-pectine acide.

Les trois échantillons ont été dérivés en triméthylsilyls afin de déterminer leur composition en monosaccharide.

Composition des échantillons CL1, CL2 et CL3

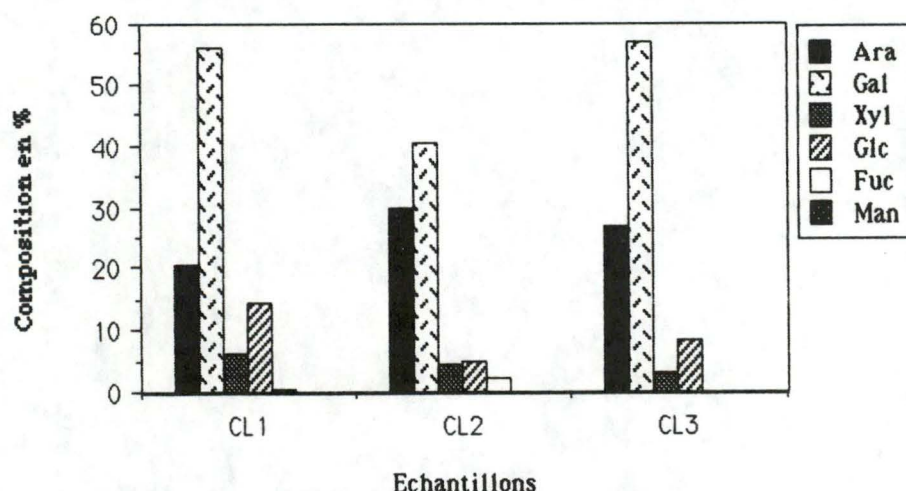
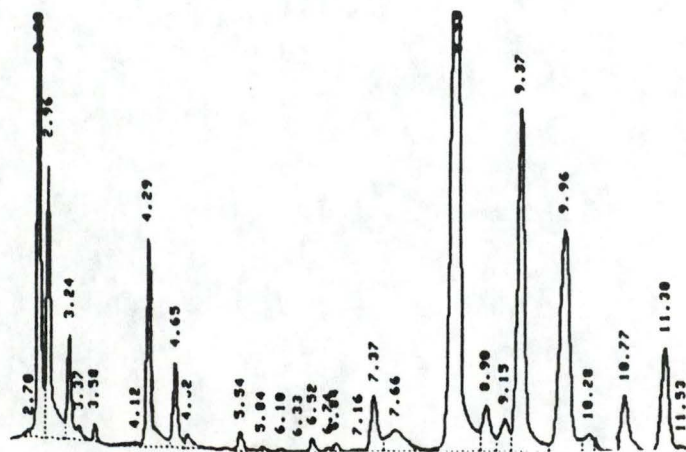
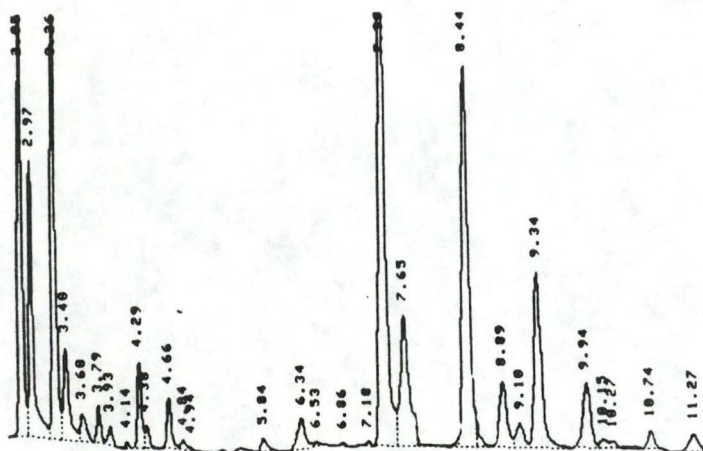


Fig 4.20 Histogramme de la composition en sucre des trois échantillons séparés sur Biogel P10 après digestion à l'EPG.



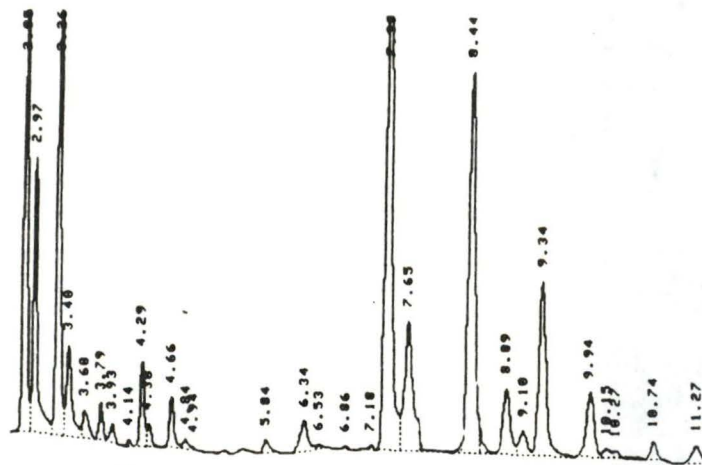
Time	Area	Height	Conc.	Name
2.83	269156	89444	6.6237	Ara
2.96	166643	41159	4.1010	Ara
3.24	63255	15261	1.5567	Rha
3.37	2525	915	0.0621	Rha
3.58	7512	2489	0.1849	Fuc
4.29	115926	30427	2.8529	Xyl
4.65	115926	12438	1.3681	Xyl
4.82	12207	1907	0.3004	N. I.
5.54	12227	2535	0.3009	N. I.
6.52	9552	1852	0.2351	N. I.
6.84	6031	1127	0.1484	N. I.
7.37	50529	7991	1.2435	GalUA
7.66	52321	2972	1.2876	Gal
8.51	916253	129732	22.5483	Gal
8.90	54497	6522	1.3411	GalUA
9.15	39000	4536	0.9597	GalUA
9.37	348003	49518	8.5641	Gal
9.96	308510	32121	7.5922	Glc
10.29	19130	2434	0.4708	N. I.
10.48	63934	6231	1.5734	Glc
10.77	64728	8084	1.5929	N. I.
11.31	108956	15107	2.6813	Gal
11.53	6721	802	0.1654	N. I.
17.89	718523	76446	17.6823	Inositol

Fig 4.21 Chromatogramme et tableau des dérivés TMS de l'échantillon CL1.



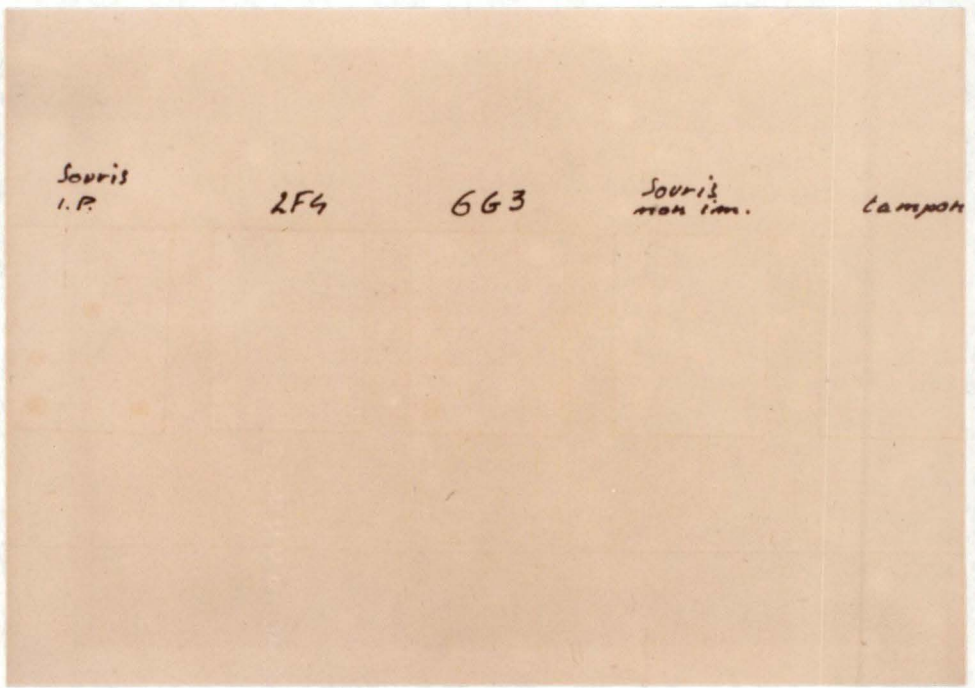
Time	Area	Height	Conc.	Name
2.85	124527	42204	7.6584	Ara
2.97	75072	19987	4.6170	Ara
3.26	122219	38216	7.5164	Rha
3.40	33248	6689	2.0447	Rha
3.60	10993	2055	0.6760	Fuc
3.79	8567	2720	0.5269	N. I.
3.93	5428	1416	0.3338	Fuc
4.29	22635	6293	1.3921	Xyl
4.38	5751	1629	0.3537	N. I.
4.66	15241	3787	0.9373	Xyl
4.84	3634	734	0.2235	N. I.
5.84	5301	1009	0.3260	N. I.
6.34	15349	2266	0.9802	GalUA
6.53	1723	310	0.1060	N. I.
7.39	236191	41404	14.5258	GalUA
7.65	71476	9484	4.3958	Gal
8.44	167564	27703	10.3052	Gal
8.89	32386	4915	2.0194	GalUA
9.10	12548	1806	0.7717	GalUA
9.34	81352	12660	5.0031	Gal
9.94	33855	4835	2.0821	Glc
10.15	4243	671	0.2610	N. I.
10.27	2780	527	0.1710	N. I.
10.74	7668	1328	0.4716	Glc
11.27	10218	1265	0.6284	Gal
17.86	98665	79399	21.3763	Inositol

Fig 4.22 Chromatogramme et tableau des dérivés TMS de l'échantillon CL2.



Time	Area	Height	Conc.	Name
2.85	124527	42204	7.6584	Ara
2.97	75072	19987	4.6170	Ara
3.26	122219	38216	7.5164	Rha
3.40	33248	6689	2.0447	Rha
3.60	10993	2055	0.6760	Fuc
3.79	8567	2720	0.5269	N. I.
3.93	5428	1416	0.3338	Fuc
4.29	22635	6293	1.3921	Xyl
4.38	5751	1629	0.3537	N. I.
4.66	15241	3787	0.9373	Xyl
4.84	3634	734	0.2235	N. I.
5.84	5301	1009	0.3260	N. I.
6.34	15349	2266	0.9802	GalUA
6.53	1723	310	0.1060	N. I.
7.39	236191	41404	14.5258	GalUA
7.65	71476	9484	4.3958	Gal
8.44	167564	27703	10.3052	Gal
8.89	32386	4915	2.0194	GalUA
9.10	12548	1806	0.7717	GalUA
9.34	81352	12660	5.0031	Gal
9.94	33855	4835	2.0821	Glc
10.15	4243	671	0.2610	N. I.
10.27	2780	527	0.1710	N. I.
10.74	7668	1328	0.4716	Glc
11.27	10218	1265	0.6284	Gal
17.86	98665	79399	21.3763	Inositol

Fig 4.22 Chromatogramme et tableau des dérivés TMS de l'échantillon CL2.



1	2	3
4	5	
7		
10	11	12

Photo 4.6 : Cliché d'un test en dot blot au moyen de divers anticorps afin de déterminer la structure des chaînes latérales.

Les dépôts effectués sont :

- 1/ BSA non méthylée ;
- 2/ Pectine acide ;
- 3/ Pectine estérifiée ;
- 4/ Chaînes latérales ;
- 5/ Chaînes latérales couplées à la BSA méthylée ;
- 7/ Chaînes latérales isolées sur DEAE Sephadex A50 ;
- 10/ CL1 ;
- 11/ CL2 ;
- 12/ CL3 ;

En A/ sérum des souris immunisées contre des chaînes latérales de pectines par voie intrapéritonéale ;

B/ anticorps monoclonal dirigé contre la pectine acide (2F4) ;

C/ anticorps monoclonal dirigé contre une xylane acide type (6G3) ;

D et E/ contrôles négatifs.

4.4.3.2 Reconnaissance par le polysérum des souris immunisées en intrapéritonéale.

Afin de mieux caractériser le polysérum obtenu, nous avons effectué divers dépôts en *dot blot*. Nous avons déposé de la pectine acide, comme contrôle négatif pour s'assurer qu'aucun anticorps ne soit dirigé contre d'hypothétiques oligogalacturonates résiduels. D'autres dépôts ont été effectués à partir des échantillons CL1, CL2 et CL3.

Le polysérum des souris immunisées par voie intrapéritonéale reconnaît tous les dépôts d'antigène, y compris celui des échantillons CL1, CL2 et CL3, mais pas la pectine acide. Nous avons donc bien un sérum dirigé contre les chaînes latérales et/ou contre les points de jonction entre les chaînes latérales et le squelette pectique (photo 4.4, page 44)

4.4.3.3 Reconnaissance par le 2F4

En utilisant l'anticorps 2F4, spécifique pectines acides, nous avons essayé de vérifier la présence éventuelle de fragments pectiques importants sur les chaînes latérales isolées. Ce test a été effectué en *dot blot* de la même façon que précédemment, si l'on excepte que les dépôts ont été déstérifiés avant la saturation.

Le résultat de ce test s'est révélé négatif : le 2F4 ne reconnaît pas l'antigène polysaccharidique isolé, alors qu'il reconnaît le dépôt de pectine acide. (Photo 4.6)

4.4.3.4 Reconnaissance par le 6G3

Le 6G3 est un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope d'une xylane acide type comportant essentiellement du glucose et du galactose (Messiaen, 1989). Cet anticorps ne reconnaît aucun épitope parmi les échantillons déposés (Photo 4.6)

4.5 Discussion générale concernant le polysérum obtenu

L'injection de chaînes latérales de pectines couplées à la BSA méthylée et de l'adjuvant de Freund par voie intrapéritonéale est donc un moyen d'induire la réponse anticorps. Sur les 4 types d'immunisation employés, c'est par cette méthode que nous avons obtenu une réponse satisfaisante à la stimulation antigénique. Les tests nous ont révélé la présence d'anticorps dès le premier rappel.

La méthode d'immunisation par injection intrapéritonéale présente de nombreux avantages par rapport à la méthode intrasplénique. Elle est aisée, rapide et efficace, ne demande pas d'anesthésie du sujet que l'on veut immuniser et présente des risques d'infections moindres.

Le polysérum du lot de souris répondant positivement contient des anticorps dirigés contre les chaînes latérales et/ou contre les points d'accrochage des chaînes latérales au squelette rhamnogalacturonane.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La mise au point d'une stratégie de production d'anticorps contre des chaînes latérales de pectines natives était le but du travail entrepris. Nous avons donc tenté d'isoler les chaînes latérales à partir du surnageant de cellules en suspension puis testé différents couplages du polysaccharide en vue d'immuniser des souris contre cet antigène.

L'isolement du polysaccharide a été effectué à partir de la fraction pectique du surnageant séparé sur une colonne échangeuse d'anions et β -éliminée. Deux types de gels échangeurs d'anions ont été utilisés. Le gel QAE Sephadex A25 a permis, après β -élimination l'isolement de chaînes latérales contenant du rhamnose, du galactose, de l'arabinose, du xylose, du glucose et des traces de fucose. Le gel DEAE Sephadex A50 fournit, quant à lui, un polysaccharide de composition comparable mais contenant plus de fucose et des traces de mannose. Ces deux sucres neutres entrent dans la composition des chaînes latérales arabinogalactanes de type I (Massiot et Thibault, 1989).

Plusieurs techniques d'immunisations ont été envisagées. L'injection par voie intrapéritonéale du mélange adjuvant de Freund-complexe (BSA méthylée-polysaccharide) s'est avérée efficace. Le polysérum obtenu contenait des anticorps dirigés contre les chaînes latérales et ne reconnaissait pas la pectine acide.

Au terme de ce travail, diverses applications sont possibles. Une analyse plus approfondie (par méthylation, RMN) des chaînes latérales nous permettrait de caractériser les liaisons présentes. Une comparaison avec la composition des chaînes latérales décrites par Thibault et Massiot serait intéressante.

Une seconde application serait d'envisager une production monoclonale contre les chaînes latérales de pectines. Ces anticorps permettraient une séparation par chromatographie d'affinité et une identification précise des épitopes reconnus. Ils fourniraient un outil de marquage immunocytochimique, complémentaire du 2F4 déjà produit au laboratoire en vue de localiser les zones hérissées.

Ces anticorps monoclonaux permettraient aussi l'étude de la cinétique de dépôt de ce type polysaccharide lors de la croissance et la différenciation, du turn-over des pectines, du comportement des pectines lors de l'interaction hôte-pathogènes, ces derniers étant la plupart du temps producteurs de pectinases et autres macérases.

Références bibliographiques

1. Albersheim, P. and Darvill, A. (1985)
Les oligosaccharines.
Pour la Science 11 : 18-26
2. Ashwell, G. (1978)
Carbohydrate antigens : Coupling carbohydrates to protein mixed anhydride reaction.
Methods in enzymology 50 : 219-222
3. Bacic, A., Harris, P. J. and Stone, B. A. (1988)
Structure and function of the plant cell walls.
The biochemistry of plant 14 : 297-419
4. Berzofsky J.A. (1988)
Structural basis of antigen recognition by T-Lymphocyte.
The journal of clinical investigation 82 : 1811-1817
5. Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1988)
Biosynthesis and secretion of plant cell walls polysaccharides.
Current Topics in Plant biochemistry and physiology 7 : 112-133
6. Cartier, N. (1986)
Les polysaccharides de la paroi primaire des cellules de *Rubus fruticosus* cultivées en suspensions. Intervention des polyosidases endogènes dans le réarrangement au cours de la croissance.
Thèse, Université scientifique technologique et médicale de Grenoble (France)
7. Clark M.F., Lister R.M. and Bar Joseph M. (1986)
ELISA Techniques.
Methods in Enzymology 118 : 743-766
8. DeFranco, A. L. (1987)
Molecular aspects of B-lymphocyte activation.
Ann. Rev. Cell Biol. 3 : 143-178

9. Delmer, D. B. and Stone, B. A. (1988)
Biosynthesis of plant cell walls.
The biochemistry of plants 14 : 373-420
10. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. (1956)
Colorimetric method for détermination of sugars and related substances.
Analytical Chemistry 28 : 350-356
11. Fry S.C. (1983)
Feruloylated pectins from primary cell wall : their structure and possible functions.
Planta 157 : 111-123
12. Fry S.C. (1988)
The growing plant cell wall : chemical and metabolic analysis.
Longman Scientific & Technical
13. Golub, E. S. (1976)
The cellular basis of the immune response. An approach to immunobiology.
SINAUER, : 79-100
14. Guillon, F. and Thibault, J. F. (1989)
Enzymic hydrolysis of the "hairy" fragementes of sugar-beet pectins.
Carbohydrate Research 190 : 97-108
15. Guillon, F. and Thibault, J.F.(1989)
Methylation analysis and mild acid hydrolysis of the "hairy" fragments of sugar beet pectins.
Carbohydrate Research 190 : 85-96
16. Jarvis, M. C. (1984)
Structure and properties of pectin gels in plant cell walls.
Plant, Cell and Environment 7 : 153-164
17. Kohn, R. and Luknar, O. (1977)
Intermolecular calcium ion binding on polyuronates-polygalacturonates and polyguluronates.
Collection Czechošlov. Chem. Commun. 42 : 731-744

18. Larsson, A. and Nilsson, B. O. (1988)
Immunisation with nanogram quantities of nitrocellulose-bound antigen, electroblotted from Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide gels.
Scand. J. Immunol. **27** : 305-309
19. Liners F., Letesson J.J., Didembourg C. and Van Cutsem P. (1989)
Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium.
Plant physiol. **91** : 1419-1424
20. Liners, F. (1988)
Production et caractérisation d'anticorps poly ou monoclonaux contre l'acide α (1-4) homopolygalacturonique.
Mémoire 2ème Licence en sciences biologiques FUNDP
21. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis Farr A. and Rendall R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. **193** : 265-275
22. Massiot, P., Rouau, X. and Thibault, J. F. (1987)
Characterization of plant cell wall polysaccharides of carrot.
Food Hydrocolloids **1** : 541-544
23. Massiot, P., Rouau, X. and Thibault, J.F. (1988)
Characterization of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of carrot.
Carbohydrate Research **172** : 229-242
24. Massiot, P. and Thibault, J. F. (1989)
Enzymic analysis of carrot cell-wall polysaccharides.
Carbohydrate Research **190** : 121-136
25. Mc Neil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C. and Albersheim, P. A. (1984)
Structure and function of the primary cell walls of plants.
Ann. Rev. Biochem. **53** : 625-663

26. Messiaen J. (1989)
Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre une xylane du surnageant de culture en suspension de *Silene alba*.
Mémoire de 2ème Licence en sciences biologiques FUNDP
27. Mond J.J., Hunter K., Kenny J.J., Frinkelman F. and Witherspoon K. (1989)
 δ -Mercaptoguanosine-mediated enhancement of in vivo IgG1, IgG2 and IgG3 antibody response to polysaccharide antigens in normal and *xid* mice.
Immunopharmacology 18 : 205-212
29. Moore P.J., Darvill A.G., Albersheim P. and Staehelin L.A. (1986)
Immunogold localization of xyloglucan and rhamnogalacturonan I in the cell wall of suspension cultured sycamore cells.
Plant Physiol. 82 : 787-794
29. Nilsson B. O. and Larsson A. (1990)
Intrasplenic immunization with minute amounts of antigen.
Immunology Today 11 : 10-13
30. Nilsson B. O., Svalander P.C. and Larsson A. (1987)
Immunization of mice and rabbits by intrasplenic deposition of nanogram quantities of protein attached to Sepharose beads or nitrocellulose paper strips.
J. Immunol. Methods 99 : 67-75
31. Northcote D.H. (1985)
Control of the cell wall formation during growth. Biochemistry of the plant cell wall.
Societies for experimental biology 28 177-197
C.T. Brett and S.R. Hillman Eds
- 32 Pazur J.H. (1986)
Neutral polysaccharides.
Carbohydrates analysis, a practical approach 55-96
M.F. Chaplin and J.F. Kennedy Eds

33. Rees, D. A. (1977)
Polysaccharides shapes.
Outline studies in biology 49
Chapman and Hall
34. Rees, D. A. and Wight, A. W. (1971)
Polysaccharide conformation
Part VII. Model building conformation for an α 1-4
galacturonan and the kinking function of the L-rhamnose
residues in pectic substances.
J. Chem. Soc. 13 : 1366-1372
35. Roitt I., Brostoff J. and Male D. (1989)
Immunologie fondamentale et appliquée.
MEDSI / Mc GRAW HILL (2nd Ed.),
36. Roland J.C. (1987)
General preparation and staining of thin sections.
Electron Microscopy and cytochemistry of plant cells
J.L. Hall
37. Saulnier, L. (1987)
Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de
raisin (Carignan rouge).
Thèse : université Paul Sabatier 193
38. Stevenson, T. T., McNeil, M., Darvill A.G. and Albersheim, P. (1986)
Structure of plant cell walls XVIII.
An analysis of the extracellular polysaccharides of
suspension cultured sycamore cells.
Plant Physiology 80 : 1012-1019
39. Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W. W. (1963)
Gas-liquid chromatography of Trimethylsilyl derivatives of
sugars and related substances.
J. Am. Chem. Soc. 85 : 2497-2507
40. Thibault J.F. (1983)
Etude structurale de substances pectiques à l'aide d'une
endopolygalacturonase d' *Aspergillus niger* : purification,
propriétés et possibilités d'utilisation de cette enzyme.
Thèse, Unité de biochimie macromoléculaire de l'université de
Nantes (France)

41. Tijssen, P. (1985)
Practice and theory of enzyme immunoassays.
Elsevier
42. De Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J. and Pilnick, W.
(1983)
Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances.
Carbohydrates polymers 3 : 245-258
43. Weir, D. W. (1981)
Immunologie : les bases fondamentales et cliniques.
MEDSI
44. York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Stevenson, T. T. and
Albersheim, P. (1986)
**Isolation and characterization of plant cell walls and cell
wall components.**
Methods in enzymology 118 : 3-40
45. Zrijd J.P. (1988)
Cultures de cellules, tissus et organes végétaux.
Fondements théoriques et utilisations pratiques.
Presses Polytechniques Romandes