

50376
1990
33

N° d'ordre 482

69194

50376
1990
33

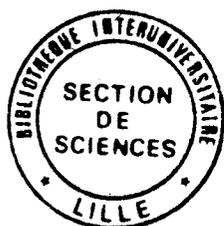
T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LILLE FLANDRES-ARTOIS

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE



par

Bernard PRIEM

CONTRIBUTION A L'ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE
D'OLIGOSACCHARIDES VEGETAUX :
LES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES ET LES OLIGOSACCHARIDES
EXTRACELLULAIRES DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE
(Silene alba (Miller) E.H.L. Krause)



Présentée le 23 janvier 1990 devant la Commission d'Examen :

Président	: MONTREUIL J.,	Professeur à l'Université de Lille
Rapporteurs	: JOSELEAU J.P.,	Professeur à l'Université de Grenoble
	STRECKER G.,	Directeur de Recherche, CNRS, Lille
Examineurs	: FOURNET B.,	Professeur à l'Université de Lille
	JOUANNEAU J.P.,	Directeur de Recherche, CNRS, Gif/Yvette
	MORVAN H.,	Maître de Conférences à l'Université de Lille

R E M E R C I E M E N T S

- o O o -

Ce travail a été réalisé au sein de l'Equipe Polysaccharides Pariétaux des Végétaux (EPPV), laboratoire de Recherche de l'Université de Lille Flandres-Artois, sous la direction de Monsieur Henri MORVAN.

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur Henri MORVAN, Maître de Conférences et responsable de l'EPPV, pour m'avoir confié ce travail sur les oligosaccharides végétaux et pour la confiance qu'il m'a témoigné. Son sens critique et son aide ont beaucoup contribué à la réalisation de ce manuscrit. Je lui suis également reconnaissant pour m'avoir initié aux règles de fonctionnement d'un groupe basées sur la concertation collective.

J'exprime ma plus profonde gratitude à Monsieur Jean MONTREUIL, Professeur à l'USTL Flandres-Artois et Directeur du laboratoire de Chimie Biologique. Les composantes technologiques et humaines de la Biochimie lilloise dans le domaine des glucides lui doivent beaucoup, sans elles ce travail aurait été lourdement handicapé. De plus, je le remercie pour les conseils qu'il m'a apporté.

Cette Thèse illustre en partie l'engagement de l'EPPV dans l'action nationale concertée sur le thème des oligosaccharides végétaux. La présence de Monsieur Jean-Paul JOSELEAU, Professeur à l'Université de Grenoble et co-responsable de ce programme, est pour moi un honneur. Je le remercie d'avoir accepté le titre de Rapporteur, ses critiques seront des plus précieuses.

Je remercie Monsieur Gérard STRECKER, Directeur de Recherche CNRS au laboratoire de Chimie Biologique, pour avoir accepté de rapporter ce travail, mais également pour avoir fait partager ses compétences dans la séparation

et l'identification par RMN des oligosaccharides. J'en profite pour remercier la participation de Messieurs Jean-Michel WIERUZESKI et Jean-Claude MICHALSKI, ainsi que tous les membres de son équipe de Recherche.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Bernard FOURNET, Professeur à l'USTL Flandres-Artois, pour avoir accepté de participer au Jury. La progression de l'EPPV dans le domaine de l'analyse des sucres doit beaucoup aux compétences de son équipe de Recherche. Je remercie au passage Messieurs Yves LEROY et Philippe TIMMERMAN pour leurs nombreux conseils et pour leur gentillesse.

Je remercie Monsieur Jean-Pierre JOUANNEAU, Directeur de Recherche CNRS à Gif-sur-Yvette, pour avoir accepté de faire partie de ce Jury, et par la même de faire partager sa grande maîtrise de la physiologie des suspensions cellulaires.

La qualité des tableaux et des figures est due à l'aide de Mademoiselle Marie-Claire VERDUS, Chargée de Recherche au CNRS à l'EPPV. Je la remercie particulièrement pour ce geste et pour son dévouement au fonctionnement de notre équipe. De plus, je lui suis reconnaissant pour sa participation aux travaux de microscopie électronique.

J'exprime ma reconnaissance à Messieurs Guy RICART et Yves LEROY pour leur sympathie et leur disponibilité dans la réalisation des analyses de spectrométrie FAB-MS.

Je dois ma première expérience de recherche à l'encadrement de Monsieur Philippe DEBEIRE, Chargé de Recherche à l'INRA de Villeneuve d'Ascq. Son encouragement et son aide ont été constants tout au long de mon travail de Thèse. Qui plus est, il a su me faire partager le goût d'un travail bien fait. Je lui exprime ici ma reconnaissance en lui dédiant ce manuscrit, aussi modeste soit-il. Je remercie aussi tout le personnel de l'INRA, qui m'a toujours réservé un excellent accueil lors de mes nombreux passages impromptus.

Une partie de ce travail a été réalisée au laboratoire de Biotechnologie théorique de Namur. Je remercie Monsieur Pierre VAN CUTSEM, Professeur et responsable de ce laboratoire, pour m'avoir permis la réalisation de ce stage et pour les discussions fertiles qui ont favorisé la progression des résultats. Je remercie également Françoise LINNERS pour sa sympathique collaboration ainsi que Albert et Dominique CHARLIER pour m'avoir fait apprécier le savoir-vivre Belge.

Je remercie les laboratoires de Monsieur Bernard FRITIG (Strasbourg) et de Madame Marie-Thérèse ESQUERRE-TUGAVE (Toulouse) pour avoir réalisé les tests biologiques des oligosaccharides préparés au laboratoire. Ces remerciements s'adressent aussi aux personnels contributaires, cités dans le manuscrit.

Je remercie Monsieur Jean-François THIBAUT, Directeur de Recherche à l'INRA et responsable du laboratoire de Technologie des glucides de Nantes, pour m'avoir accepté avec un collègue en stage d'initiation aux techniques de méthylation des polysaccharides pectiques. Ces remerciements s'adressent également à Patrice ROUAUX pour son aide en temps qu'animateur de ce stage.

Je remercie Claudine MORVAN, Chargée de Recherche CNRS au SCUOR de Rouen, pour ses conseils et sa collaboration enthousiaste.

La pleine réalisation de ce travail a été possible grâce à la contribution d'Hassan NAZIH et Françoise MARGA dans le cadre de leur DEA et d'Anne-Chantal DECLERCK, technicienne au laboratoire. Je leur adresse mes plus vifs remerciements.

Mon expérience de Thèse s'est accompagnée d'une acquisition et d'une mise au point de nouvelles techniques, ce qui a constitué un investissement considérable. La participation et la persévérance de Julien SOLO-KWAN, étudiant au laboratoire, y sont pour beaucoup. Je l'en remercie ainsi que pour les très nombreuses discussions que nous avons eues à propos de nos travaux respectifs.

Je remercie Monsieur Daniel CHRISTIAEN, Chargé de Recherche CNRS, ex-membre de l'EPPV et actuel Directeur de PRONATEC, entreprise agro-alimentaire. En plus de l'aide qu'il m'a apporté, son dynamisme et sa perspicacité m'ont beaucoup appris.

Je remercie Monsieur Yannis KARAMANOS pour ses conseils et sa disponibilité ainsi que Mesdemoiselles Véronique CANDELIER et Fabienne BELLANGER pour l'aide des plus charmante qu'elles m'ont apporté.

Je salue la participation efficace et sympathique de Madame Paule DANNOOT et de Monsieur Jean DELVINQUIER dans l'entretien des locaux et du matériel.

Je remercie Madame Michèle DELECOURT pour avoir accepté de réaliser la frappe de ce manuscrit ainsi que Monsieur Robert KLING, Maître de Conférences au laboratoire, pour ses remarques pertinentes.

Enfin, merci à mes Parents et Amis qui m'ont soutenu tout au long de ce travail.

S O M M A I R E

- 0 0 0 -

INTRODUCTION	1
GENERALITES	
I. - LES OLIGOSACCHARIDES PECTIQUES	3
A. - <u>Source : la matrice pectique</u>	3
1 - Données structurales	3
2 - Propriétés physicochimiques	6
B. - <u>Origine : les activités pectinasiques</u>	6
C. - <u>Propriétés biologiques des oligogalacturonates</u>	9
1 - Signaux de défense	9
2 - Effets de la taille	9
3 - Effets morphogénétiques	10
4 - Mécanisme d'action moléculaire	10
5 - Effets chélateurs	11
II. - OLIGOSACCHARIDES DE XYLOGLUCANES	13
A. - <u>Source : la matrice xyloglucanique pariétale</u>	13
1 - Données structurales	13
2 - Rôle biologique	15
B. - <u>Origine : les activités hydrolasiques</u>	15
C. - <u>Propriétés biologiques</u>	16

III. - OLIGOSACCHARIDES DES PROTEINES N-GLYCOSYLEES	16
A. - <u>Source : les protéines végétales N-glycosylées</u>	17
1 - Données structurales	17
2 - Rôles biologiques	19
B. - <u>Origine</u>	22
1 - Biosynthèse des glycoprotéines	22
2 - Les activités protéolytiques	22
C. - <u>Propriétés biologiques</u>	23

R E S U L T A T S

1ère partie : PREPARATION, CARACTERISATION ET PROPRIETES DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES

I. - PREPARATION DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES	26
A. - <u>Purification d'une endopolygalacturonase</u>	26
B. - <u>Préparation d'un hydrolysat pectique</u>	26
C. - <u>Fractionnement des acides oligogalacturoniques</u>	26
II. - CARACTERISATION DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES ..	29
A. - <u>Estimation du degré de polymérisation</u>	29
B. - <u>Contrôles par spectrométrie de masse (FAB-MS)</u>	29
C. - <u>Etude de la méthanolyse</u>	31
1 - Etalonnage de la colonne	31
2 - Rendement de méthanolyse	33
III. - CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES	36
A. - <u>Test ELISA de fixation de l'antigène</u>	36
1 - Description du test	36
2 - Résultats	37

B. - <u>Mise au point et validation du test d'inhibition</u>	38
1 - Description du test	38
2 - Résultats	38
 IV. - EFFETS DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES SUR LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE	 43
A. - <u>Etude cinétique de la croissance et de la composition des exopolysaccharides</u>	43
1 - Mise en évidence d'une baisse de croissance	43
2 - Variation de la fraction polysaccharidique extracellulaire	45
B. - <u>Modification de l'excrétion des polymères pectiques acides</u>	48
1 - Recherche d'une dose efficace	48
2 - Etude quantitative de l'excrétion des EPS neutres et acides	48
3 - Variation de la productivité et de la composition des EPS acides	51
4 - Influence du degré de polymérisation des acides oligogalacturoniques	54
5 - Action des acides oligogalacturoniques sur des parois isolées	54
 V. - EFFETS DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES SUR D'AUTRES MODELES BIOLOGIQUES	 57
A. - <u>Tests d'élicitation sur le modèle tabac/virus de la mosaïque</u>	57
1 - Protection virale	59
2 - Marqueurs biochimiques de l'élicitation	59
B. - <u>Test d'élicitation sur l'hypocotyle de haricot</u>	59

**2ème partie : LES OLIGOSACCHARIDES DE LA SUSPENSION
CELLULAIRE DE SILENE ALBA. ISOLEMENT ET
CARACTERISATION BIOCHIMIQUE**

I. - MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION PARTIELLE D'OLIGOSACCHARIDES NATIFS EXTRACELLULAIRES	66
A. - <u>Isolement d'une fraction non précipitante à partir du milieu de culture</u>	66
B. - <u>Tamisage moléculaire Séphacryl S200</u>	66
C. - <u>Electrophorèse sur papier</u>	67
D. - <u>Chromatographie préparative sur papier</u>	70
E. - <u>Conclusion</u>	74
 II. - CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES ACIDES	 75
A. - <u>Chromatographie sur couche mince</u>	75
B. - <u>Méthylation, CPG-MS</u>	75
C. - <u>Conclusion</u>	78
 III. - PURIFICATION ET CARACTERISATION DES AUTRES OLIGOSACCHARIDES NATIFS	 78
A. - <u>Obtention de la fraction oligosaccharidique neutre</u>	78
1 - <u>Précipitation éthanolique de la fraction polysaccharidique</u>	78
2 - <u>Chromatographie sur Séphadex G10</u>	78
3 - <u>Electrophorèse sur papier</u>	81
B. - <u>Purification des oligosaccharides neutres majoritaires</u>	81
1 - <u>Chromatographie sur Biogel P2</u>	81
2 - <u>H.P.L.C. (HW 40)</u>	84
C. - <u>Caractérisation fine des oligosaccharides purifiés</u>	86
1 - <u>Dérivés partiellement méthylés et acétylés</u>	86
2 - <u>Spectroscopie RMN</u>	89
3 - <u>Spectrométrie FAB-MS</u>	92

a) <u>Oligosaccharide C</u>	92
b) <u>Oligosaccharide D</u>	92
c) <u>Oligosaccharide E</u>	95
D. - <u>Conclusion</u>	99
IV. - ETUDE CINETIQUE DE LA PRODUCTION DES OLIGO- ET XYLOMANNOSIDES	99
A. - <u>Oligosaccharides extracellulaires totaux</u>	101
1 - Aspect quantitatif	101
2 - Aspect qualitatif	101
B. - <u>Substrat carboné</u>	103
C. - <u>Protéines</u>	106
1 - Protéines totales	108
2 - Protéines solubles intracellulaires	108
D. - <u>Recherche d'activités enzymatiques</u>	108
1 - Méthodologie d'extraction	108
2 - Mise en évidence d'une activité endo- β - acetylglucosaminidasiq ("ENGasiq")	110
3 - Evaluation de l'activité ENGasiq	110
4 - Spécificité vis-à-vis d'autres substrats	113
E. - <u>Observations en microscopie électronique</u>	113
F. - <u>Conclusion</u>	113
DISCUSSION GENERALE	117
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136

A N N E X E S

Fiche technique n°1 :	
Purification d'une endopolygalacturonase	148
Fiche technique n°2 :	
Purification d'acides oligogalacturoniques	150
Fiche technique n°3 :	
Utilisation des anticorps monoclonaux anti-pectiques	151
Fiche technique n°4 :	
Culture de la suspension cellulaire de Silène et évaluation de la croissance	153
Fiche technique n°5 :	
Parois et extraits cellulaires	154
Fiche technique n°6 :	
Isolement et fractionnement des exopolysaccharides	155
Fiche technique n°7 :	
Dosage des réserves glucidiques cellulaires	156
Fiche technique n°8 :	
Cytochimie	157
Fiche technique n°9 :	
Détermination des rapports molaires en monosaccharides	159
Fiche technique n°10 :	
Méthylation des oligosaccharides	161
Fiche technique n°11 :	
Spectrométrie de masse	163
Fiche technique n°12 :	
RMN 400 MHz du proton	164
Fiche technique n°13 :	
Chromatographies sur couche mince	165
Fiche technique n°14 :	
Chromatographie et électrophorèse sur papier	166

T A B L E D E S F I G U R E S

- 0 0 0 -

Figure 1 - Constituants majeurs des polysaccharides pectiques	4
Figure 2 - Structure générale de pectines	5
Figure 3 - Chélat de pectate de calcium	7
Figure 4 - Association en "egg-box" des polyguluronates avec le calcium	7
Figure 5 - Relation entre le coefficient d'activité calcique et la taille des fragments pectiques	12
Figure 6 - Relation entre le degré d'association des cations divalents (β) et la taille des oligosaccharides	12
Figure 7 - Structures possibles de xyloglucanes d'origines diverses ...	14
Figure 8 - Structures proposées pour le polysaccharide et l'heptasaccharide présents dans l'hydrolysate de xyloglucane préparé au moyen d'une endo- β -1,4 glucanase	14
Figure 9 - Exemples de structures glycaniques de protéines végétales N-glycosylées	18
Figure 10 - Etapes de transformation d'un oligomannoside en xylomanoside	20
Figure 11 - Voies d'évolution des glycannes en cours de biosynthèse selon la localisation au sein de la protéine	21
Figure 12 - Différentes voies hypothétiques de dégradation des glycannes des protéines N-glycosylées	24
Figure 13 - Profil HPLC de l'hydrolysate pectique préparé par digestion enzymatique	28
Figure 14 - Séparation des oligogalacturonates sur Dowex 1 x 2/HCOO ⁻	28

Figure 15 - FAB-MS, mode négatif des acides hexa- et heptagalacturonique	30
Figure 16 - Fragmentations par FAB-MS de l'acide heptagalacturonique	32
Figure 17 - Chromatogrammes des dérivés TFA, sur colonne DB 210, injecteur à précolonne Shimadzu	34
Figure 18 - Inhibition de la reconnaissance de l'acide pectique par les anticorps monoclonaux antipectine en présence de fragments pectiques	39
Figure 19 - Influence de l'hexagalacturonate et d'une endopolygalacturonase sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène	46
Figure 20 - Evolution de la matière fraîche au cours du cycle de culture	50
Figure 21 - Evolution de la productivité et de la composition molaire des EPS acides	52
Figure 22 - Influence du degré de polymérisation des oligogalacturonates sur l'excrétion des exopolysaccharides acides	55
Figure 23 - Activités hydrolasiques, chitinase et β -1,3 glucanase	58
Figure 24 - Métabolisme des phénylpropanoïdes, activités O-méthyl-transférase et phénylalanine-ammonialyase	60
Figure 25 - Profil d'élution de la chromatographie-tamissage moléculaire sur Séphadex S200 de la fraction non précipitante	68
Figure 26 - Chromatographie sur papier des fractions F'NRa et F'NRn	71
Figure 27 - Estimation du degré de pureté, sur couche mince, des oligosaccharides purifiés par chromatographie sur papier	72
Figure 28 - Identification de l'oligosaccharide (1-1) par comparaison des Rf avec l'acide digalacturonique et l'acide galacturonique	76
Figure 29 - CPG-MS de l'oligosaccharide majeur de la fraction FNRA, après réduction (KBH_4) et perméthylation, et molécule proposée sur la base des fragmentations en impact électronique et de l'ion moléculaire ($\text{M} + \text{NH}_4^+$) identifié en impact chimique	77
Figure 30 - Protocole de purification des oligosaccharides neutres du milieu extracellulaire	79

Figure 31 - Profil d'éluion de la fraction oligosaccharidique neutre F5	82
Figure 32 - Spectres RMN 400 MHz du proton et identification des déplacements chimiques des oligosaccharides purifiés des fractions C et D	90
Figure 33 - FAB-MS, mode positif, des oligomannosides C et D, de $(M + Na)^+$ respectifs 1523 et 1352	93
Figure 34 - Répartition des masses isotopiques $(M + Na)^+$ du xylomannoside perméthylé C	94
Figure 35 - FAB MS-MS de l'ion moléculaire $(M + H)^+$ 1315,7	96
Figure 36 - Structures possibles du contaminant xyloglucane $(M + H)^+$ 1315,7 présent dans la fraction D	97
Figure 37 - FAB-MS en mode positif de l'oligosaccharide E perméthylé et structure proposée	98
Figure 38 - Analyse par chromatographie sur couche mince de la fraction oligosaccharidique neutre (F5) et des oligosaccharides majeurs purifiés des fractions C et D obtenues par passage sur Biogel P2, après purification par HPLC	100
Figure 39 - Evolution de la fraction oligosaccharidique extracellulaire au cours de la culture de la suspension cellulaire de Silène	102
Figure 40 - Chromatographie sur couche mince des fractions oligosaccharidiques extracellulaires à différents temps de culture	105
Figure 41 - Chromatographie sur couche mince d'un extrait cellulaire, à différents temps de culture	107
Figure 42 - Evolution des protéines totales et solubles par rapport à la croissance cellulaire	109
Figure 43 - Incubation enzymatique des broyats cellulaires en présence du substrat oligomannosidique $Man_5GlcNAc_2Asn$	111
Figure 44 - Cinétique d'activité ENGasique des extraits cellulaires à différents temps de culture	112
Figure 45 - Spécificité d'action de l'activité ENGasique	114
Figure 46 - Ultrastructure des cellules de Silène	115
Figure 47 - Différentes voies de dégradation possible des N-glycoprotéines pouvant être à l'origine des oligosaccharides C et D	129

T A B L E D E S T A B L E A U X

- o o o -

Tableau 1 - Purification de l'endopolygalacturonase de Colletotrichum lindemuthianum	27
Tableau 2 - Estimation des degrés de polymérisation des huit premiers oligosaccharides séparés par chromatographie échangeuse d'anions Dowex 1 x 2/HCOO ⁻	27
Tableau 3 - Relation entre la taille des fragments pectiques et le coefficient de réponse C par rapport à l'érythritol .	35
Tableau 4 - Influence de la dilution des oligogalacturonates et de l'acide pectique sur l'effet d'inhibition de la reconnaissance de l'acide pectique par les anticorps monoclonaux anti-pectine	40
Tableau 5 - Influence des oligogalacturonates et de l'acide pectique sur la désorption de l'acide pectique à différentes concentrations de calcium	42
Tableau 6 - Influence de la quantité et du degré de polymérisation des oligogalacturonates sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène à 14 jours	44
Tableau 7 - Evolution de la quantité d'exopolysaccharides (précipité éthanolique) au cours de la culture en présence de l'acide hexagalacturonique et de l'endopolygalacturonase de Colletotrichum lindemuthianum	47
Tableau 8 - Evolution des rapports molaires des monosaccharides neutres des exopolysaccharides (précipité éthanolique) au cours de la culture en présence de l'acide hexagalacturonique et de l'endopolygalacturonase de Colletotrichum lindemuthianum	47
Tableau 9 - Relation entre la quantité d'oligogalacturonates ajoutés dans le milieu de culture et l'excrétion des exopolysaccharides	49

Tableau 10 - Comparaison des paramètres de croissance des cellules de <i>Silène</i> en présence ou non d'oligogalacturonates dans les milieux de culture	49
Tableau 11 - Comparaison des pourcentages molaires des monosaccharides dans les exopolysaccharides acides, à 12 h et à 14 jours de culture, avec ou sans oligogalacturonates	53
Tableau 12 - Comparaison des quantités d'exopolysaccharides libérés sous l'effet des oligogalacturonates par des cellules (<i>in vivo</i>) et par des parois isolées (<i>in vitro</i>) ...	56
Tableau 13 - Distribution des oses neutres et acides dans les exopolysaccharides libérés par les parois isolées, sous l'action des oligogalacturonates	56
Tableau 14 - Expérience de coinoculation des oligogalacturonates de degré de polymérisation 3 à 8 avec le virus de la mosaïque du tabac	61
Tableau 15 - Injection de l'octagalacturonate dans une moitié de feuille, puis inoculation de la feuille entière avec le virus de la mosaïque du tabac, 24 h plus tard	61
Tableau 16 - Influence du traitement des plants de tabac par les oligogalacturonates de degré de polymérisation 3 à 15 sur l'induction des activités hydrolasiques 24 h après l'injection	62
Tableau 17 - Influence du traitement des plants de tabac par les oligogalacturonates de degré de polymérisation 3 à 15 sur l'induction des activités phénylalanine-ammonialyase et O-méthyltransférase	63
Tableau 18 - Récapitulatif des effets de fragments pectiques et xyloglucanes sur la stimulation de différents marqueurs de défense de l'hypocotyle de haricot	65
Tableau 19 - Distribution pondérale et composition en acides uroniques et en oses neutres des fractions F1, F2, F3 et F4 obtenues par tamisage moléculaire Séphacryl S200 de la fraction non précipitante	69
Tableau 20 - Composition en monosaccharides neutres des fractions après tamisage moléculaire sur Séphacryl S200 .	69
Tableau 21 - Rapports molaires des monosaccharides des fractions F3NRa et F3NRn (1, 2, 3, 4 et sup) après chromatographie sur papier de la fraction F3NR	73
Tableau 22 - Préparation de la fraction oligosaccharidique neutre	80

Tableau 23 - Composition en monosaccharides des fractions A, B, C, D et E obtenues par chromatographie sur Biogel P2 de la fraction oligosaccharidique neutre (F 5) ...	83
Tableau 24 - Rapports molaires des monosaccharides majeurs des fractions C, D et E après purification par HPLC, obtenus par CPG des dérivés acétates d'alditols ...	85
Tableau 25 - Dérivés acétates d'alditols partiellement méthylés issus des oligosaccharides majoritaires des fractions C, D et E	87
Tableau 26 - Déplacements chimiques des régions protoniques des monosaccharides constitutifs des oligosaccharides C et D isolés du milieu extracellulaire et comparaison avec les produits de référence 1 et 2	91
Tableau 27 - Evolution des concentrations des monosaccharides constitutifs de la fraction oligosaccharidique extracellulaire au cours de la culture	104
Tableau 28 - Evolution du substrat carboné dans le milieu et des réserves glucidiques cellulaires au cours de la culture	107
Tableau 29 - Evolution des protéines totales et des protéines cellulaires au cours de la culture	109

ABREVIATIONS

Abs	:	absorbance.
ABTS	:	2,2'-azino-di(3-éthylbenzthiazoline sulfonate).
Ac	:	anticorps.
Ag	:	antigène.
Api	:	apiose.
Ara	:	arabinose.
Asn	:	asparagine.
ATFA	:	acide trifluoroacétique.
AU	:	acides uroniques.
BSTFA	:	bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide.
CCM	:	chromatographie sur couche mince.
CPG	:	chromatographie en phase gazeuse.
DP	:	degré de polymérisation.
ENGase	:	endo- β -N-acétyl-glucosaminidase.
EPGase	:	endopolygalacturonase.
EPS	:	exopolysaccharides.
f (indice)	:	furannose.
FAB-MS	:	fast atom bombardment - mass spectrometry.
Fru	:	fructose.
Fuc	:	fucose.
Gal	:	galactose.
GalAU	:	acide galacturonique.
Glc	:	glucose.
GlcAU	:	acide glucuronique.
GlcNAc	:	N-acétylglucosamine.
Gly ^{ol}	:	glycérol.
HPLC	:	chromatographie liquide haute performance.
HRGP (protéines)	:	glycoprotéines riches en hydroxyproline.
Lac	:	lactose.
Man	:	mannose.
MF	:	masse cellulaire fraîche.

MS	:	masse cellulaire sèche.
NeuAc	:	acide N-acétylneuraminique.
OligoGalAU	:	acides oligogalacturoniques.
O-Me	:	O-méthyle.
OMT	:	O-méthyltransférase.
ON	:	oses neutres.
p (indice)	:	pyrannose.
PAL	:	phénylammonialyase.
PNGase	:	peptide-N ⁴ -(N-acétyl-β-glycosaminy)-asparagine amidase.
PS	:	protéines cellulaires solubles.
PT	:	protéines cellulaires totales.
Rha	:	rhamnose.
Rdt	:	rendement.
RMN	:	résonance magnétique nucléaire.
Sacc	:	saccharose.
SR	:	sucres réducteurs.
ST	:	sucres totaux.
TFA	:	méthylglycosides trifluoroacétylés.
TMS	:	méthylglycosides triméthylsilylés.
VMS	:	virus de la mosaïque du tabac.
Xyl	:	xylose.

I N T R O D U C T I O N

Il est à présent bien établi que les oligosaccharides, d'origine végétale, bactérienne ou fongique, sont capables d'induire toute une gamme de modifications métaboliques relatives aux réactions de défense, à la croissance ou à la morphogénèse. Ces propriétés biologiques remarquables ont conduit ALBERSHEIM (ALBERSHEIM *et al.* 1983) à proposer le terme générique d'oligosaccharines, pour désigner les fragments actifs.

De très nombreux travaux ont été réalisés en vue de reproduire puis de généraliser les effets des oligosaccharides décrits comme agents biologiques. Par contre, les aspects moléculaires de leur mode d'action n'ont pratiquement jamais été abordés. Ces préoccupations ont conduit à un regroupement national, sous la forme d'une action concertée concernant "l'obtention, la structure et les propriétés biologiques des oligosaccharides pariétaux", réunissant plusieurs laboratoires y compris le nôtre, jouissant ainsi d'une certaine synergie d'action.

Aborder ce thème impliquait la préparation, l'isolement et la caractérisation de molécules parfaitement définies, afin de pouvoir les étudier précisément sur le plan biologique.

Parmi les oligosaccharides les plus étudiés se trouvent les acides oligogalacturoniques. Ce sont des molécules provenant naturellement de l'hydrolyse de la matrice pariétale au cours d'infections parasitaires. Ces fragments ont une structure simple et ne diffèrent les uns des autres que par leur taille ou éventuellement par la nature de leur extrémité non réductrice, dépendant elle-même de leur mode d'obtention (hydrolyse ou β -élimination). De plus, leurs propriétés physico-chimiques ont été largement décrites. Les acides oligogalacturoniques seront donc choisis comme premier modèle pour étudier et tenter de mieux comprendre leur mode d'action.

Une fois résolus les problèmes techniques de préparation et de vérification des oligogalacturonates, il est indispensable d'acquérir de nouvelles informations relatives à la conformation spatiale de ces molécules. Dans ce but, une étude originale sera effectuée en faisant appel à une technique immunochimique.

Certains travaux réalisés au laboratoire (MORVAN 1982) ont montré que les polysaccharides pectiques acides excrétés dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de *Silène* modifiaient la croissance des cellules qui les produisaient. Sur la base de ces résultats, l'influence des oligogalacturonates sur la croissance et sur l'excrétion d'exopolysaccharides dans le milieu de culture sera étudiée sur le même modèle biologique. Les effets de ces oligosaccharides sur la matrice pariétale seront également étudiés, au niveau de l'excrétion de matériel pectique, l'importance de la taille des fragments étant prise en considération.

D'autres travaux concernant les propriétés phytoprotectrices, élicitrices de réactions de défense et inductrices de croissance ou de réponses morphogénétiques seront effectués à partir de ces molécules, dans différents laboratoires. Les résultats obtenus seront présentés et discutés sommairement.

Dans une seconde partie de notre travail, nous nous intéresserons à la recherche d'oligosaccharides végétaux produits en l'absence d'organisme pathogène. Il est en effet apparu, très récemment, que certains oligosaccharides pariétaux produits lors de la croissance pouvaient se comporter comme des régulateurs de croissance (FRY *et al.* 1986). La suspension cellulaire de *Silène* constituera notre modèle, pour tenter de mettre en évidence et de caractériser sur le plan structural des espèces oligosaccharidiques, discuter de leur origine, et, à terme, juger de leur importance en temps que régulateurs métaboliques.

Afin de mieux situer l'intérêt des travaux entrepris et le niveau des résultats déjà acquis, l'origine, la structure et les propriétés biologiques des oligosaccharides végétaux endogènes seront présentés dans le préambule bibliographique.

GENERALITES

Les oligosaccharides issus des parois végétales apparentés à la famille des oligosaccharines sont d'une part les fragments pectiques, d'autre part les fragments xyloglucaniques. L'objet de ce chapitre est de présenter les connaissances actuelles s'y rapportant. Un troisième groupe d'oligosaccharides est également décrit ; il s'agit des glycannes issus des protéines N-glycosylées. Bien qu'ils ne soient pas étudiés en tant que facteurs de régulation chez les plantes, ce choix est dû à la place importante que nous leur consacrons dans la partie expérimentale.

Nous ne décrivons pas ici les oligosaccharines issus des organismes pathogènes (β -glucanes, chitosides), ceux-ci ne faisant pas l'objet de notre travail.

I. - LES OLIGOSACCHARIDES PECTIQUES

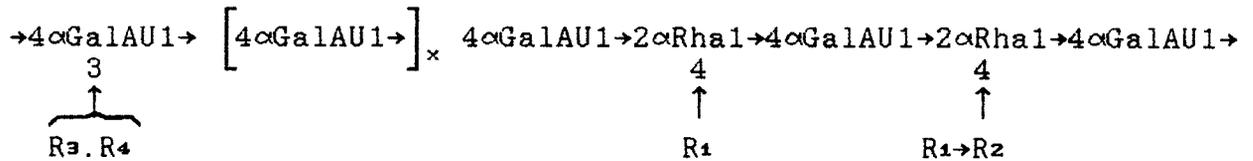
A. - Source : la matrice pectique

1 - Données structurales

Les polymères pectiques ont comme point commun de contenir des radicaux α -4-D galacturonopyranosyls qui forment des enchaînements dans lesquels viennent s'intercaler des résidus α -2-rhamnopyranosyls. Ainsi les homogalacturonanes sont des polymères presque uniquement composés d'acide D-galacturonique. Ils sont difficiles à isoler car très peu solubles. Ils sont souvent obtenus par des extractions drastiques qui entraînent des modifications structurales. Ils sont néanmoins signalés dans les milieux de culture de suspensions cellulaires de tabac (YAMAOKA et SATO 1977) et d'érable (NOTHNAGEL *et al.* 1983, STEVENSON *et al.* 1986).

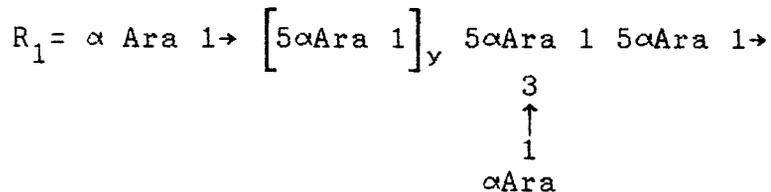
Plus généralement, les pectines sont constituées d'un squelette rhamnogalacturonane (riche en résidus rhamnose), portant des ramifications de type xylane ou arabinogalactane branchées au niveau des résidus rhamnosyls (fig. 1). Les fonctions carboxyliques peuvent être estérifiées par des groupements méthyls ou plus rarement acétyls. *In situ*, les substitutions et les chaînes latérales ne sont pas réparties de façon homogène ; elles forment, selon JARVIS (1984), des blocs le long du réseau pectique (fig. 2). Enfin, les pectines peuvent contenir des acides phénoliques, le plus courant étant l'acide

. Chaîne principale

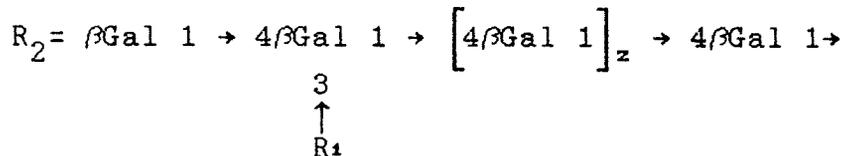


Le rhamnose est dispersé parmi les résidus d'acide galacturonique. On peut observer une alternance Rha - GalAU au niveau des points de branchements.

. Chaînes latérales



La quantité de points de branchement est très variable.



$\text{R}_3 = \beta\text{Xyl 1} \rightarrow$ peut être substitué en O-2 par du galactose ou du fucose.

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

R_3, R_4 sont parfois majoritaires dans certaines pectines peu communes.

. Chaînes mineures

Voir DARVILL *et al.* (1978), Mc NEIL *et al.* (1982), SELVENDRAN (1983).

Figure 1 . - Constituants majeurs des polysaccharides pectiques d'après JARVIS, 1984.

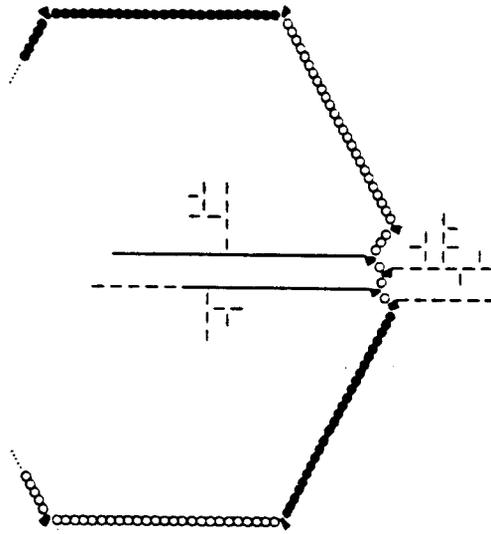


Figure 2 . - Structure générale de pectines.

(∞) galacturonanes méthyl-estérifiés ; (•) homogalacturonanes ;
 (▼) rhamnose ; (-) galactanes latéraux ; (—) arabinanes latéraux.
 (d'après JARVIS, 1984).

ferrulique, qui sont fixés par des liaisons covalentes et peuvent former des dimères sous l'action de l'activité peroxidasique. Ils contribuent ainsi à augmenter la résistance de la trame pectique (FRY 1983).

La présence de chaînes latérales, de groupements esters, d'acides phénoliques ainsi que la taille des séquences homogalacturoniques constituent autant de paramètres susceptibles d'influencer l'accessibilité et l'efficacité des enzymes pectinasiques.

2 - Propriétés physico-chimiques

Initialement, un grand nombre d'études ont été réalisées sur les propriétés chélatrices des polysaccharides pectiques vis-à-vis du calcium. En effet, les pectines s'associent au calcium en formant une structure caractéristique en "dimères d'egg-box" (JARVIS 1984) (fig. 3). Cet agencement, qui se retrouve également avec d'autres polyélectrolytes tel que l'acide polyguluronique, aboutit, à forte concentration, à la formation d'un gel (fig. 4). C'est l'explication la plus communément admise pour justifier la participation des pectines à la cohésion intercellulaire.

B. - Origine : les activités pectinasiques

Les propriétés biologiques des oligosaccharides pectiques auront d'autant plus d'intérêt que leur présence sera possible *in vivo*. La présence d'acides oligogalacturoniques résulte de l'activité hydrolasique des pectinases.

Les enzymes pectolytiques regroupent, en fait, un grand nombre d'espèces ayant des propriétés catalytiques très spécifiques. Les exo- et endopolygalacturonases sont capables d'hydrolyser l'acide homogalacturonique. Les endopectate-lyases sont spécifiques du même substrat mais agissent par β -élimination et génèrent de l'acide galacturonique insaturé en C₄-C₅. Il existe une série parallèle d'enzymes capables d'hydrolyser les pectines méthylées, ce sont les pectine-hydrolases et les pectine-lyases. Enfin, les groupements méthyls peuvent être éliminés sous l'action de pectine-méthyl-estérases, préparant ainsi les pectines à l'attaque éventuelle par les précédentes.

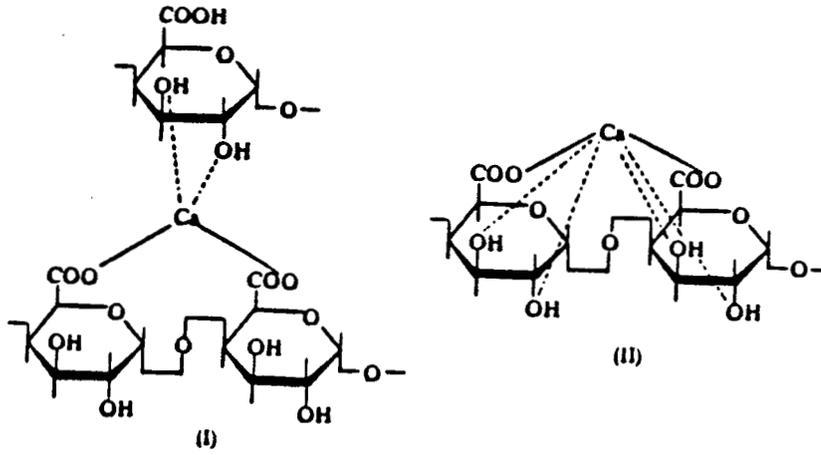


Figure 3 . - Chélat de pectate de calcium.

(I) liaisons intermoléculaires ; (II) liaisons intramoléculaires.

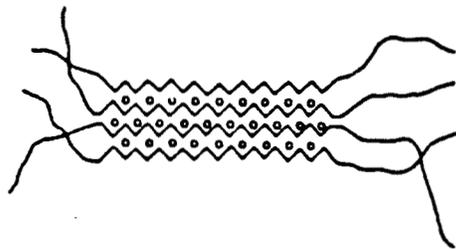


Figure 4 . - Association en "egg-box" des polyguluronates avec le calcium.

(•) Ca^{++} ; ($\wedge\wedge$) chaîne polyguluronate.

Les enzymes capables de générer des oligogalacturonates sont celles de type "endo", hydrolases ou lyases, ces oligosaccharides seront appelés saturés ou insaturés (double liaison en C₃-C₄), selon qu'intervient l'une ou l'autre de ces enzymes.

Les pectinases sont présentes chez la plupart des bactéries, champignons et insectes pathogènes ; on les trouve également chez les végétaux dans certains états physiologiques particuliers tel que l'élongation cellulaire ou le mûrissement des fruits. Les pectinases, sécrétées par les organismes pathogènes, ont pour but d'hydrolyser la lamelle moyenne riche en pectines, de désorganiser le tissu végétal et faciliter l'infection en profondeur. Les hydrolases sont les plus connues, telle l'endopolygalacturonase de **Colletotrichum lindemutianum**, parasite du haricot (ENGLISH **et al.** 1972). Quant aux pectate-lyases, celle d'**Erwinia carotovora** (TANABE **et al.** 1984), fléau bactérien de la carotte, est la plus fréquemment décrite. Ces activités sont généralement associées à des exoenzymes et à d'autres enzymes hydrolytiques de la paroi végétale (cellulases, hémicellulases).

Le murissement des fruits, qui s'accompagne de la solubilisation du pool pectique, est favorisé par l'expression d'activités estérasiques et polygalacturonasiques. La présence de ces mêmes enzymes dans les tissus jeunes suggère leur implication dans la croissance du végétal. Par exemple, des exopolygalacturonases sont présentes chez la carotte (KONNO **et al.** 1981, KONNO **et al.** 1989), la pêche (PRESSEY et AVANTS 1973), le concombre (PRESSEY et AVANTS 1975). Toutes hydrolysent les chaînes pectiques par l'extrémité terminale non réductrice et, très difficilement, l'acide digalacturonique. La présence d'endo-enzymes est moins fréquente bien que l'endopolygalacturonase ait été signalée dans les pêches (PRESSEY et AVANTS 1973) et, plus récemment, dans les cals et tiges de lin, en compagnie de la pectine-méthylestérase (GAFFE **et al.** 1989).

C. - Propriétés biologiques des oligogalacturonates

1 - Signaux de défense

En 1978, HARGREAVES et SELBY décrivent les propriétés d'un extrait dialysable libéré par autoclavage d'hypocotyles de *Phaseolus vulgaris*, capable de l'activation de la production de phytoalexines par les cellules de haricot. La même année, STEKOLL et WEST décrivent l'endopolygalacturonase d'un champignon pathogène, *Rhizopus stolonifer*, capable de libérer des fragments pectiques à partir de parois du ricin. RYAN (1978) isole à partir de feuilles de tomate un facteur de nature pectique, inducteur de la production d'un inhibiteur de protéases (PIIF). Le facteur PIIF est un marqueur protéique de l'élicitation qui limite l'action protéolytique de l'organisme pathogène. La même équipe (RYAN et al. 1981) montre qu'un fragment de rhamnogalacturonane (PM 200 000 env.), issu de parois de cellules d'érable, manifeste une activité "PIIF". HAHN et al. (1981) isolent un éliciteur endogène de parois de soja et démontrent que l'activité élicitrice est portée par la fraction polysaccharidique pectique. Depuis, de nombreux travaux sont consacrés à ces fragments et il est admis que leurs propriétés inductrices interviennent au niveau de l'expression des gènes impliqués dans les réactions de défense à l'agression.

2 - Effets de la taille

L'activité inductrice des fragments pectiques dépend de leur taille. Les relations entre taille et activité ont été étudiées sur 4 types de tests biologiques :

- l'induction dans les cotylédons de soja de la biosynthèse de phytoalexines de type isoflavonoïdes (NOTHNAGEL et al. 1983) ;
- l'induction dans les cotylédons du ricin de la casbène-synthétase, intervenant dans l'étape terminale de la biosynthèse de la casbène, phytoalexine diterpénique (JIN et WEST 1984) ;
- l'induction dans les germes de concombre de la biosynthèse de la lignine (ROBERTSEN 1986) ;

- la biosynthèse dans les feuilles de tomate de facteurs protéiques inhibiteurs de protéases (BISHOP **et al.** 1981, 1984).

Les trois premières réponses restent localisées au niveau du site d'infection, alors que l'activité PIIF se transmet également au niveau de feuilles non infectées. Autre différence, l'induction des phytoalexines et la lignification ne se produisent qu'à partir du nonasaccharide, alors que l'activité PIIF se manifeste à partir du trigalacturonate. Ces activités valent pour les oligosaccharides saturés ou insaturés, ce qui indique que l'extrémité terminale non réductrice n'est pas essentielle pour l'initiation des réponses observées.

3 - Effets morphogénétiques

Plusieurs travaux relatent les propriétés morphogénétiques des oligosaccharides pectiques. Les travaux de GOLLIN **et al.** (1984) sur la floraison d'une lentille d'eau (*Lemna gibba* G3) montrent que ces composés, préparés par hydrolyse partielle (endopolygalacturonase ou dégradation alcaline) des exopolysaccharides de la suspension cellulaire d'érable, inhibent la floraison et stimulent la multiplication des frondes. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus avec les mêmes fragments, introduits à faible dose (1 mg/l) dans le milieu de culture en présence des combinaisons appropriées de phytohormones, sur l'induction florale de couches minces cellulaires de tabac (TRAN THANH VAN **et al.** 1985).

4 - Mécanisme d'action moléculaire

Le mécanisme susceptible d'expliquer les propriétés biologiques des fragments pectiques n'a pas encore été élucidé. Un certain nombre de travaux récents suggèrent l'existence de récepteurs membranaires de polysaccharides. Ainsi, la mycolaminarine, β -glucane fongique inducteur de la biosynthèse de phytoalexines chez le soja, se fixe aux membranes cellulaires (YOSHIKAWA **et al.** 1983). Un traitement protéasique empêche cette fixation, ce qui suppose l'implication de protéines dans le phénomène de reconnaissance. Concernant les fragments pectiques, BAYDOUN et FRY (1985) ont étudié leur mobilité par marquage radioactif, injection (feuilles de tomate) et suivi de la radioactivité. D'après les résultats, les acides oligogalacturoniques d'un DP supérieur ou égal à 6 sont incapables de mobilité. Les auteurs en déduisent

que la transmission à longue distance de l'effet "PIFF" est portée par un autre facteur que les fragments pectiques. Ils n'ont cependant pas étudié la mobilité de plus petits fragments, qui possèdent également une activité PIIF.

5 - Effets chélateurs

Les études portant sur les propriétés physico-chimiques des oligogalacturonates concernent principalement leur comportement vis-à-vis des cations divalents, le calcium en particulier, notamment pour préciser l'effet de la taille sur les propriétés observées (chélation, egg-box). KOHN et LUKNAR, en 1977, ont montré l'existence d'une relation inversement proportionnelle entre la taille et l'activité calcique. L'allure de cet effet présentant une plus nette décroissance à partir du DP12 (fig. 5) et donc un changement de comportement, les auteurs en ont conclu que la chélation et l'egg-box n'étaient possible qu'à partir de cette taille et, qu'en deçà, seules existaient les forces de type électrostatique. En 1982, REES a montré que des pectines contenant des séquences homopolygalacturoniques d'au moins 7 résidus galacturonosyls, ajoutés à un gel de pectate de calcium, diminuaient sa force de gel. L'auteur en a conclu que ce résultat corroborait l'hypothèse de KOHN, à savoir que seuls les oligogalacturonates d'une taille d'environ 14 résidus pouvaient adopter une symétrie 2_1 formée de 7 dimères d'acide galacturonique. RINAUDO et RAVANAT, en 1980, ont montré par RMN et dichroïsme circulaire qu'un changement de comportement vis-à-vis du calcium était notable à partir du DP4. Cependant, le comportement polyélectrolyte dépend du type de cation étudié. En 1987, KOHN a montré que les oligogalacturonates de faible taille étaient capables de chélater des cations divalents (fig. 6), dont certains métaux lourds (Cd, Pb), l'interaction pouvant aller jusqu'à la précipitation.

Il est important de prendre en considération l'affinité des acides oligogalacturoniques vis-à-vis du calcium dans l'étude de leurs propriétés biologiques. Ce cation peut, en effet, jouer un rôle important dans le déclenchement de la réaction d'élicitation. Ainsi, l'effet inducteur de phytoalexines dans les cellules de soja par un éliciteur fongique est inhibé par l'enlèvement du calcium extracellulaire (STAB et EBEL 1987). Certains agents, comme la verapamil, inhibent l'accumulation du calcium intracellulaire. Dans ces conditions, l'induction de 6-méthoxymelleine

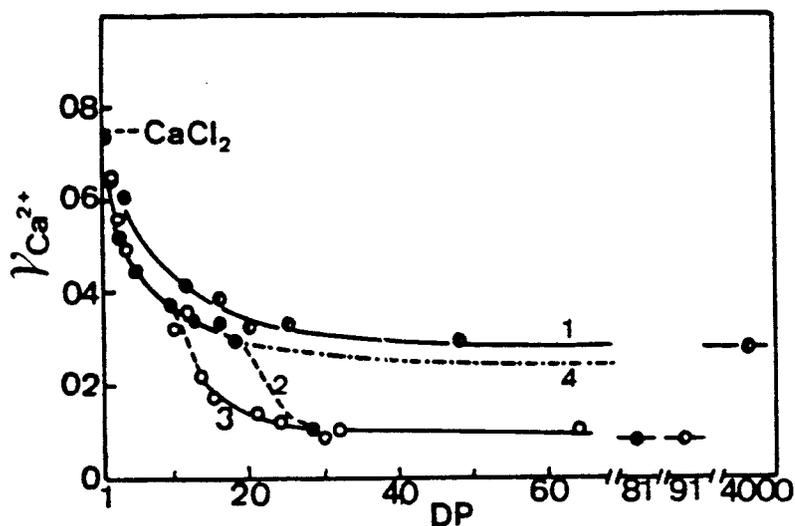


Figure 5 . - Relation entre le coefficient d'activité calcique $\gamma_{Ca^{2+}}$ et la taille des fragments pectiques.

1, manuronate ; 2, guluronate ; 3, galacturonate ; 4, valeurs théoriques des $\gamma_{Ca^{2+}}$ de polygalacturonates et polyguluronates en solution. (D'après KOHN et LARSEN, 1972).

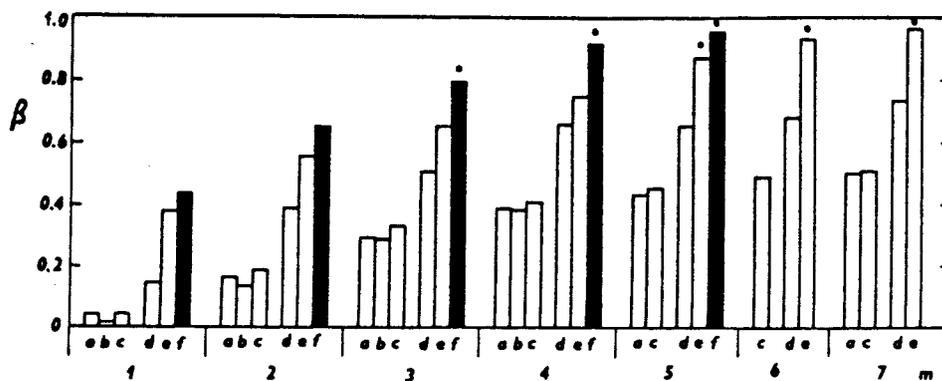


Figure 6 . - Relation entre le degré d'association, β , des cations divalents, avec la taille des oligogalacturonates.

*, précipitation partielle des oligomères.

Liaisons électrostatiques : a, Ca^{2+} ; b, Sr^{2+} ; c, Zn^{2+} .

Formation de chélatés : d, Cd^{2+} ; e, Cu^{2+} ; f, Pb^{2+} .

(d'après KOHN, 1987).

(phytoalexine) dans les cellules de carotte en présence d'un éliciteur est également inhibée (KUROSAKI *et al.* 1987). Les auteurs suggèrent que le calcium pourrait être un second messenger dans la production de phytoalexines.

Les polysaccharides pectiques, qui sont les polymères matriciels les plus abondants dans la paroi primaire, peuvent donner naissance à des fragments plus petits de même parenté structurale et physico-chimique. En outre, ils présentent des propriétés inductrices remarquables (réaction de défense, réponses morphogénétiques) qui justifient l'intérêt dont ils sont l'objet actuellement. C'est également la raison pour laquelle la moitié de ce travail leur est consacré car ils constituent, sinon le meilleur, du moins un très bon modèle pour l'étude de la relation structure-fonction.

II. - OLIGOSACCHARIDES DE XYLOGLUCANES

A. - Source : la matrice xyloglucanique pariétale

I - Données structurales

Les xyloglucanes sont des polysaccharides constitutifs des parois primaires des plantes supérieures. Ils se localisent à la périphérie des microfibrilles de cellulose. Leur structure comprend une chaîne principale de radicaux β -4-D-glucopyranosyls. Ces radicaux peuvent être substitués au niveau du carbone 6 par diverses ramifications contenant du xylose, du galactose, du fucose, de l'arabinose et du glucose (fig. 7). Il semble que les xyloglucanes proches de la cellulose soient peu ramifiés, ce qui renforcerait les forces de cohésion avec celle-ci par le biais de liaisons hydrogènes. Par contre, les xyloglucanes plus éloignés de la cellulose seraient plus ramifiés (CARTIER 1986). Les xyloglucanes, tout comme les pectines, ont été isolées dans les milieux de culture des suspensions cellulaires, telle que celle d'érable (ASPINALL *et al.* 1969, BAUER *et al.* 1973, STEVENSON *et al.* 1986), de rose (BARNOUD *et al.* 1977) et de ronce (CARTIER 1986). Les xyloglucanes se retrouvent également dans les graines ; dans ce cas, elles ne sont pas fucosylées.

2 - Rôle biologique (ou aspects fonctionnels)

La principale fonction des xyloglucanes est une fonction de soutien de la trame pariétale. Ils se fixent par des liaisons hydrogènes à la cellulose et une partie d'entre eux sont liés aux pectines par des liaisons covalentes. L'adhérence des xyloglucanes aux microfibrilles de cellulose leur confère un rôle dans l'extensibilité pariétale : leur hydrolyse permet le glissement de ces microfibrilles, nécessaire pour le grandissement cellulaire. Le métabolisme des xyloglucanes constitue donc une des clés de la régulation de la croissance. Par delà leur participation aux remaniements qui ont lieu dans la matrice pariétale pendant l'élongation, les xyloglucanes interviennent également par le biais des produits de leur dégradation, à savoir les oligosaccharides.

B. - Origine : les activités hydrolasiques

Chez les végétaux, l'initiation de la croissance est sous le contrôle d'une hormone de sécrétion appelée auxine. Sa présence provoque une acidification pariétale que l'on attribue à l'activation d'une pompe à protons située dans le plasmalemme. L'abaissement du pH a pour conséquence l'activation d'enzymes acidophiles, qui provoquent la rupture de certaines liaisons et permettent ainsi l'extension pariétale (CLELAND 1971, HAGER **et al.** 1971)

Au cours de la croissance, le degré de polymérisation des xyloglucanes diminue tandis qu'une partie du pool pariétal est solubilisée (KATO et MATSUDA 1981, KOYAMA **et al.** 1981). Ces auteurs rapportent cet effet à une enzyme qu'ils nomment xyloglucanase.

En fait, les enzymes capables d'hydrolyser les xyloglucanes sont nombreuses. Elles sont notamment présentes dans les graines en germination, qui mobilisent leurs réserves de xyloglucanes. Par exemple, les graines de **Nasturtium** contiennent une endoglucanase capable d'hydrolyser les xyloglucanes (EDWARDS **et al.** 1985). Par ailleurs, beaucoup de plantes contiennent des α -xylosidases, α -fucosidases et β -galactosidases (KOYAMA **et al.** 1983). Certaines de ces activités enzymatiques sont sensibles à l'auxine ; celle-ci induit **in vivo** la biosynthèse d'endo-1,4- β -glucanases (VERMA **et al.** 1975) ainsi que les activités α -xylosidasiques et β -galactosidasiques des germes de pois (O'NEIL **et al.** 1988).

Les premières enzymes qui interviennent dans l'hydrolyse des xyloglucanes sont les endo-1,4- β -glucanases, elles libèrent de grands fragments. Puis les activités exoglucosidasiques achèvent la dégradation. Des oligosaccharides peuvent être produits en incubant un xyloglucane extrait des parois des cellules d'érable en présence d'une cellulase (YORK **et al.** 1984). **In vivo**, des oligosaccharides porteurs "d'activité biologique" ont pu être détectés dans le liquide apoplastique des cellules d'épinard (FRY 1986).

C. - Propriétés biologiques

C'est en préparant des fragments de xyloglucanes d'érable par digestion cellulasique d'exopolysaccharides que YORK **et al.**, en 1984, ont isolé et caractérisé un nonasaccharide $\text{Glc}_4\text{Xyl}_3\text{GalFuc}$ (XG9). Cet oligosaccharide (fig. 8) présente une activité anti-auxinique remarquable, et ce, à de très faibles concentrations (1 nM). Par contre, l'heptasaccharide qui dérive du précédent par perte de l'extrémité L-Fuc, α -1-2-D-Gal, ne présente pas cette propriété. MacDOUGALL et FRY (1989) ont montré que la défucosylation, ou la présence d'un résidu galactosyl supplémentaire, supprimait les propriétés observées. MacDOUGALL et FRY ont également montré qu'un pentasaccharide $\text{Glc}_2\text{XylGalFuc}$ (XG5) possédait également une activité anti-auxinique, quoique moins efficace que le XG9. Les mêmes auteurs ont étudié l'action stimulante de ces fragments sur l'activité cellulasique "**in vitro**" et observé que cet effet était plus net avec un substrat de xyloglucane qu'avec un substrat de carboxyméthylcellulose (FARKAS **et al.** 1988).

III. - OLIGOSACCHARIDES DES PROTEINES N-GLYCOSYLEES

Ces oligosaccharides ne sont pas décrits jusqu'à présent comme des oligosaccharines. Ce chapitre leur est néanmoins consacré, car il permettra une meilleure compréhension des résultats, en particulier par leur mise en évidence dans le milieu extracellulaire de la suspension cellulaire de Silène.

A. - Source : les protéines végétales N-glycosylées

1 - Données structurales

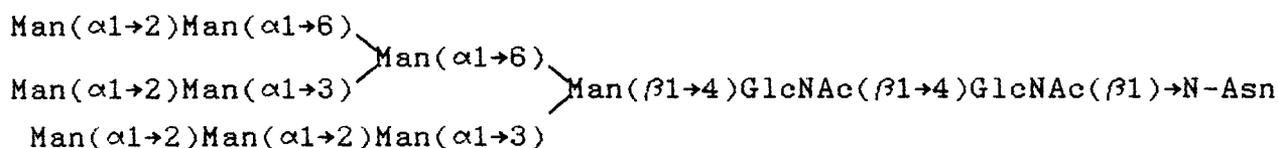
Les N-glycannes des glycoprotéines végétales peuvent être classées en 2 catégories majeures : les oligosaccharides de type oligomannosidique et les oligosaccharides de type xylomannosidique.

Les oligomannosides ont pour formule générale le motif $\text{Man}_{5-9}(\text{GlcNAc})_2$. Décrits initialement chez la lectine de soja, ceux-ci ont été trouvés dans la composition d'autres protéines, vacuolaires et extracellulaires (lectines, enzymes).

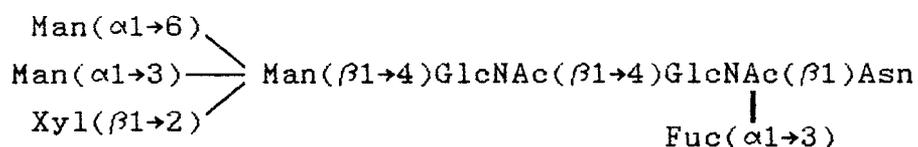
Les xylomannosides ont une structure commune ("core") constituée du motif $\text{Man}_3\text{Xyl}(\text{GlcNAc})_2$ ou peuvent être rattachés plusieurs sucres tels que le fucose, GlcNAc et galactose (fig. 9). La présence de xylose lié en β 1-2 au mannose central est d'abord apparue comme spécifique des glycoprotéines végétales ; mais assez récemment, le même type de structure a été décrit dans l'hémocyanine d'*Helix pomatia* (VAN KUIK *et al.* 1985) et dans les glycoprotéines de *Lymnea stagnalis* (VAN KUIK *et al.* 1986). Ainsi, les invertébrés possèdent des structures glycaniques communes à celles des végétaux supérieurs.

Comme chez les autres organismes eucaryotiques, la glycosylation commence dans le lumen du réticulum endoplasmique, après le transfert en bloc du glycane $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ initialement porté par un dolichol sur une protéine naissante. La N-glycosylation s'effectue sur le radical Asparagyl de la séquence Asn-X-Ser/Thr (X différent de Pro, Asp). Les régions glycosylées sont celles où la conformation " β -turn" est favorisée. Chez les cellules végétales comme chez les cellules des mammifères, le précurseur oligosaccharidique $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est assemblé sur un porteur dolicholphosphate. L'aboutissement de la biosynthèse vers la structure oligomannosidique ou la structure xylomannosidique dépend des modifications du précurseur $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. La biosynthèse de la structure substituée passe par l'action de deux enzymes golgiennes, l' α -mannosidase I qui enlève 4 résidus mannosyls et l' α -mannosidase II qui enlève les 2 autres résidus mannosyls (SZUMILO *et al.* 1986). La conversion de la structure

. Glycane oligomannosidique des lectines de Soja (1) et de phaseoline (2)



. Glycane xylomannosidique substitué de la ricine D de Ricin (*Ricinus communis*) (3) et de la laccase de *Sophora japonica* (4)



Le fucose peut être absent, comme par exemple chez l'acide ascorbique oxydase de *Cucurbita pepo medullosa* (5).

. Glycane complexe de la laccase d'*Acer pseudoplatanus* (6).

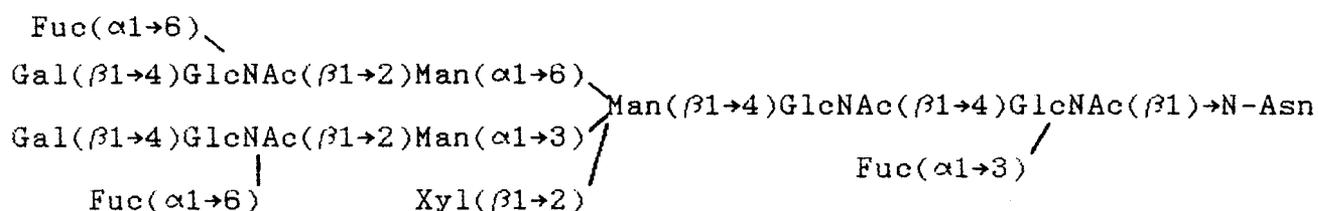


Figure 9 . - Exemples de structures glycaniques de protéines végétales N-glycosylées.

(1), DORLAND *et al.*, 1981 ; (2), STURM *et al.*, 1987 ; (3), KIMURA *et al.*, 1988 ; (4), FOURNET *et al.*, 1987 ; (5), D'ANDREA *et al.*, 1988 ; (6), TAKAHASHI *et al.*, 1986.

oligomannosique en structure xylomannosidique est représentée sur la figure 10. L'addition du fucose nécessite la fixation préalable d'un résidu NAcglucosaminyl sur le mannose lié en 3, alors que celle du xylose requiert l'addition d'un deuxième résidu NAcglucosaminyl sur le mannose lié en 6. Selon FAYE *et al.* (1986 a et b), la présence de glycannes de type oligomannosidique semble correspondre à leur non accessibilité vis-à-vis des α -mannosidases (fig. 11).

L'analyse structurale des N-glycannes de plantes n'a été réalisée que sur un petit nombre de glycoprotéines. Cependant, des informations indirectes comme l'analyse de la composition molaire et la reconnaissance par des anticorps spécifiques suggèrent que ces glycannes se retrouvent aussi bien au niveau extracellulaire, vacuolaire, qu'au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

2 - Rôles biologiques

Les N-glycannes ont un rôle au niveau de la stabilité thermique, de la solubilité, de la conformation spatiale ou de l'activité biologique des glycoprotéines. Les glycannes occupent une part importante de la surface des protéines globulaires et peuvent ainsi les protéger contre l'action protéasique (MONTREUIL 1984).

Un certain nombre de protéines extracellulaires, sous l'action d'inhibiteurs de la glycosylation telle la tunicamycine, ne sont plus sécrétées. C'est le cas, par exemple, des α -amylases sécrétées par les cellules à aleurone (MIYATA et CHRISPEELS 1982) ou de la fructosidase de carotte (FAYE et CHRISPEELS 1989). Dans certains cas, la glycosylation est nécessaire au transport des glycoprotéines au niveau intracellulaire, c'est le cas pour les enzymes lysosomales (SLY et FISHER 1982) ou pour la concanavine A de *Canavalia* (FAYE et CHRISPEELS 1987). Cependant, certaines protéines non glycosylées sous l'action de la tunicamycine peuvent être excrétées, comme c'est le cas pour la β -fructosidase pariétale des germes de radis (FAYE *et al.* 1986c). La non excrétion peut être due à une sensibilisation plus grande à l'action protéasique, comme cela semble être le cas pour la β -fructosidase de carotte. Cette dégradation se ferait immédiatement dans le compartiment

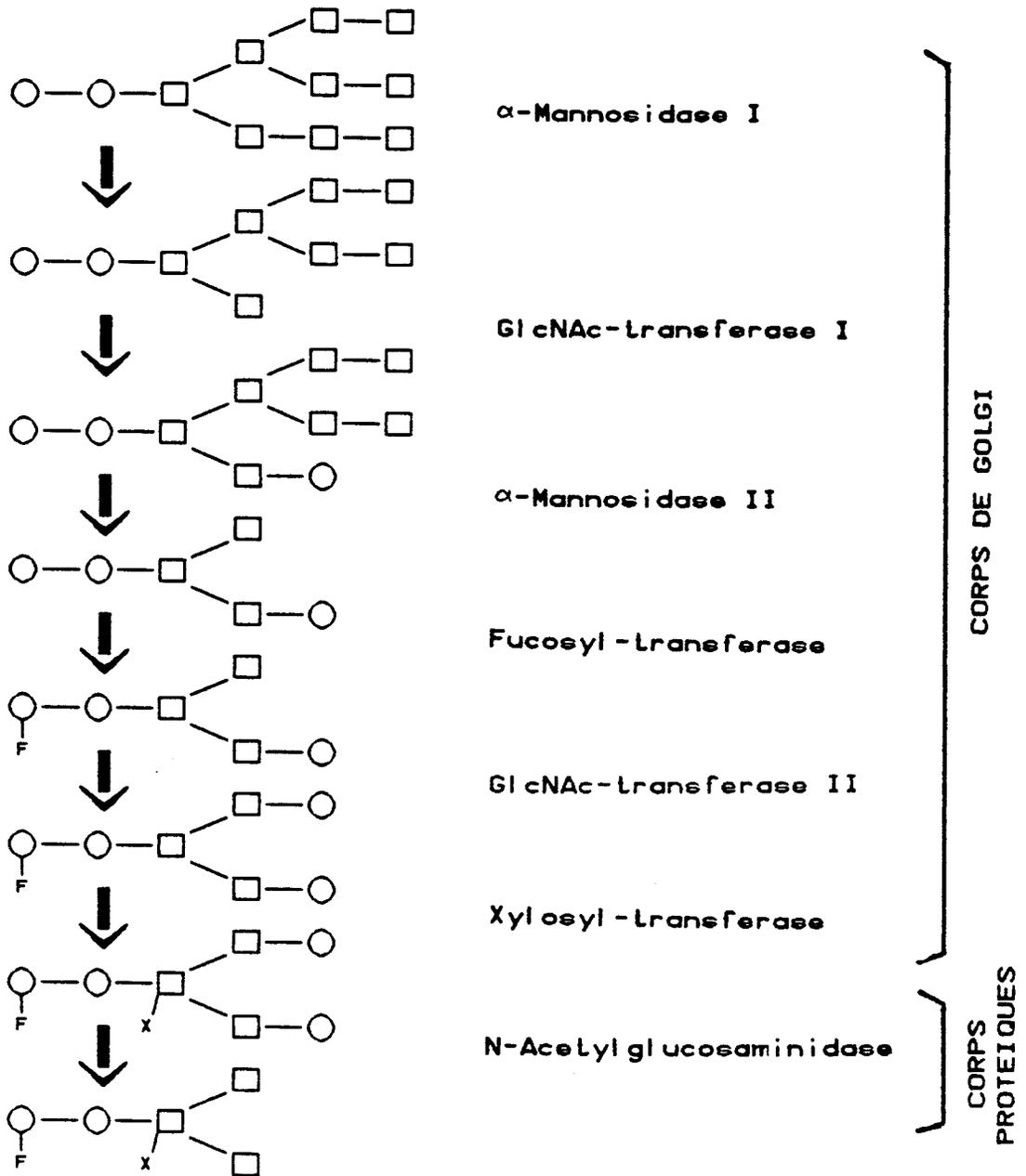


Figure 10 . - Etapes de transformation d'un oligomannoside en xylo-oligomannoside.

○, N-acétylglucosamine ; □, mannose ; F, fucose ; X, xylose.
 D'après FAYE *et al.*, 1989.

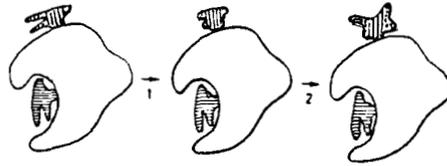


Figure 11 . - Voies d'évolution des glycanes en cours de biosynthèse selon la localisation au sein de la protéine.

L'oligomannoside externe (raies verticales) est modifié par les glycosidases golgiennes (1), et va évoluer en structure substituée ou complexe sous l'action de glycosyltransférases (2).

L'oligomannoside interne (raies horizontales) est inaccessible aux glycosidases golgiennes et demeurera non modifié.

intracellulaire et non sous l'action d'une endoprotéase pariétale, comme le pensaient initialement les auteurs. En effet, ceux-ci ont retrouvé les mêmes résultats sur des préparations de protoplastes.

Plus généralement, les glycoprotéines sont impliquées dans la reconnaissance cellulaire. Le rôle des lectines membranaires des cellules animales est riche d'exemples. Les cellules végétales possèdent également leurs lectines intramembranaires, et aussi des lectines pariétales qui sont d'ailleurs utilisées à des fins biotechnologiques. Il est donc probable que les glycoprotéines cibles de ces lectines aient un rôle dans la reconnaissance cellulaire, bien qu'il n'y ait pas de travaux directs mettant en évidence cette éventualité.

B. - Origine

1 - Biosynthèse des glycoprotéines

La libération d'oligosaccharides, associée à la biosynthèse des glycoprotéines, a été montrée chez l'animal (HSU **et al.** 1974, RICHARD **et al.** 1978, CACAN **et al.** 1980) et la levure (BELARD **et al.** 1988, CACAN **et al.** 1989). Il s'agit d'oligomannosides qui proviennent de l'hydrolyse du complexe lipidique oligosaccharide-P-P-Dolichol non utilisé pour l'étape de glycosylation. Deux enzymes sont actuellement connues pour réaliser cette hydrolyse. Il s'agit d'une part d'une endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase (ANUMULA et SPIRO 1983), qui libère des oligosaccharides neutres et, d'autre part, une pyrophosphatase (BELARD **et al.** 1988) qui libère des oligosaccharides phosphorylés. Le lieu de formation et l'importance métabolique de ces oligosaccharides sont encore mal connus actuellement.

2 - Les activités protéolytiques

Chez les animaux et plus particulièrement chez l'homme, le catabolisme des glycoprotéines est très étudié, notamment en raison de certaines déficiences enzymatiques qui provoquent l'accumulation de structures limites dans les cellules responsables de maladies graves chez l'enfant (sialosidoses) (STRECKER 1980). La localisation de ce catabolisme se situe au niveau des lysosomes, où interviennent toute une série d'enzymes conduisant en principe

à la dégradation complète des structures glycaniques (fig. 12) (STRECKER **et al.** 1988).

Chez les végétaux, la dégradation des glycoprotéines est intense au niveau des graines en germination. Les protéines de réserve sont assemblées dans les grains d'aleurone, qui peuvent être assimilés à des vésicules lysosomiales. Ils contiennent des hydrolases acides (carboxypeptidases, α -mannosidases, N-acétyl- β -glucosaminidases (HARRIS et CHRISPEELS 1975) qui s'expriment lors de la germination. Un certain nombre d'enzymes, utilisées pour l'étude de la structure des glycoprotéines, sont extraites de graines telles la peptide-N⁴-(N-acetyl- β -glucosaminyl)-asparagine amidase J ("PNGase" J) et l'endo- β -N-acetylglucosaminidase du ricin (YET et WOLD 1988) ou encore la PNGase A d'amande (TAGA **et al.** 1984).

Moins étudié, le catabolisme protéique peut s'exprimer au niveau de tissus en état de carence nutritive. Lorsque des cellules sont exposées à une carence en substrat carboné, elles consomment alors leurs réserves de sucres, de lipides et de protéines. On assiste également à une diminution du nombre de mitochondries et à une autolyse membranaire caractérisée, en particulier, par la libération de phosphatidyl-choline (JOURNET **et al.** 1986). Ce phénomène, permettant aux cellules de survivre dans des conditions défavorables, est caractérisé par la présence de nombreuses vésicules d'autophagie, contenant des enroulements membranaires visibles en microscopie électronique.

C. - Propriétés biologiques

Jusqu'à présent, les N-glycannes ont surtout été étudiées en tant qu'entités structurales particulières liées à des protéines et à ce titre plusieurs fonctions leurs ont été attribuées.

Dans les cellules animales, leur présence à l'état libre est relatée dans des états pathologiques liés à certains déficits enzymatiques du catabolisme protéique (STRECKER 1980). Récemment, des sialooligosaccharides libres ont été trouvés dans des oeufs de poisson (*Plegoglossus altivelis*) (ISHII **et al.** 1989). Il n'y a pas expression des activités glycohydrolases. De fait, les auteurs pensent que leur origine n'est pas une conséquence du catabolisme

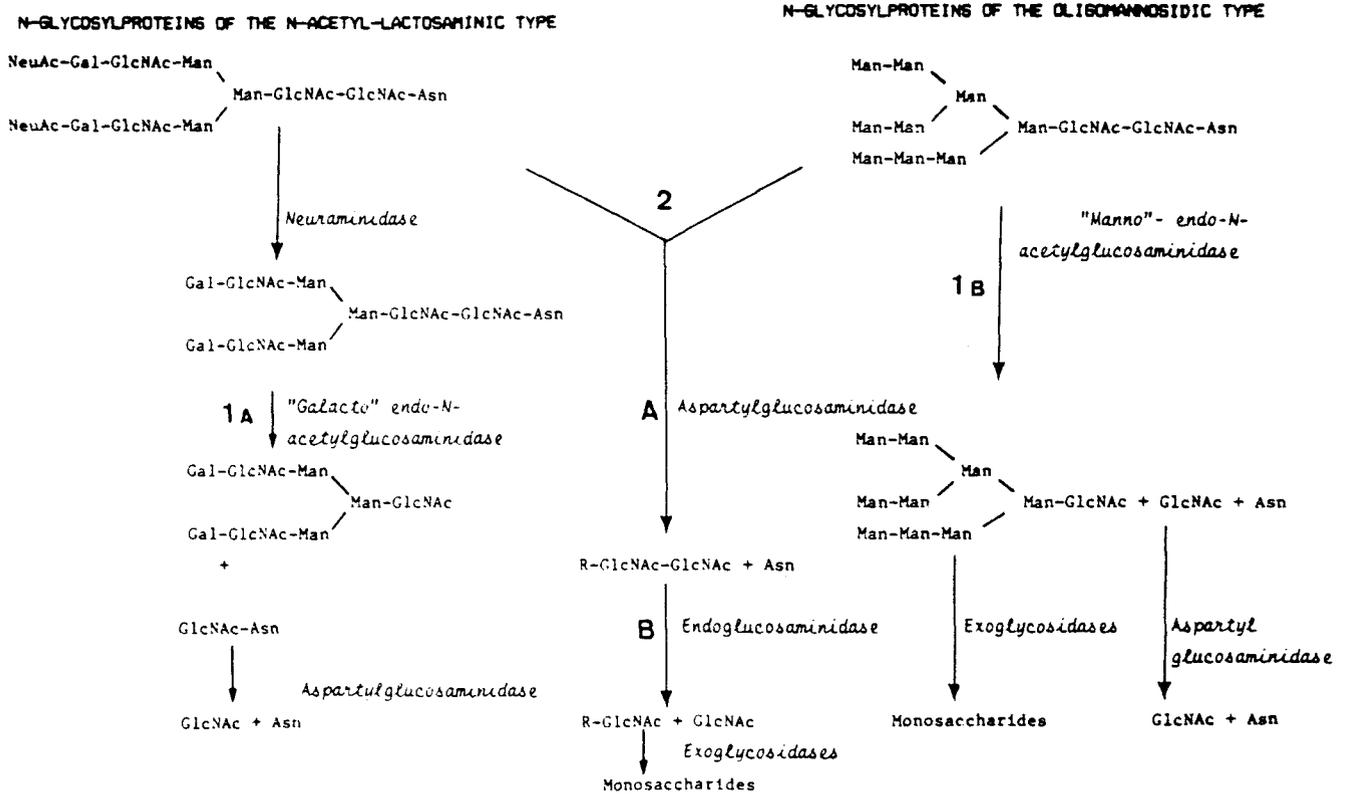


Figure 12 . - Différentes voies hypothétiques proposées pour la dégradation des glycanes des protéines N-glycosylées (d'après STRECKER *et al.*, 1988).

protéique mais constitue plutôt une voie de régulation du développement embryonnaire. A supposer que l'on retienne cette hypothèse, la question qui se pose est de savoir si la régulation porte sur la disparition de la glycoprotéine, l'apparition de l'apoprotéine (activée ?) ou encore les propriétés biologiques des oligosaccharides libérés.

- o O o -

Comme en témoignent les nombreux travaux concernant les oligosaccharides endogènes, la problématique visant à relier les propriétés observées aux caractéristiques structurales de ces molécules est trop rarement prise en compte. Chacun des deux aspects, structure ou fonction, peuvent être tour à tour privilégiés en fonction d'objectifs ou d'impératifs conjoncturels. Ils ne sont jamais totalement dissociés.

Dans notre travail, la caractérisation biochimique des oligosaccharides précèdera l'étude de leurs propriétés biologiques. Dans le cas des oligosaccharides extracellulaires de la suspension cellulaire de Silène, l'étude des aspects fonctionnels est à peine ébauchée et ne sera pas présentée dans le cadre de ce mémoire.

Les méthodes et techniques de travail ne feront pas l'objet d'un chapitre particulier. Ils seront directement intégrés dans la présentation des résultats en raison du caractère évolutif des méthodologies utilisées. En outre, le détail des techniques sera reporté en annexes.

R E S U L T A T S

1ère partie

PREPARATION, CARACTERISATION ET PROPRIETES DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES

I. - PREPARATION DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES

Les acides oligogalacturoniques (oligoGalAU) utilisés pour les tests biologiques sont préparés par digestion de l'acide polygalacturonique commercial, grâce à une endopolygalacturonase (EPGase) isolée d'un champignon pathogène parasite du haricot, **Colletotricum lindemuthianum**.

A. - Purification d'une endopolygalacturonase (Fiche technique n°1, en Annexe)

L'EPGase de **Colletotricum lindemuthianum** est purifiée à partir d'un milieu de culture extracellulaire, selon le protocole de ENGLISH **et al.** (1972) modifié par LAFITTE (1983). Celui-ci comporte successivement une chromatographie d'échange d'ions (CM Sépharose) et une chromatographie sur hydroxyapatite. Le résultat de la purification est présenté dans le tableau 1.

L'inexistence d'une exopolygalacturonase contaminante est vérifiée par chromatographie sur couche mince (pas de libération d'acide galacturonique).

B. - Préparation d'un hydrolysat pectique (Fiche technique n°2)

Cette étape est importante, puisque de la qualité de l'hydrolyse (plus ou moins poussée) dépend une répartition plus ou moins homogène en chaque oligosaccharide dans l'hydrolysate. Quelques essais préliminaires sont effectués afin d'apprécier, par chromatographie sur couche mince, la qualité de l'hydrolyse. Un rapport de 0,62 U d'endoPG par gramme d'acide pectique maintenu 10 h, à 30°C, s'est avéré un compromis satisfaisant. Le profil chromatographique obtenu par HPLC, indiquant la répartition des différents oligosaccharides, est présenté sur la figure 13.

C. - Fractionnement des acides oligogalacturoniques

Les modalités du fractionnement sont les suivantes : l'hydrolysate est déposé sur une colonne cationique Dowex 1 x 2, sous forme formiate, et élué par le formiate d'ammonium (0,05 à 1 M, pH 5,2). Ce protocole est une modification de celui de NAGEL et WILSON (1969), où les auteurs utilisaient le formiate

Tableau 1 .

Purification de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Fraction	Volume (ml)	U* totales	Protéines (mg)	A. S. (U. mg ⁻¹)	Purification	Rdt (%)
Milieu brut	300,0	13500,0	135,9	99,3	1,0	100,0
Carboxy-méthyl sépharose	30,0	3966,0	5,4	734,4	7,4	29,0
Hydroxy-apatite	38,0	2994,0	0,4	7881,0	79,3	22,0

* : 1 unité enzymatique correspond à la libération d'1 µg d'équivalent réducteur d'acide galacturonique.min⁻¹ dans les conditions définies dans la fiche technique n° 1.

A. S. : activité spécifique.

Tableau 2 .

Estimation des degrés de polymérisation (DP) des huit premiers oligosaccharides séparés par chromatographie échangeuse d'anions Dowex 1 x 2/HCO₃⁻.

Fractions	Volume (ml)	AU mg.ml ⁻¹	SR mg.ml ⁻¹	Rapport (AU/SR)	AU (mg)
DP 2	60	7,66	4,31	1,8	460
DP 3	65	4,93	1,68	2,9	320
DP 4	62	5,28	1,43	3,7	327
DP 5	58	6,47	1,42	4,6	375
DP 6	59	3,77	0,62	6,1	222
DP 7	98	2,02	0,31	6,5	198
DP 8	67	2,10	0,27	7,8	141

Les AU (acides uroniques) sont estimés par dosage colorimétrique au méthahydroxydiphénol (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973). Les SR (sucres réducteurs) sont estimés par dosage colorimétrique (SOMOGYI, 1952).

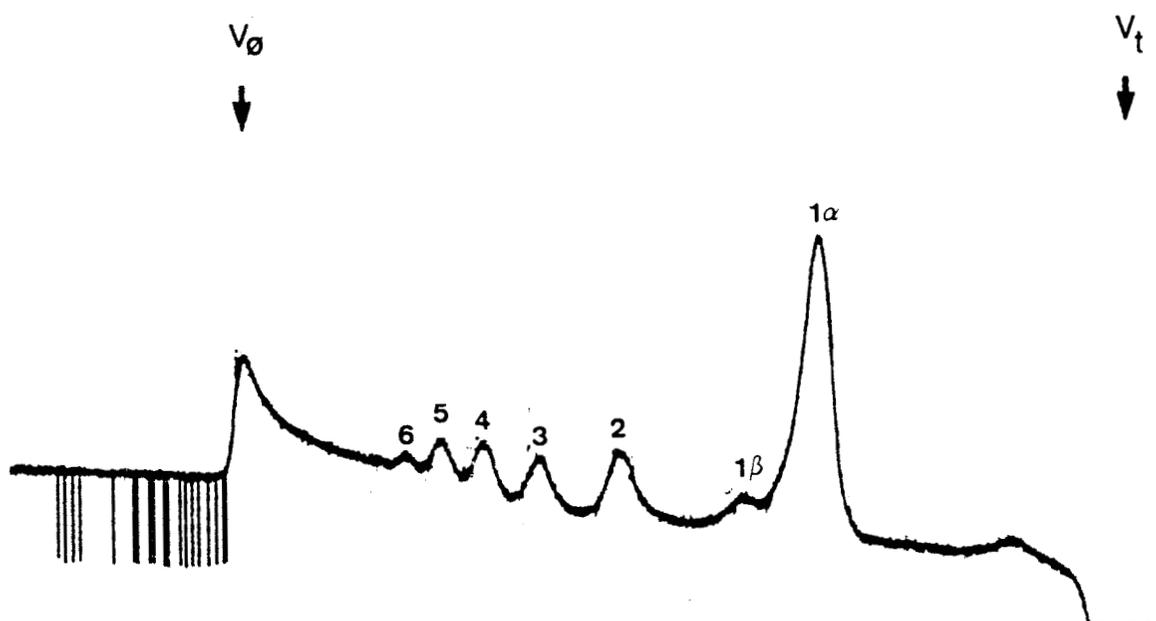


Figure 13 . - Profil H.P.L.C. de l'hydrolysat pectique préparé par digestion enzymatique.

Les chiffres correspondent au degré de polymérisation des oligomères. 1α , forme lactose de l'acide galacturonique, est quantitativement majoritaire par rapport à 1β , forme non lactone.

Colonne $50 \times 1,6$ cm ; gel HW40SF ; éluant acide acétique $1^\circ/\infty$: débit $0,5$ ml/min ; détection UV 214 nm.

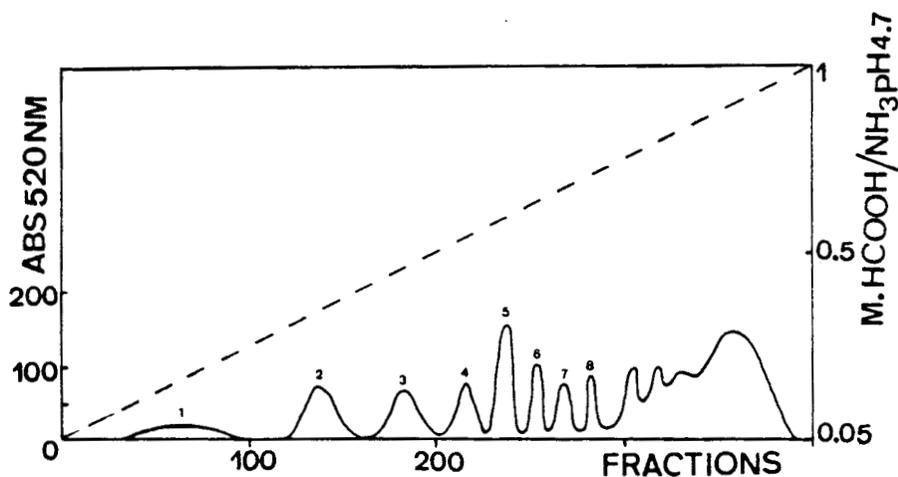


Figure 14 . - Séparation des oligogalacturonates sur Dowex 1 x 2 / HCOO^- .

Le volume d'une fraction est de 10 ml. Le débit est de 40 ml. h^{-1} . Les chiffres sur le schéma représentent les degrés de polymérisation des différents oligoGalAU. Les acides uroniques sont estimés par dosage colorimétrique au métahydroxybiphényle et lecture à 520 nm (Fiche technique n° 2).

de sodium. Le sel d'ammonium a pour avantage de s'éliminer relativement facilement par lyophilisation.

La figure 14 représente le spectre d'élution des oligoGalAU. Les 8 premiers oligosaccharides sont bien séparés. Au delà, on ne peut obtenir que des fractions partiellement purifiées. La répartition quantitative des différents oligoGalAU est satisfaisante : on obtient, en effet, entre 200 et 300 mg de chaque oligosaccharide (DP2 à 8), soit 20 % du substrat de départ.

II. - CARACTERISATION DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES

A. - Estimation du degré de polymérisation

Il est aisé de repérer les différents oligosaccharides par chromatographie sur couche mince, en comparant leur R_f avec celui de l'acide galacturonique et d'en déduire leurs tailles. Cependant, pour confirmer cette estimation et compte tenu de l'absence de témoins, le degré de polymérisation de chaque oligosaccharide a été calculé sous forme du rapport sucres totaux (acides uroniques)/sucres réducteurs. Les résultats, présentés dans le tableau 2, permettent de confirmer la taille des fragments séparés. De plus, les deux mélanges d'oligosaccharides élués après l'octamère ont été caractérisés par un DP moyen, de respectivement 12 et 14,5. Ces mélanges seront parfois utilisés pour des tests d'activité biologique.

B. - Contrôles par spectrométrie de masse (FAB-MS)

La FAB-MS est réalisée sur les différents oligoGalAU purifiés, à l'état natif sous forme acide, à l'aide d'un spectromètre de masse Kratos MS 50, en mode négatif.

Les oligoGalAU sont dissous dans une matrice de polyéthylène-glycol. Pour chaque oligosaccharide, on retrouve l'ion moléculaire caractéristique $m/z = (M-H)^-$, qui est majoritaire et permet de confirmer le degré de polymérisation de chaque fragment (figure 15, exemple de l'hexamère et de l'heptamère).

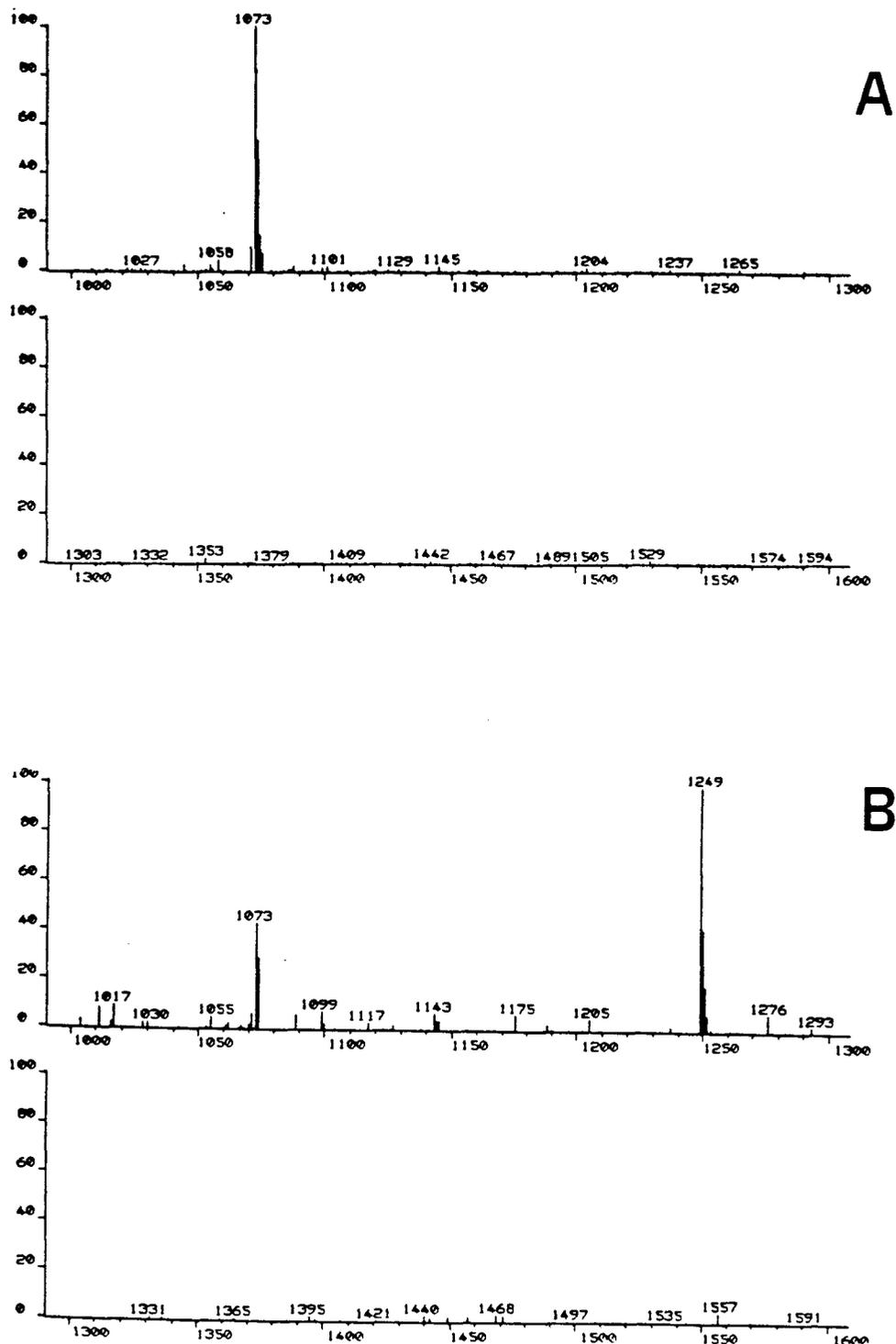


Figure 15 . - FAB-MS, mode négatif des acides hexa- et hepta-galacturoniques (A et B).

Ces acides oligogalacturoniques ont pour masse respective 1 073 et 1 250 (sous forme H⁺). Les ions majoritaires m/z 1 073 et 1 249 correspondent à la perte d'un H.

Spectre A : l'ion m/z 1 249 qui correspondrait à une contamination par le DP 7 est absent.

Spectre B : l'ion m/z 1 249 est également le dernier majoritaire. L'ion m/z 1 073 provient d'un fractionnement consécutif à la technique d'analyse (dégradation séquentielle).

(Fiche technique n° 11).

La fragmentation s'effectue séquentiellement par perte récurrente d'un résidu GalAU (fig. 16). On retrouve ainsi pour chaque oligosaccharide les masses atomiques des ions moléculaires des autres oligoGalAU de taille inférieure. Ceci signifie que l'on ne peut affirmer que l'oligosaccharide analysé est exempt d'une contamination par les espèces plus petites. Par contre, il est facile de juger d'une contamination par l'espèce immédiatement supérieure. A titre d'exemple, le spectrogramme de l'heptasaccharide, m/z 1249, ne montre pas d'ion m/z 1425, caractéristique de l'octasaccharide. On peut donc affirmer, en admettant que les réponses des différents oligosaccharides sont voisines, que l'heptasaccharide est exempt d'octasaccharide. Cette vérification est essentielle, car c'est surtout pour les fragments lourds que le fractionnement devient difficile. La contamination d'une préparation oligosaccharidique par un fragment plus lourd peut constituer un handicap majeur dans la suite du travail. En effet, la plupart du temps, les propriétés des oligosaccharides dépendent d'un seuil quant à leur taille ; il faut donc être sûr que l'effet observé ne soit pas la conséquence d'une contamination de taille supérieure, mais bien le reflet de la catégorie choisie.

C. - Etude de la méthanolyse

L'efficacité de la méthanolyse par rapport à la stabilité des liaisons polyuroniques étant sujet à controverse, l'incidence de la taille des substrats galacturoniques sur le rendement de méthanolyse est étudiée. Une méthanolyse (MeOH/HCl anhydre, 1 N, 24 h, 80°C) est effectuée sur les oligosaccharides de DP 1 (témoin GalAU) à 8, sur un mélange de DP moyen 12 et sur l'acide pectique commercial utilisé pour la préparation de l'hydrolysat. Les dérivés méthylglycosides sont trifluoroacétylés (anhydride TFA/pyridine, 1:1, 24 h, 20°C). L'érythritol est choisi comme étalon interne, de préférence au mésoinositol, étalon classique mais indésirable, car le temps d'élution de son dérivé est identique à l'un des dérivés de l'acide galacturonique.

1 - Etalonnage de la colonne

L'utilisation d'une colonne capillaire DB 210, habituellement déconseillée pour l'injection des méthylglycosides trifluoroacétylés (dérivés TFA), compte-tenu de l'injection simultanée des réactifs de trifluoroacétylation très volatils, est

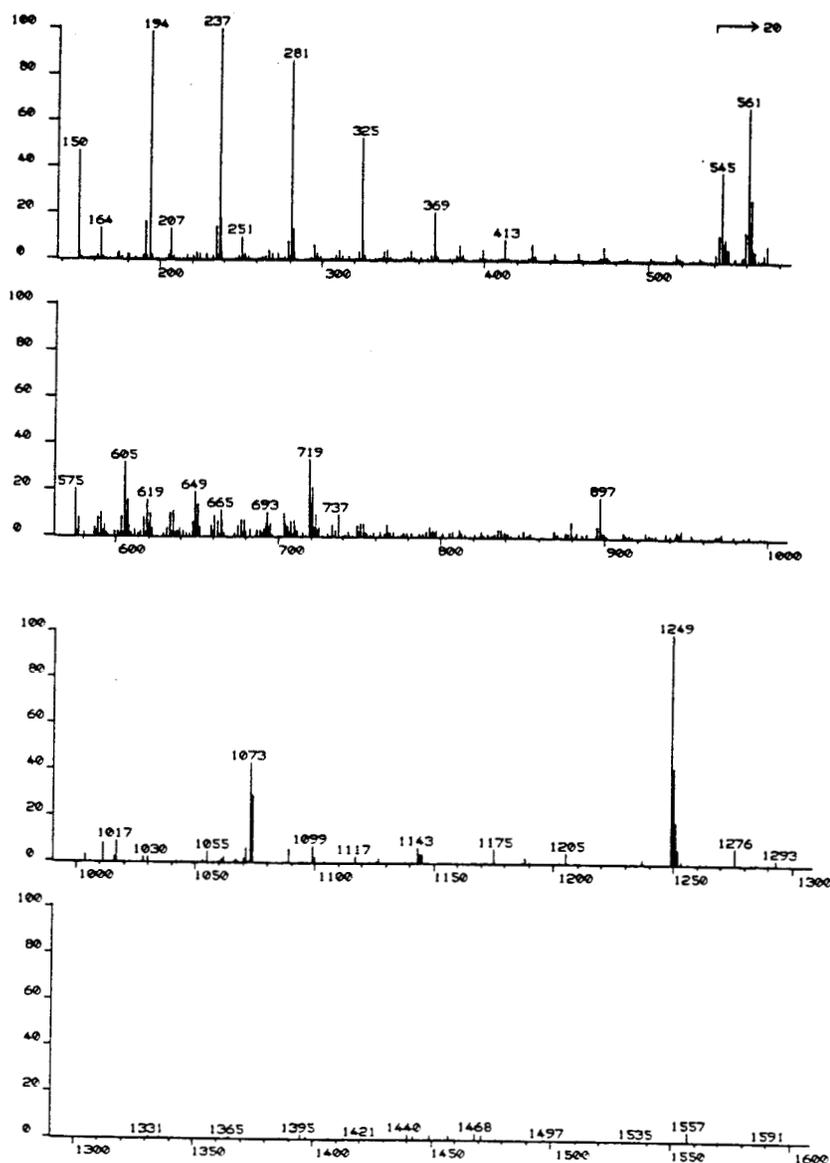


Figure 16 . - Fragmentations par FAB-MS de l'acide heptagalacturonique.

On peut observer la fragmentation séquentielle caractéristique, par pertes successives d'un résidu GalAU : m/z 1 249, 1 073, 897, 721, 545, 369, 194.

rendue possible grâce à l'emploi d'un injecteur de Ross modifié (Shimadzu), équipé d'une précolonne chargée en une phase destinée à retenir les dérivés TFA pendant l'évaporation des réactifs.

La figure 17 représente le profil d'élution des dérivés TFA de l'acide galacturonique et de ceux des différents sucres caractéristiques des polysaccharides végétaux. Les TFA majeurs de l'acide galacturonique sont au nombre de 4 et correspondent, sur le chromatogramme, aux temps de rétention de 38,04, 38,1, 46,01 et 48,5 min. Ces temps de rétention sont distincts de ceux correspondant aux autres dérivés (fig. 17-B) préparés à partir d'un échantillon de pectine de Silène.

2 - Rendement de méthanolyse

Pour chaque fragment pectique, et pour l'acide polygalacturonique, on observe les mêmes dérivés et dans les mêmes proportions que ceux du monomère GalAU. Le coefficient de réponse (C) du GalAU est calculé par rapport à l'érythritol, pour le système chromatographique utilisé :

$$\text{soit } C = (A_x \times Q_x) / (A_e \times Q_e)$$

A_x et A_e étant respectivement les aires de l'échantillon et de l'érythritol, Q_x et Q_e correspondant aux quantités pesées.

Les quantités des fragments pectiques ont été vérifiées puis corrigées par des dosages colorimétriques (métahydroxydiphénol) par rapport à une gamme d'acide galacturonique.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 3. Les coefficients obtenus avec chaque catégorie de fragments soumis à la méthanolyse sont du même ordre de grandeur. Ceci signifie que la méthanolyse est quantitative, indépendamment de la taille du fragment pectique. Une comparaison entre les résultats des dosages colorimétriques et ceux de la détermination par CPG des dérivés TFA, après méthanolyse, de diverses fractions pectiques, permet de confirmer l'obtention de valeurs sensiblement voisines.

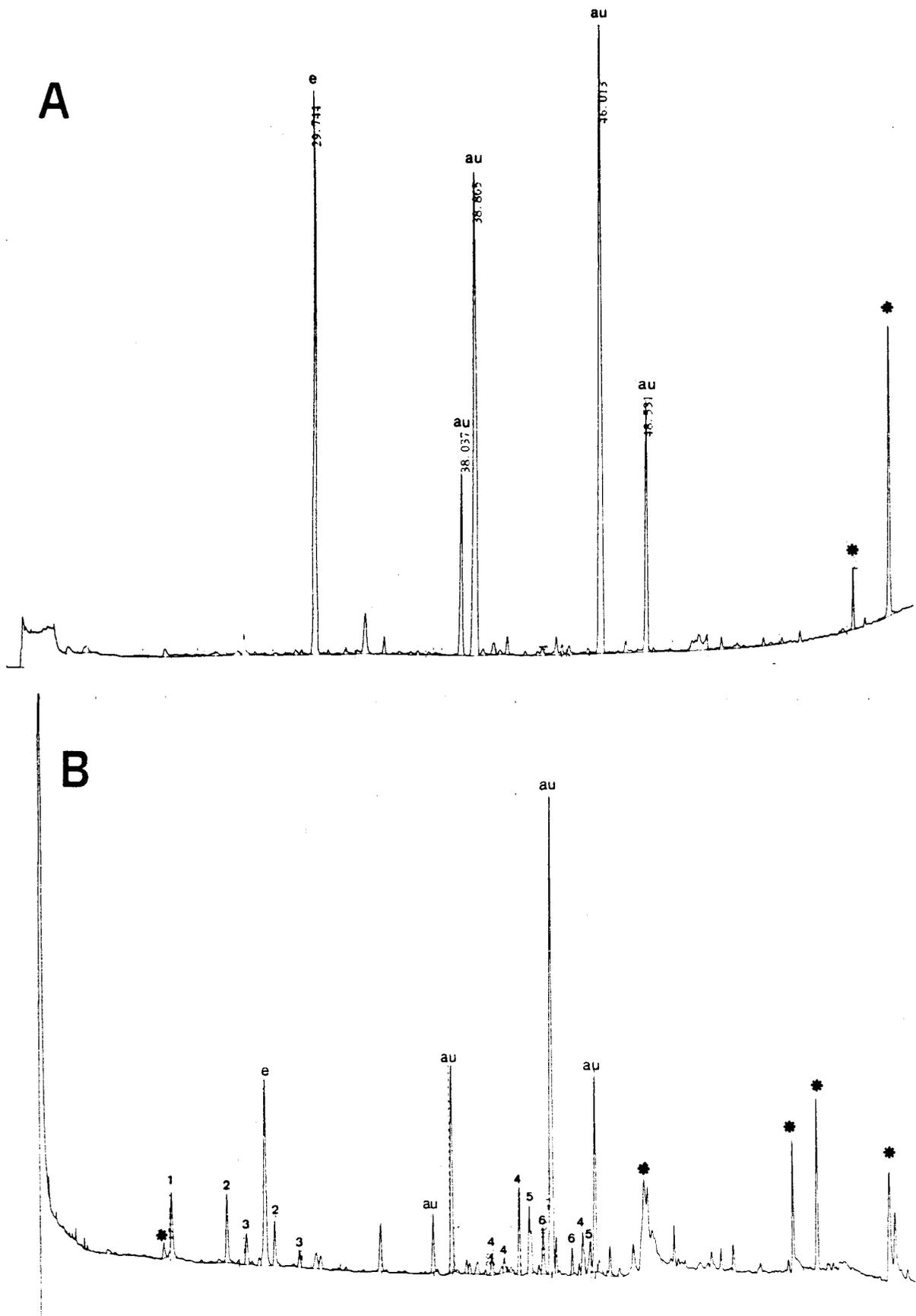


Figure 17 . - Chromatogrammes des dérivés TFA, sur colonne DB 210, injecteur à précolonne Shimadzu. (Fiche technique n° 9).

A, acide galacturonique ; B, pectine de Silène. Dérivés : 1, rhamnose ; 2, xylose ; 3, arabinose ; 4, galactose ; 5, mannose ; 6, glucose ; au, acide galacturonique ; e, érythritol ; *, colonne et réactifs.

Tableau 3 .

Relation entre la taille des fragments pectiques et le coefficient de réponse C par rapport à l'érythritol.

Degré de polymérisation	C*
1	0,50
3	0,59
4	0,69
5	0,63
6	0,42
7	0,53
8	0,40
12	0,49
Acide pectique	0,55

(*) $C = (A_x \times Q_x) / (A_e \times Q_e)$

A_x , A_e , aires d'intégrations respectives de l'échantillon et de l'érythritol ; Q_x , Q_e , quantités initiales d'échantillon et d'érythritol.

Conditions de méthanolyse, MeOH / HCl 1N, 24h, 80°C.

La méthanolyse est donc, a priori, applicable à l'analyse des polysaccharides pectiques, en particulier s'ils sont solubles initialement. Cependant, le couplage colorimétrie/acétates d'alditols sera préférentiellement employé car il est plus fréquemment utilisé dans le domaine d'étude des polysaccharides végétaux. Il est probable que l'hydrolyse acide devienne beaucoup plus efficace quand les résidus pariétaux sont insolubles, notamment s'ils contiennent de la cellulose.

III. - CARACTERISATION IMMUNOCHIMIQUE DES ACIDES OLIGO-GALACTURONIQUES* (Fiche technique n°3)

L'équipe de Van CUTSEM est parvenue à préparer une souche hybridome de souris produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre l'acide pectique (LINNERS *et al.* 1989). Le degré de reconnaissance de l'acide pectique dépend du rapport des ions bivalents (Ca^{++}) sur les ions monovalents (Na^+), il est optimal pour le rapport 1/150 qui correspond précisément aux meilleures conditions pour la formation d'egg-box.

Le premier objectif est de savoir si ces anticorps monoclonaux anti-pectine sont capables de reconnaître les fragments pectiques, et si oui, dans quelles conditions et dans quelles limites. Le second objectif est d'obtenir des informations sur le comportement physico-chimique des oligogalacturonates, en particulier par rapport au calcium.

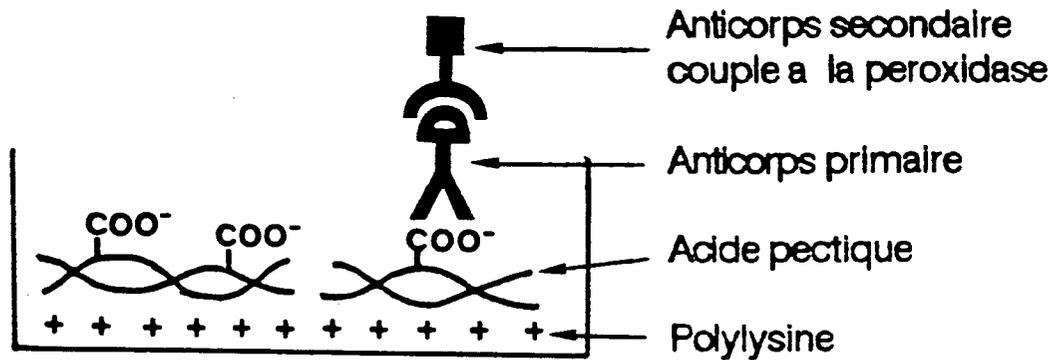
A. - Test ELISA de fixation de l'antigène

1 - Description du test

Ce test consiste, dans un premier temps, à activer les puits par de la polylysine pour permettre la fixation de l'acide polygalacturonique, antigène (Ag) de référence.

* Cette étude a été réalisée au cours d'un stage au sein du Laboratoire de Biotechnologie Théorique de l'Université Notre-Dame de Namur, dirigé par le Professeur P. Van CUTSEM, avec l'aide de F. LINNERS, étudiante dans ce Laboratoire.

On introduit ensuite l'anticorps (Ac) à la concentration adéquate. Après plusieurs rinçages, la présence de l'anticorps est révélée à l'aide d'un anticorps secondaire marqué à la peroxydase de radis.



2 - Résultats

L'expérience est réalisée en substituant à l'acide pectique 20 µg de chacun des oligoGalAU purifiés (DP1 à DP8) ou de DP12 qui correspond à une taille moyenne, déterminée par le rapport sucres totaux/sucres réducteurs.

Les réponses colorimétriques obtenues avec la peroxydase sont exprimées en % par rapport à celle de l'acide pectique :

Echantillon	1 à 8	12	ac. pect.
Réponse colorimétrique à la peroxydase %	0	5	100

Essai de reconnaissance des oligogalacturonates par le sérum anti-pectine (Ac. monoclonaux).

L'essai est négatif, sauf pour le DP12 où se manifeste une très faible reconnaissance.

L'absence de réponse des oligoGalAU de plus petite taille peut être due à la non reconnaissance de ces fragments par l'anticorps. Il est également possible que ceux-ci ne soient pas fixés sur la polylysine, au fond des puits.

Pour lever cette ambiguïté, une expérience complémentaire consistant en un test d'inhibition est réalisée.

B. - Mise au point et validation du test d'inhibition

1 - Description du test

Une gamme de dilution de l'anticorps permet de sélectionner la dilution immédiatement inférieure à la dilution optimale pour la reconnaissance de l'acide pectique (Ag témoin), ceci de façon à éviter d'ajouter dans les puits un excès d'anticorps.

Tous les puits étant préalablement activés par de l'acide pectique, l'Ac est ajouté en présence du fragment testé. Si ce fragment est partiellement reconnu par l'Ac, celui-ci ne pourra se fixer sur l'acide pectique immobilisé. S'il n'y a pas de reconnaissance, alors la fixation de l'Ac ne sera pas perturbée. Ainsi, l'exigence imposée par le test Elisa, défini précédemment, à savoir la fixation de l'Ag oligosaccharidique sur la polylysine, disparaît.

2 - Résultats

Une inhibition est observée à partir de l'heptasaccharide (fig. 18) lorsque les oligoGalAU sont utilisés en quantité suffisante (20 µg). En effet, cette inhibition s'estompe et disparaît rapidement au fur et à mesure que la dose ajoutée diminue (tab. 4). Ce sont des résultats extrêmement intéressants s'ils correspondent effectivement à une inhibition compétitive pour les sites de l'Ac. Cependant un doute subsiste ; la présence des fragments pectiques (de taille supérieure ou égale à 7) peut provoquer, en réalité, une désorption compétitive de l'acide pectique immobilisé sans pour autant être reconnu par l'Ac. L'expérience suivante est conçue pour supprimer cette restriction.

Après activation de tous les puits par de l'acide pectique, 20 µg de chacun des échantillons oligosaccharidiques sont ajoutés. Après plusieurs rinçages,

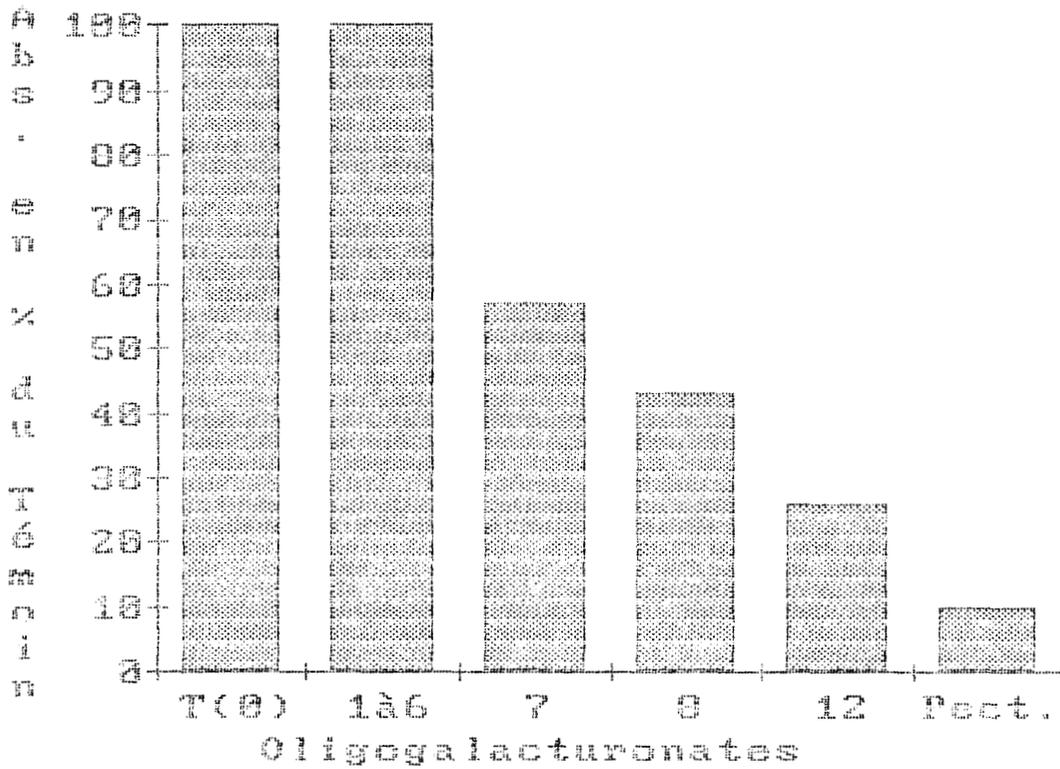


Figure 18 . - Inhibition de la reconnaissance de l'acide pectique par les anticorps monoclonaux antipectine en présence de fragments pectiques.

20 µg des oligogalacturonates (degré de polymérisation 1 à 8, et 12) ou d'acide pectique sont introduits en mélange avec les anticorps dans les puits précédemment activés par de l'acide pectique (Ag de référence), (Fiche technique n° 3).

Tableau 4 .

Influence de la dilution des oligogalacturonates et de l'acide pectique sur l'effet d'inhibition de la reconnaissance de l'acide pectique par les anticorps monoclonaux anti-pectine (Ag, antigène).

$\mu\text{g Ag}$	7	8	12	A. pectique
20,00	79,0	77,5	69,5	19,0
4,00	94,0	87,0	82,5	36,0
2,00	100	100	100	44,0
0,40	100	100	100	84,0
0,20	100	100	100	95,0
0,02	100	100	100	100

l'Ac est finalement déposé dans les puits. Si le % de reconnaissance diminue, cela signifiera qu'une désorption de l'acide pectique a été provoquée par les fragments incubés préalablement. Si, au contraire, la fixation d'Ac est la même, c'est donc que les fragments testés ne modifient pas la fixation de l'acide pectique.

Etant donné l'importance du calcium dans la reconnaissance, les incubations sont effectuées en présence de trois concentrations de cet ion (0 ; 0,1 μeq ; 0,5 μeq). L'expérience est réalisée avec la même gamme d'oligoGalAU que précédemment, avec de l'acide pectique et avec de l'eau distillée comme témoin. Les résultats présentés dans le tableau 5 sont exprimés sous forme de % par rapport au témoin eau distillée.

De manière générale, la préincubation d'oligoGalAU n'a pas d'effet sur l'adhésion de l'acide pectique dans les puits. L'inhibition observée préalablement est donc bien due à une reconnaissance spécifique de type Ag-Ac.

Un point mérite d'être signalé : on observe une baisse de reconnaissance après préincubation en présence de calcium. Ceci peut être dû à la diminution du nombre de dimères d'egg-box, reconnus par l'anticorps, au profit d'une structure multimérique.

La possibilité de faire appel à l'immunochimie pour caractériser les oligoGalAU est très intéressante. Le test Elisa, initialement utilisé avec l'acide pectique comme antigène, n'est pas efficace avec les oligosaccharides car ceux-ci ne se fixent pas sur la polylysine. La mise au point et la validation du test d'inhibition permet de démontrer que les oligoGalAU sont reconnus par les anticorps monoclonaux à partir de l'heptasaccharide. D'autres considérations concernant le comportement physico-chimique des oligoGalAU seront présentées sous forme d'hypothèses dans la discussion générale.

Tableau 5 .

Influence des oligogalacturonates et de l'acide pectique sur la désorption de l'acide pectique à différentes concentrations de calcium.

	Eau distillée	Ca 0,1 µeq	Ca 0,5 µeq
Eau distillée	100	86	75
1	100	86	77
2	100	83	74
3	100	89	79
4	100	88	72
5	100	90	80
6	100	86	87
7	100	103	91
8	100	98	89
12	100	94	75
A.pectique	100	148	125

Après activation des puits par de l'acide pectique, 20 µg d'oligoGalAU (DP 1 à 8, DP 12) ou d'acide pectique sont introduits en présence de doses variables de calcium (0, 0,1 et 0,5 µeq). Après rinçage, les anticorps sont ajoutés et la réaction immunoenzymatique développée.

IV. - EFFETS DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES SUR LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE

Au Laboratoire, MORVAN (1982) a montré que l'addition de "polymères pectiques acides" (PPA), récupérés par précipitation sélective à partir d'un milieu extracellulaire de 14 jours, provoque une augmentation significative de la croissance cellulaire. Compte-tenu que les oligogalacturonates peuvent être considérés comme des fragments simples de ces PPA, les essais réalisés s'inscrivent dans la continuité des études entreprises sur les relations structure/fonction des composés pectiques, avec pour modèle la suspension cellulaire de Silène, bien connue au Laboratoire (Fiche technique n°4). Afin d'appréhender la relation structure/fonction, l'accent sera porté sur l'importance de la taille des fragments pectiques dans les réponses observées.

A. - Etude cinétique de la croissance et de la composition des exopolysaccharides

1 - Mise en évidence d'une baisse de croissance

Pour apprécier la croissance de la suspension cellulaire de Silène, la matière fraîche est mesurée directement après la séparation des cellules de leur milieu de culture et la matière sèche par pesée des cellules après lyophilisation.

Une première expérience, effectuée avec une gamme d'oligoGalAU introduits séparément et à différentes concentrations (tab. 6), permet de constater :

- que les oligoGalAU ne modifient pas la croissance lorsqu'ils sont utilisés à faible concentration (1 mg.l^{-1}) ;
- qu'une baisse de croissance intervient dès que la concentration atteint ou dépasse 10 mg.l^{-1} , si l'on se réfère aux quantités de matière sèche. Cet effet se manifeste à partir de l'hexasaccharide (10 mg.l^{-1}) et même du tétrasaccharide, employé à plus forte dose (50 mg.l^{-1}). En présence des oligosaccharides les plus lourds (DP15), l'inhibition de la croissance est complète. Pour cet échantillon, on constate même la mort des cellules. Cette remarque, concernant l'effet toxique des grands fragments, est

Tableau 6 .

Influence de la quantité et du degré de polymérisation (DP) des oligo-galacturonates (oligoGalAU) sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène à 14 jours. (Fiche technique n° 4).

oligoGalAU DP	Quantité (mg.l ⁻¹)	M. F. (g)	M. S. (mg)
Ø	-	17,2	978
4	1	16,9	949
	10	15,9	948
	50	16,7	658
6	1	16,7	886
	10	16,5	717
	50	15,2	621
8	1	16,6	908
	10	15,7	641
	50	17,5	659
12,5	1	19,9	1 075
	10	16,1	626
	50	18,0	647
14,5	1	16,5	1 009
	10	15,5	548
	50	15,7	621
15,0	1	15,0	858
	10	15,6	627
	50	-	-

M. F., matière fraîche ; M. S., matière sèche.

Les DP 12,5, 14,5 et 15,0 ont été évalués par dosages colorimétriques.

confirmée en présence d'acide pectique (50 mg.l^{-1}) qui inhibe complètement toute croissance cellulaire. Les effets inhibiteurs observés sont moins perceptibles si l'on compare les quantités de matière fraîche. Ceci provient en partie du fait que le taux d'hydratation des cellules est inversement proportionnel à l'âge des cellules. Un retard de croissance, visible par une baisse de matière sèche, peut donc être masqué par une hydratation plus importante.

Une seconde expérience consiste à réaliser une cinétique de croissance, d'une part en présence de l'hexamère (50 mg.l^{-1}), d'autre part en présence de l'EPGase de *Colletotrichum lindemuthianum*. Il se produit une diminution de la matière sèche dans les deux cas (fig. 19). L'EPGase provoque une baisse constante du taux relatif de matière sèche, alors que les cellules s'enrichissent en eau et augmentent de volume, ce qui se caractérise par l'augmentation importante de matière fraîche.

2 - Variation de la fraction polysaccharidique extracellulaire (Fiche technique n°6)

La fraction polysaccharidique extracellulaire est mesurée au cours de la culture (tab. 7). La quantité excrétée est fonction de la croissance. Les principales différences s'observent dès le début de la culture, en présence d'EPGase et de l'hexamère : ces deux conditions provoquent environ 20 % d'augmentation de la fraction polysaccharidique totale. Par la suite, cette augmentation de l'excrétion s'annule ou s'inverse, mais de façon non significative. De plus, la composition molaire en monosaccharides est modifiée (tab. 8) : la présence d'EPGase et de l'hexamère induit une augmentation en mannose et en glucose, alors que l'arabinose et le xylose diminuent relativement. Enfin, la fraction polysaccharidique excrétée en présence d'EPGase s'enrichit en rhamnose. Pendant le reste de la culture, la proportion de mannose reste toujours sensiblement plus élevée que dans le milieu témoin, alors que les compositions molaires en glucose, arabinose et xylose s'équilibrent.

Le résultat principal de ces essais préliminaires est la mise en évidence d'un effet inhibiteur des oligogalacturonates sur la croissance des cellules de *Silène*. Cet effet est fonction de la taille et de la quantité d'oligosaccharides.

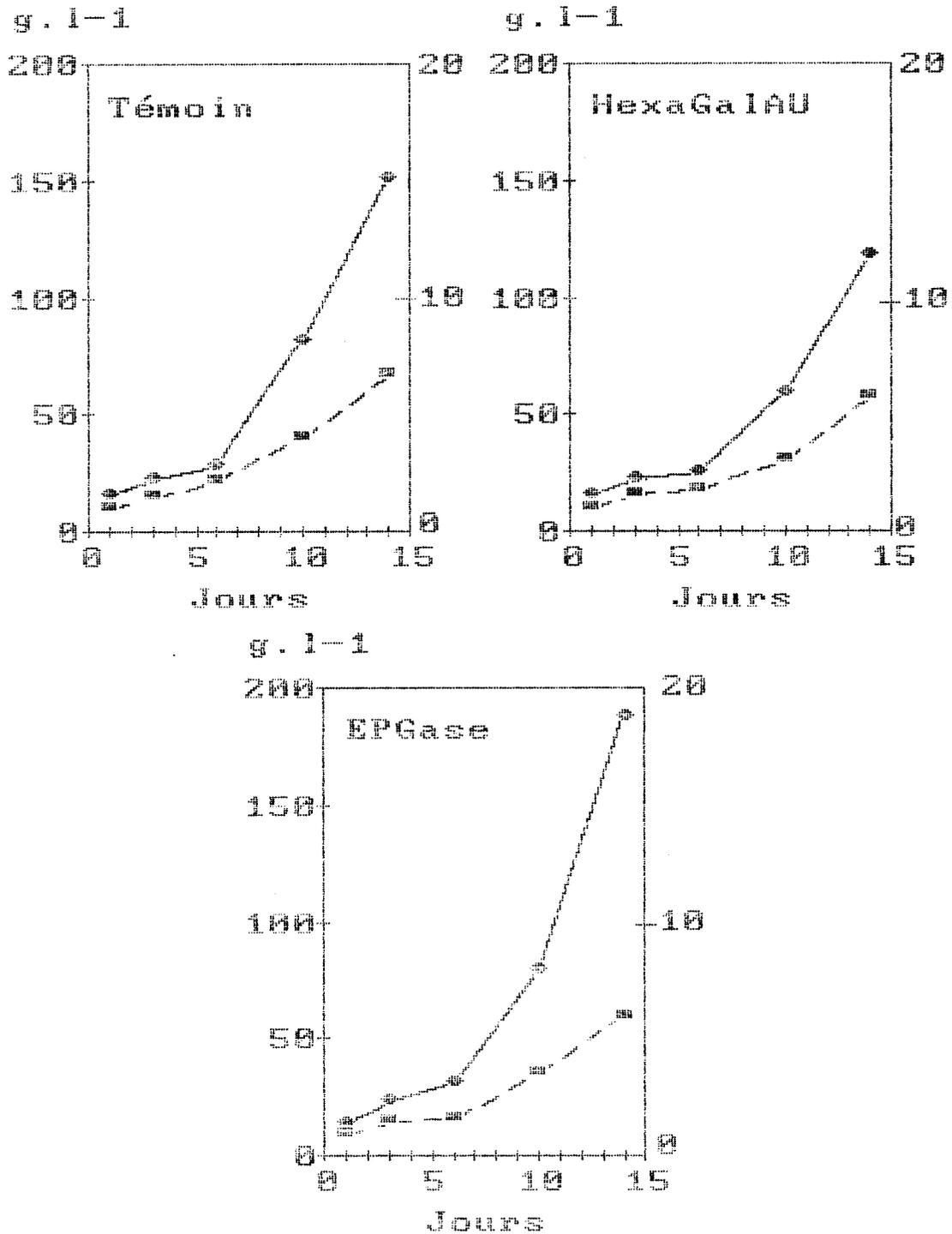


Figure 19 . - Influence de l'hexagalacturonate et d'une endopolygalacturonase sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

HexaGalAU ($50 \mu\text{g.l}^{-1}$) ; EPGase ($1,5 \text{ U.l}^{-1}$) ; (•—•—•), g de matière fraîche, échelle gauche ; (■---■---■), g de matière sèche, échelle droite.

Tableau 7 .

Evolution de la quantité d'exopolysaccharides (précipité éthanolique) au cours de la culture en présence de l'acide hexagalacturonique (HexaGalAU) et de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* (EPGase).

Jours	Témoin	HexaGalAU 50 mg.l ⁻¹	EPGase 1,5 U.l ⁻¹
1	4,4	5,9	5,4
3	14,7	14,5	13,6
6	19,3	17,2	18,9
10	68,5	45,0	55,7
14	110,3	102,2	139,0

Les résultats sont exprimés en mg de sucres totaux par fiole de culture (100 ml).

Tableau 8 .

Evolution des rapports molaires des monosaccharides neutres des exopolysaccharides (précipité éthanolique) au cours de la culture en présence de l'acide hexagalacturonique (HexaGalAU) et de l'endopolygalacturonase de *Colletotrichum lindemuthianum* (EPGase).

Jours	Ech.	Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
1	a	-	8,1	31,7	8,7	31,2	20,3
	b	-	4,7	15,0	16,3	54,0	10,0
	c	2,0	5,6	24,2	12,7	37,5	18,1
3	a	-	4,3	15,1	13,7	57,0	10,0
	b	-	4,7	14,1	14,7	56,8	9,7
	c	-	3,7	16,5	13,8	56,7	9,3
6	a	-	6,9	26,1	13,7	38,5	14,8
	b	-	6,3	23,6	14,6	40,1	14,8
	c	-	6,9	23,5	14,4	40,6	14,5
10	a	-	11,0	33,4	13,2	24,9	17,4
	b	-	11,7	28,6	17,0	24,8	17,9
	c	-	9,5	31,9	14,0	26,6	17,9
14	a	-	10,1	33,4	13,1	23,7	19,5
	b	-	11,6	32,6	13,9	21,8	20,2
	c	-	11,5	34,3	14,4	18,6	21,1

La composition en sucres a été déterminée par l'analyse des dérivés acétates d'alditols (Fiche technique n°9).

a, témoin ; b, HexaGalAU (50 mg.l⁻¹) ; c, EPGase (1,5 U.l⁻¹).

Plusieurs indices peuvent être relevés au niveau des modifications de la fraction exopolysaccharidique : les oligogalacturonates stimulent l'excrétion dès le début de la culture et cet effet disparaît par la suite. Qualitativement, les variations de la composition en monosaccharides des exopolysaccharides totaux fournissent des renseignements intéressants :

- l'apparition remarquable du rhamnose dépasse le seuil de détection après 1 jour de culture en présence de l'EPGase. Il s'agit d'un marqueur des polysaccharides pectiques qui peuvent être spécifiquement affectés par la présence de l'hydrolase ;
- l'évolution des rapports molaires en présence des oligoGalAU est similaire à celle observée en présence de l'EPGase, ce qui suggère une modification de l'excrétion pectique, qui sera confirmée dans les résultats suivants.

B. - Modification de l'excrétion des polymères pectiques acides

1 - Recherche d'une dose efficace

Pour réaliser cette série expérimentale, les oligoGalAU de DP1 à DP8 sont mélangés en quantités égales. Des essais préliminaires (tab. 9) permettent de constater que seule la dose de 10 mg/100 ml de milieu aboutit à l'obtention d'un effet qui se traduit par une baisse des EPS neutres et une forte augmentation des EPS acides. Des doses plus faibles d'oligogalacturonates sont peu ou pas efficaces. Une toxicité des oligogalacturonates vis-à-vis des cellules est constatée pour des doses plus importantes.

2 - Etude quantitative de l'excrétion des EPS neutres et acides

L'excrétion est suivie parallèlement à la croissance (fig. 20). Après 24 h de culture, les quantités de masse cellulaire diffèrent, le témoin entrant en phase exponentielle de croissance, alors que les cellules traitées sont encore en phase de latence. De plus, les performances de croissance sont largement modifiées par l'action des oligogalacturonates puisque les vitesses de croissance, pendant la phase exponentielle, sont respectivement la moitié et le double de celles des témoins (tab. 10). Les variations de l'excrétion

Tableau 9 .

Relation entre la quantité d'oligogalacturonates ajoutés dans le milieu de culture et l'excrétion des exopolysaccharides (EPS).

Oligogalacturonates ^a	0	0,1	1	10
EPS neutres ^b	0,89	0,86	0,65	0,56
EPS acides ^c	0,10	0,10	0,10	1,20

a) Les doses d'oligogalacturonates ajoutées sont exprimées en mg/100 ml de milieu de culture.

b) Les EPS neutres sont déterminés par dosage à l'orcinol sulfurique et exprimés en mg/100 ml de milieu de culture.

c) Les EPS acides sont déterminés par dosage au méthydroxydiphénol et exprimés en µg d'équivalent GalAU/100 ml de milieu de culture.

Tableau 10 .

Comparaison des paramètres de croissance des cellules de Silène en présence ou non d'oligogalacturonates dans les milieux de culture, pendant la phase exponentielle de croissance.

	Sans oligogalacturonates	Avec oligogalacturonates
Vitesse de croissance ^a = $\Delta MF / \Delta t$ *	0,22	0,11

a) Vitesse de croissance = $\Delta MF / \Delta t$; *) ΔMF , variation de la matière fraîche ; Δt , variation du temps.

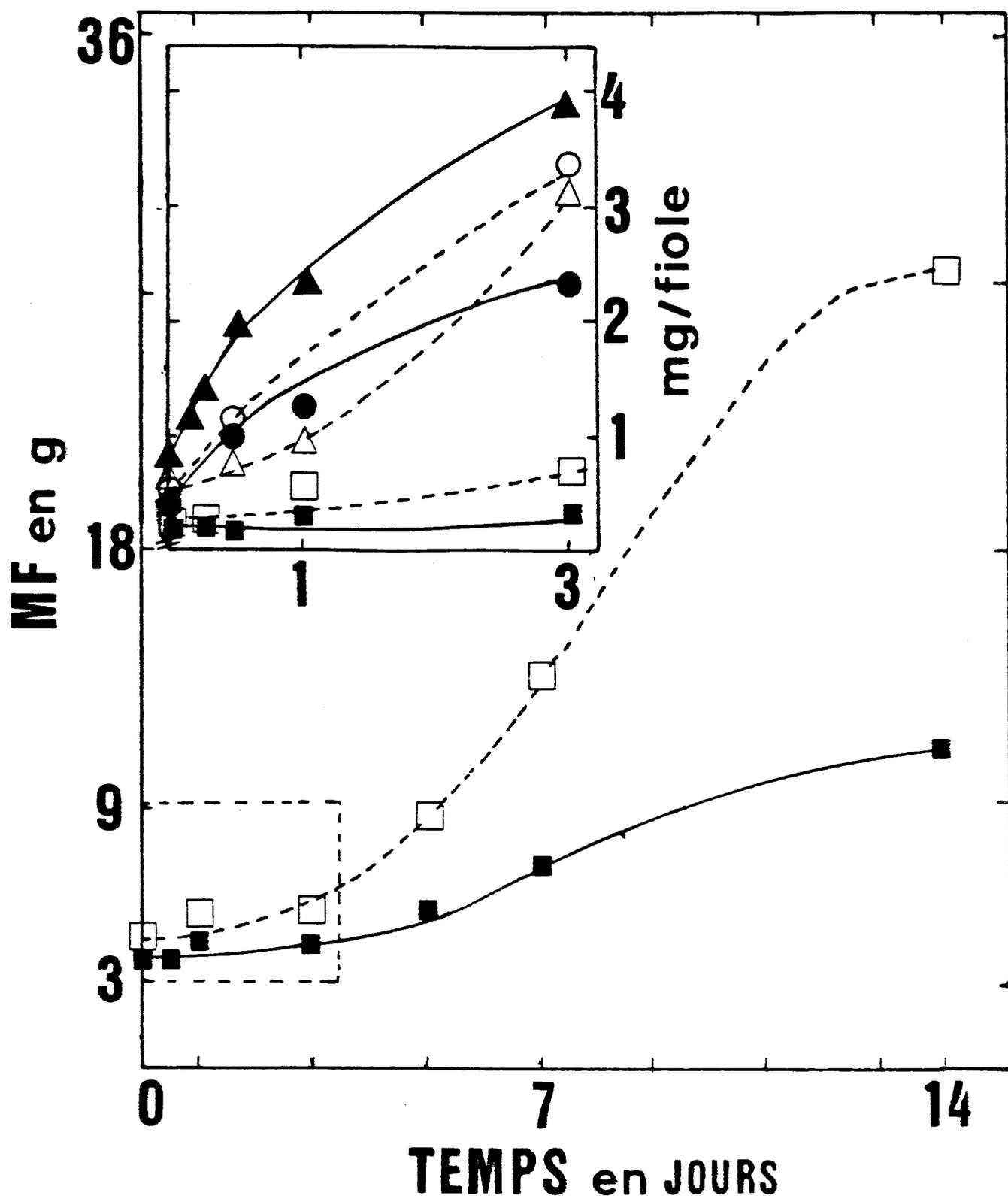


Figure 20 . - Evolution de la matière fraîche au cours du cycle de culture (■ □). Encart : excrétion des polysaccharides neutres (● ○) et acides (▲ △) isolés du milieu de culture et séparés par fractionnement sur colonne de DEAE A 50.

Les quantités d'EPS sont estimées par dosages colorimétriques (oses neutres + acides uroniques). Symboles pleins : culture en présence de 10 mg d'oligogalacturonates/100 ml de milieu. Symboles évidés : témoin sans oligogalacturonate.

observables après cette période sont à corrélérer avec l'effet inhibiteur des oligogalacturonates, les 2 paramètres évoluant parallèlement. Par contre, dans les premières heures, en phase de latence, la forte modification de l'excrétion des EPS acides est indépendante de la croissance (encart fig. 20). La quantité d'EPS acides libérés en 24 h double en présence d'oligogalacturonates alors qu'elle n'augmente que faiblement dans les milieux de culture non modifiés. Enfin, l'excrétion des EPS neutres est identique en présence ou en absence d'oligogalacturonates, au cours des 12 premières heures de culture.

Ces constatations conduisent à sélectionner les EPS acides comme marqueurs spécifiques de l'action des oligogalacturonates en raison de la précocité de la variation de leur excrétion.

3 - Variation de la productivité et de la composition des EPS acides

Pour s'affranchir des variations liées à la croissance, les quantités des différents monosaccharides composant les EPS acides sont exprimées sous forme de productivité, c'est-à-dire rapportées à la masse de cellules produites et à la durée de la culture (fig. 21).

Les productivités des monosaccharides marqueurs de la fraction acide (GalAU, Rha, Ara, Gal) suivent globalement la même évolution au cours du cycle.

Elles sont largement supérieures à celles du témoin dans les 24 h qui suivent le repiquage puis décroissent rapidement par la suite. Les écarts de productivité s'estompent au fil du cycle et s'annulent à 14 jours. L'intensification de la productivité des EPS acides dans les premières heures sous l'effet des oligogalacturonates peut être illustrée par la comparaison des rapports de production des EPS acides (quantité excrétée par gramme de cellules) calculés à partir des données précédentes en début et en fin de culture. Après 12 h, les cellules traitées ont excrété dans le milieu de culture 42,3 % de la production finale d'EPS acides (14 jours), contre seulement 15,6 % pour les cellules témoins.

L'action des oligogalacturonates a également pour conséquence une modification de la composition des EPS acides (tab. 11). En début de culture

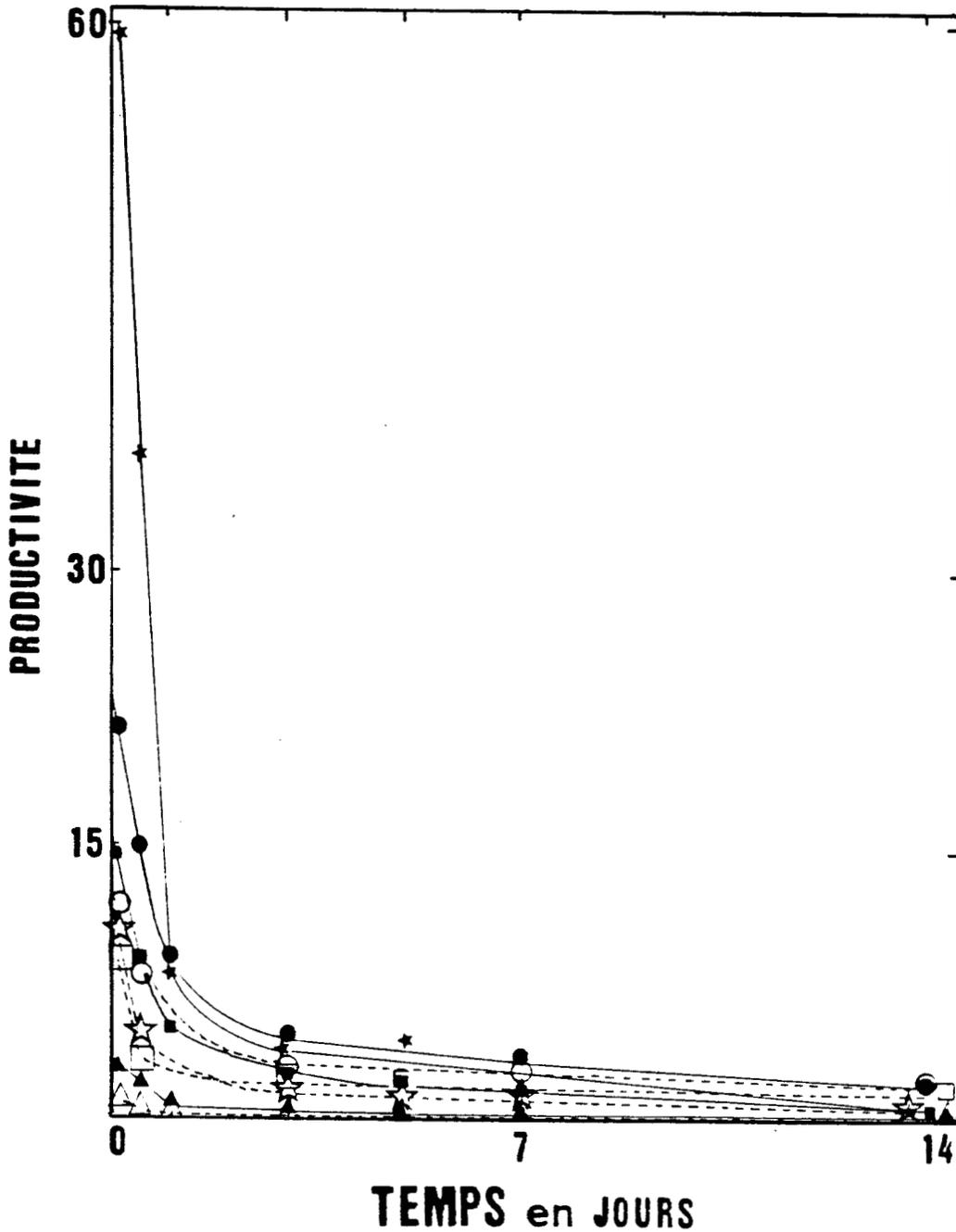


Figure 21 . - Evolution de la productivité et de la composition molaire des EPS acides.

Les quantités en μg de chacun des monosaccharides ont été estimées à partir des profils de chromatographie phase gaz sauf l'acide galacturonique (dosé par colorimétrie). La productivité correspond à la quantité de monosaccharides excrétée par gramme de cellules et par heure.

(▲△), rhamnose ; (■□), arabinose ; (●○), galactose ; (★☆), acide galacturonique. Symboles pleins : culture en présence d'oligo-galacturonates. Symboles évidés : témoin sans oligogalacturonate.

Tableau 11 .

Comparaison des pourcentages molaires des monosaccharides dans les exopolysaccharides acides, à 12 heures et à 14 jours de culture, avec ou sans oligogalacturonates.

Durée de culture	12 heures		14 jours	
	Avec	Sans	Avec	Sans
Rha	4,35	1,70	1,73	2,00
Ara	19,40	11,60	17,00	16,60
Xyl	30,70	42,00	40,20	50,10
Man	11,00	10,80	9,15	5,90
Glc	5,20	9,30	7,60	3,70
Gal	29,30	24,50	24,20	21,70
GalAU	44,50	12,00	10,80	10,80

La composition en sucres a été déterminée par l'analyse des dérivés acétates d'alditols.

(12 h), les EPS acides libérés en présence d'oligogalacturonates sont enrichis en monosaccharides caractéristiques des axes principaux (GalAU x 3,7, Rha x 2,5) et des chaînes latérales (Ara x 1,7 et Gal x 1,2) des composés pectiques. Les différences s'estompent au cours du cycle jusqu'à 14 jours où les compositions des EPS acides sont pratiquement équivalentes en présence ou non d'oligogalacturonates (tab. 11).

La présence des oligogalacturonates provoque donc une intensification de l'excrétion de la fraction pectique, phénomène limité aux premières heures de la culture.

4 - Influence du degré de polymérisation des acides oligogalacturoniques

Ces essais sont réalisés en présence d'oligogalacturonates de degré de polymérisation défini, variant de 1 à 8 et utilisés à raison de 10 mg/100 ml de milieu (fig. 22).

Après 24 h de culture, l'analyse des EPS acides montre une augmentation des oses neutres et des acides uroniques qui les composent à partir du degré de polymérisation 3.

Pour les acides galacturoniques, l'excrétion se stabilise à une valeur maximale à partir du degré de polymérisation 7. La quantité d'oses neutres dans les EPS acides augmente jusqu'au degré de polymérisation 5 et reste stable ensuite.

5 - Action des acides oligogalacturoniques sur des parois isolées

Afin d'appréhender le mode d'action des oligogalacturonates, ceux-ci sont introduits dans une suspension de parois isolées maintenues à 4°C, c'est-à-dire à une température suffisamment basse pour éviter une autolyse des parois, d'origine enzymatique. Dans ces conditions, il se produit une augmentation des exopolysaccharides dans la suspension.

Le tableau 12 présente une comparaison des résultats avec ceux obtenus **in vivo**.

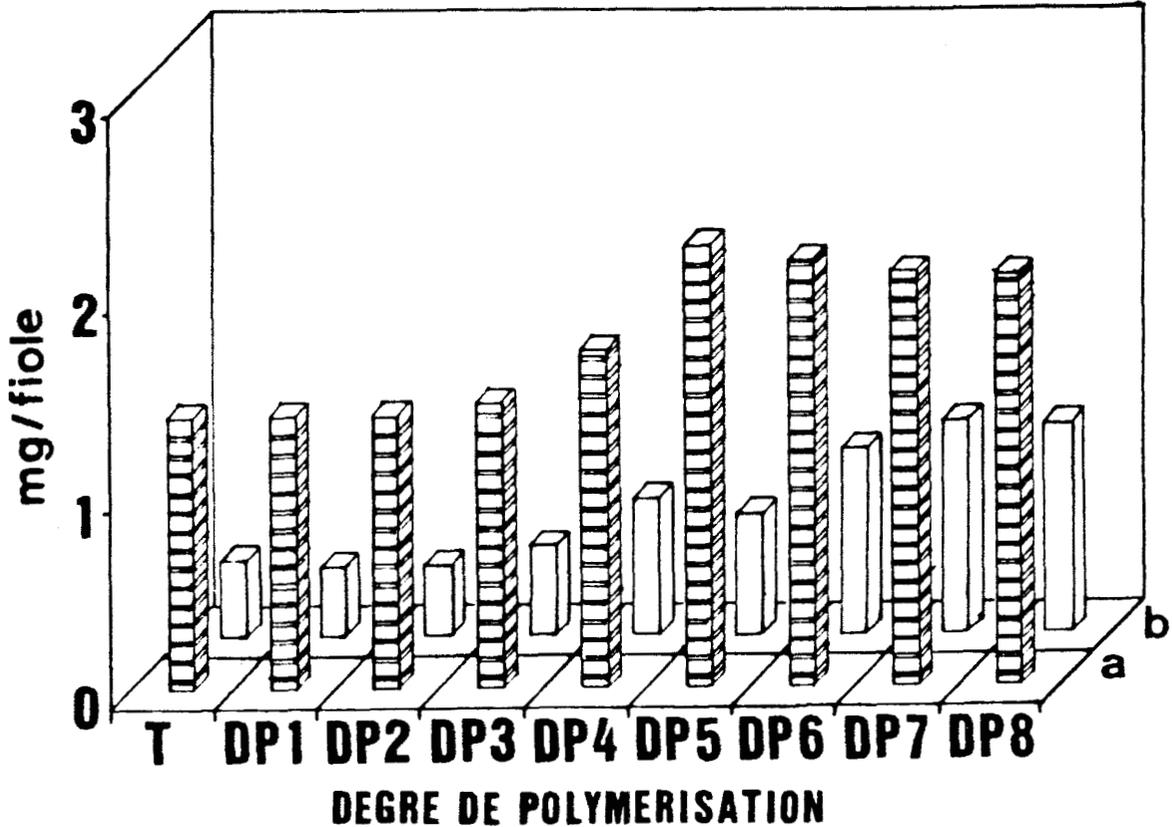


Figure 22 . - Influence du degré de polymérisation des oligogalacturonates sur l'excrétion des exopolysaccharides (EPS) acides.

Une dose d'oligogalacturonates de degré de polymérisation variant de 1 à 8 est introduite dans les milieux de culture à raison de 10 mg pour 100 ml de solution nutritive. Après 24 heures, les EPS sont isolés et fractionnés. Les quantités d'oses neutres (a) et d'acides uroniques (b) composant les EPS acides sont respectivement déterminés par dosage colorimétrique à l'orcinol et au métahydroxydiphénol.

a, oses neutres dans les EPS acides ; b, acide galacturonique dans les EPS acides.

Tableau 12 .

Comparaison des quantités d'exopolysaccharides libérés sous l'effet des oligogalacturonates (10 mg/100 ml de solution) par des cellules (*in vivo*) et par des parois isolées (*in vitro*).

	EPS totaux en mg	
	Cellules <i>in vivo</i>	Parois <i>in vitro</i>
Avec (1)	4,00	6,40
Sans (2)	2,75	5,00
Variation d'excrétion (1 - 2)	1,25	1,40

Tableau 13 .

Distribution des oses neutre et acides dans les exopolysaccharides libérés par les parois isolées, sous l'action des oligogalacturonates.

	Quantité totale excrétée en mg		% d'acide uronique
	Oses neutre	Acides uroniques	
Sans	2,27	0,26	10,20
Avec	1,62	1,60	49,70

Bien que les quantités excrétées soient différentes, les variations d'excrétion entre témoin et échantillon traité sont observables pour une même dose d'oligogalacturonates.

Qualitativement, l'excrétion concerne principalement la fraction pectique. En effet, le pourcentage d'acide galacturonique est d'environ 50 % en présence d'oligogalacturonates contre seulement 10 % pour le témoin (tab. 13). Par contre, le pourcentage des autres monosaccharides n'augmente pas contrairement à ce que l'on obtenait *in vivo*.

V. - EFFETS DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES SUR D'AUTRES MODELES BIOLOGIQUES

A. - Test d'élicitation sur le modèle tabac/virus de la mosaïque*

Les tests présentés ici s'intègrent dans un programme de recherche sur la nature et le fonctionnement d'éventuels éliciteurs oligo- et polysaccharidiques dans les mécanismes de défenses antivirales naturelles.

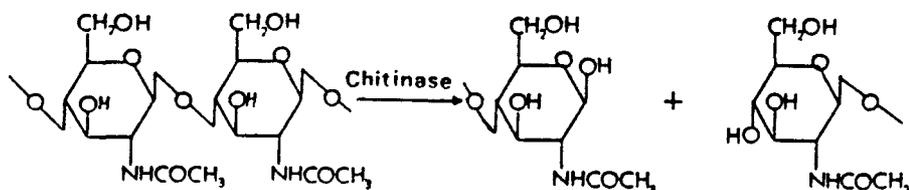
Des plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) sont artificiellement inoculés par le virus de la mosaïque du tabac (VMT), souche U1, à une concentration de 300 lésions par feuille (JAMET et FRITIG 1986). Les acides oligogalacturoniques sont soit directement mélangés à l'inoculum (coinoculation), soit injectés dans le mésophylle de la feuille 24 h avant l'injection du virus. Une étude des marqueurs biochimiques des réactions de défense est également réalisée, dans ce cas les fragments pectiques sont injectés dans le mésophylle de la feuille et l'induction de ces marqueurs est mesurée. Il s'agit d'enzymes dont l'activité est fortement stimulée en cas de réaction d'hypersensibilité :

- enzymes hydrolasiques, chitinase et β -1,3-glucanase (BOLLER 1985, KAUFFMAN *et al.* 1987, LAMB *et al.* 1987, LEGRAND *et al.* 1987) (fig. 23) ;

* Cette étude a été réalisée dans le cadre du programme d'action concertée "Oligosaccharides pariétaux : obtention, structure, effets biologiques", par Jacques ROUSTER, au Laboratoire de Virologie, sous la direction de Bernard FRITIG, IBMP, Strasbourg.

Activité chitinase

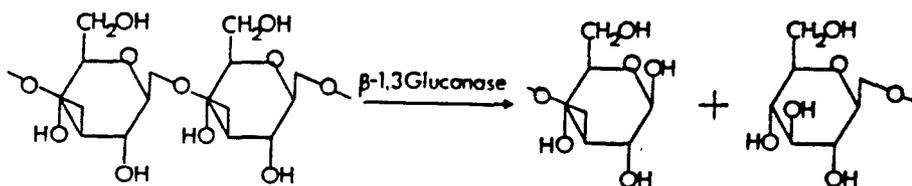
La chitinase est une hydrolase qui coupe les liaisons β 1-4 de la chitine qui est un polymère de N-acétylglucosamine.



Les produits ainsi libérés sont des oligomères de N-acétylglucosamine (NAGlc). L'activité chitinasique est mesurée par un test colorimétrique : la fonction NH_2 de la NAGlc réagit avec le 4-diméthylaminobenzaldéhyde (DMAB) pour libérer un produit (coloration rose) absorbant à 585 nm (REISSIG *et al.*, 1985).

Activité β -1,3 glucanase

Les β -1,3 glucanases sont des hydrolases qui coupent les liaisons β -1,3 entre 2 résidus glucosyl libérant ainsi la fonction réductrice du glucose.



Les produits de réaction sont donc des oligomères de glucose dont la fonction réductrice libérée va être dosée (ASHWELL, 1957). Le réactif est la laminarine, un β -1,3 polyglucane d'origine végétale.

Figure 23 . - Activités hydrolasiques, chitinase et β -1,3 glucanase.

- enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes, O-méthyltransférase (OMT) et phénylalanine-ammonia-lyase (PAL) (DIXON *et al.* 1986, JIN et WEST 1984) (fig. 24).

1 - Protection virale

Testés en coinoculation, les oligoGalAU n'occasionnent pas de diminution du nombre de lésions virales ; il semble, au contraire, que ceux-ci favorisent l'infection (tab. 14).

Le prétraitement des feuilles par les oligoGalAU avant l'inoculation n'a pas d'effet significatif ni dans un sens, ni dans l'autre (tab. 15).

2 - Marqueurs biochimiques de l'élicitation

En ce qui concerne les activités hydrolasiques (chitinase et β -1,3-glucanase), l'injection des oligoGalAU n'a pas d'effet significatif par rapport aux plantes non traitées (tab. 16 et 17).

Par contre, les marqueurs biochimiques du métabolisme des phénylpropanoïdes sont stimulés de façon significative, en particulier en ce qui concerne l'activité O-méthyltransférase où le facteur d'induction apparaît comme proportionnel à la taille (tab. 17).

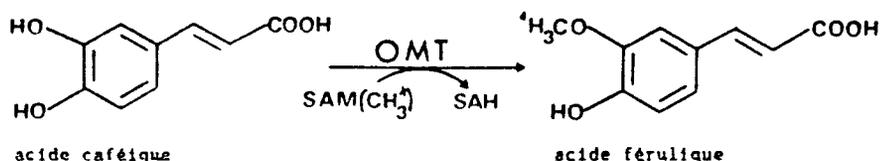
B. - Test d'élicitation sur l'hypocotyle de haricot*

Ces essais sont réalisés par excision à la base des hypocotyles, suivie d'une estimation des facteurs de stimulation des marqueurs de défense par les fragments testés. L'effet est jugé significatif si la stimulation est supérieure ou égale à 1,5.

* Cette étude a été réalisée dans le cadre du programme d'action concertée "Oligosaccharides pariétaux : obtention, structure, effets biologiques", par Claude LAFITTE, au Laboratoire de Physiologie, végétale, sous la direction de M.-T. ESQUERRE-TUGAYE, Toulouse.

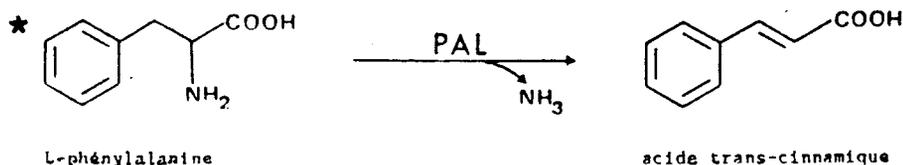
. Activité OMT

Les OMTs catalysent la monométhylation d'orthodiphénols utilisant la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle. En présence de SAM (méthyle- ^3H), la mesure de la radioactivité du produit de réaction permet d'évaluer la vitesse de la réaction enzymatique et donc de l'activité de l'extrait testé. L'orthodiphénol utilisé est l'acide caféique qui est méthylé en position méta.



. Activité PAL

La PAL catalyse l'élimination de l'ammoniac à partir de L-phénylalanine avec formation d'acide trans-cinnamique.



L'utilisation de L-phénylalanine marquée au ^{14}C permet de doser la quantité de produit radioactif formé et donc d'évaluer l'activité enzymatique.

Figure 24 . - Métabolisme des phénylpropanoïdes, activités O-méthyl-transférase (OMT) et phénylalanine-ammonialyase.

(*), marquage radioactif utilisé pour la mesure des activités enzymatiques.

Tableau 14 .

Expérience de coinoculation des oligogalacturonates de degré de polymérisation (DP) 3 à 8 ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$) avec le virus de la mosaïque du tabac (VMT) ($0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

Traitement	Nombre moyen de lésions par disque de 2 cm de diamètre
VMT (témoin)	7,4
DP3 + VMT	10,4
DP4 + VMT	12,4
DP5 + VMT	14,4
DP6 + VMT	11,5
DP7 + VMT	10,6
DP8 + VMT	21,7

L'expérience a été réalisée sur trois plantes par essai (3 fois 3 feuilles).

Tableau 15 .

Injection de l'octagalacturonate (DP8) dans une moitié de feuille, puis inoculation de la feuille entière avec le virus de la mosaïque du tabac ($0,25 \mu\text{g.ml}^{-1}$), 24 h plus tard.

Traitement	Nombre moyen de lésions par disque de 2 cm de diamètre	
	1/2 feuille injectée	1/2 feuille témoin
H ₂ O (témoin)	6,8	10,2
DP8 $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	7,5	9,6
DP8 $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$	6,8	8,5
DP8 $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$	7,9	8,3

L'expérience a été réalisée sur trois plantes par essai (3 fois 3 feuilles).

Tableau 16 .

Influence du traitement des plants de tabac par les oligogalacturonates de degré de polymérisation (DP) 3 à 15 sur l'induction des activités hydrolasiques 24 h après l'injection.

Fragment pectique	Activité biologique (Facteur de stimulation par rapport au témoin)	
	Chitinase	β -1,3-glucanase
Témoin	1	1
DP3*	0,75	0,45
DP4*	1,50	1
DP7*	1	0,55
DP8*	0,50	0,65
DP12,5**	1	0,80
DP15**	1	1

(*), 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$; (**), 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Tableau 17 .

Influence du traitement des plants de tabac par les oligogalacturonates de degré de polymérisation (DP) 3 à 15 sur l'induction des activités phénylalanine-aminolase (PAL) et O-méthyltransférase (OMT).

Fragment pectique	Activité biologique (Facteur de stimulation par rapport au témoin)	
	PAL	OMT
Témoin	1	1
DP3*	2,5	0,5
DP4*	1,7	1,3
DP5*	0,6	1,4
DP6*	1,1	1,8
DP7*	0,8	1,9
DP8*	1,7	2,7
DP12,5**	N.T.	1,6
DP15**	N.T.	2,6

(*), 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; (**), 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; N.T., non testés.

Les effets des oligoGalAU ont été étudiés ainsi que des polymères pectiques de différents poids moléculaires, et des fragments de xyloglucanes obtenus par hydrolyse enzymatique (CERMAV, Grenoble).

Seuls les oligoGaAU les plus lourds (DP15) présentent quelques effets significatifs, en particulier au niveau de la stimulation de l'activité β -1,3-glucanase et d'un inhibiteur de l'activité endopolygalacturonasique (de **Colletotrichum lindemuthianum**) (tab. 18). Ces effets ne sont pas systématiquement observés pour les polymères pectiques, hormis ceux d'un PM moyen de 2700, qui stimulent également la biosynthèse d'un inhibiteur de l'EPGase.

La stimulation de la biosynthèse des protéines HRGP (hydroxyproline-rich-glycoprotein) est observée par le traitement des polymères pectiques ; malheureusement, l'effet éventuel des oligoGalAU n'a pas été étudié dans ce cas.

Les fragments de xyloglucanes présentent les effets les plus variés, quoique très hétérogènes selon leur taille.

Tableau 18 .

Récapitulatif des effets de fragments pectiques et xyloglucanes sur la stimulation de différents marqueurs de défense de l'hypocotyle de haricot.

Fragments éliciteurs endogènes	Activité biologique (Facteur de stimulation par rapport au Témoin)				
	β -1 \rightarrow 3 glucanase	Chitinase	Inhibiteur d'endoPG	HRGP	Lignine
1- OLIGOMERES ET POLYMERES PECTIQUES					
fortement anioniques, PM^a					
2 700	1	1	1.7	1	1
6 800	1	1	1	0.8 ^c	1
22 000	1.2	1	1	0.75	1.6
38 000	1	1	1	0.6	1.3
68 000	1	1	1	0.75	1
faiblement anioniques, PM^a					
2 000	1	1.3	2	1.8	1
7 200	2.1	1.4	1.4	1.4	1
24 000	1.3	2.5	1.3	1.5	1
2- OLIGOMERES DE XYLOGLUCANE D.P.^b					
2	1	1	1	1	1.8
3	1	1	1	1	2.1
4	1	1	1	1	1.7
5	1	1	1	1	1.4
6	N.T. ^d	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
7	1.4	1	1.3	1	1
8	1.5	1.3	1.7	1	1
9	1	2.1	1.2	1	1
10	1	1	1	1	1.2
3- OLIGOMERES DE PECTATE DE NA D.P.^b					
1, 2,... à 8	1	1	1	N.T.	N.T.
12	1	1	1.2	N.T.	N.T.
14	1.3	1.1	1.4	N.T.	N.T.
a- Expérience répétée au moins 2 fois ; b- une seule expérience ; c- Effet supprimeur ; d- N.T. = Non Testé.					

Les quantités utilisées pour le traitement sont de 250 μ g d'eq acide galacturonique par plante.

EndoPG, endopolygalacturonase ; HRGP, protéines riches en hydroxyproline.

2ème partie

LES OLIGOSACCHARIDES DE LA SUSPENSION CELLULAIRE
DE SILENE ALBA.
ISOLEMENT ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

C'est en contrôlant, par chromatographie sur couche mince, la disparition du saccharose dans le milieu de culture que la présence d'oligosaccharides a été révélée. Ils sont présents en quantité suffisamment importante pour être décelés en fin de croissance (14 jours). Dès lors, il a semblé intéressant d'isoler et de caractériser ces molécules naturellement présentes dans la suspension cellulaire, pour tenter d'en préciser l'origine et la signification métabolique et, à plus long terme, faire émerger leurs éventuelles propriétés biologiques.

I. - MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION PARTIELLE D'OLIGOSACCHARIDES NATIFS EXTRACELLULAIRES

A. - Isolement d'une fraction non précipitante à partir du milieu de culture

Le principe de cette première étape est d'éliminer du milieu extracellulaire les exopolysaccharides et autres polymères qui s'y trouvent en quantité abondante, à la fin du cycle de culture (14 jours).

Les cellules sont séparées du milieu de culture par filtration sous vide, sur papier, dans un entonnoir de büchner. 1 litre de milieu extracellulaire est finalement obtenu en réunissant les filtrats de plusieurs fioles après 14 jours de culture.

Le volume du milieu brut est d'abord réduit d'environ 10 fois par évaporation sous vide. Les exopolysaccharides présents dans le milieu brut concentré sont alors précipités par addition de 3 volumes d'éthanol absolu pendant 1 nuit à 4°C. Le surnageant éthanolique qui est recueilli, après centrifugation, contient les fragments oligosaccharidiques, les monosaccharides, des sels et probablement aussi d'autres composés qui ne seront pas pris en compte dans cette étude.

B. - Tamisage moléculaire Séphacryl S200

Un premier tri moléculaire est effectué par chromatographie afin d'évaluer la répartition en taille des fragments saccharidiques non précipités.

Le profil d'élution obtenu par le dosage colorimétrique des sucres totaux met en évidence 4 fractions (fig. 25). Chacune d'elle est obtenue en réunissant les contenus des tubes d'élution qui présentent une distribution similaire lors des contrôles effectués par CCM. L'estimation pondérale, la composition en oses neutres et acides uroniques des 4 fractions sont obtenues par dosages colorimétriques [méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (1929) modifiée par RIMINGTON (1931) ; méthode au métahydroxydiphénol de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973)] (tab. 19). Enfin, la composition en monosaccharides neutres est évaluée, après hydrolyse totale (ATFA, 4N, 4 h), par CPG des dérivés acétates d'alditols et exprimée sous forme de pourcentages molaires (tab. 20) :

- la fraction F_1 , éluee à l'exclusion de la colonne, est la plus riche en acides uroniques ; du point de vue pondéral elle est cependant négligeable. Compte-tenu des proportions en acide galacturonique et en rhamnose, elle peut être considérée comme une rhamnogalacturonane, fortement ramifiée ;
- à l'autre extrémité, la fraction F_4 , qui comprend des monosaccharides et des disaccharides, est constituée à plus de 50 % par de l'arabinose ;
- les fractions F_2 et F_3 présentent des distributions voisines en oses neutres et acides. Les monosaccharides principaux sont le xylose, le mannose et le glucose. La fraction F_2 , qui n'est pas déplacée par le solvant de CCM, comprend des oligosaccharides plus lourds. C'est la fraction F_3 , susceptible de recéler des oligosaccharides suffisamment légers, qui est sélectionnée pour la suite du fractionnement.

C. - Electrophorèse sur papier (Fiche technique n°14)

L'utilisation de cette technique permet d'obtenir la séparation des oligosaccharides en fonction de leur charge apparente. Un essai préalable de séparation a été effectué par chromatographie d'échange d'ions (Dowex 1 x 2), mais la présence résiduelle de sels a gêné la fixation des oligosaccharides acides. Finalement, la totalité de la fraction F_3 a été soumise à une électrophorèse sur papier, en raison notamment de son efficacité d'éliminer les sels.

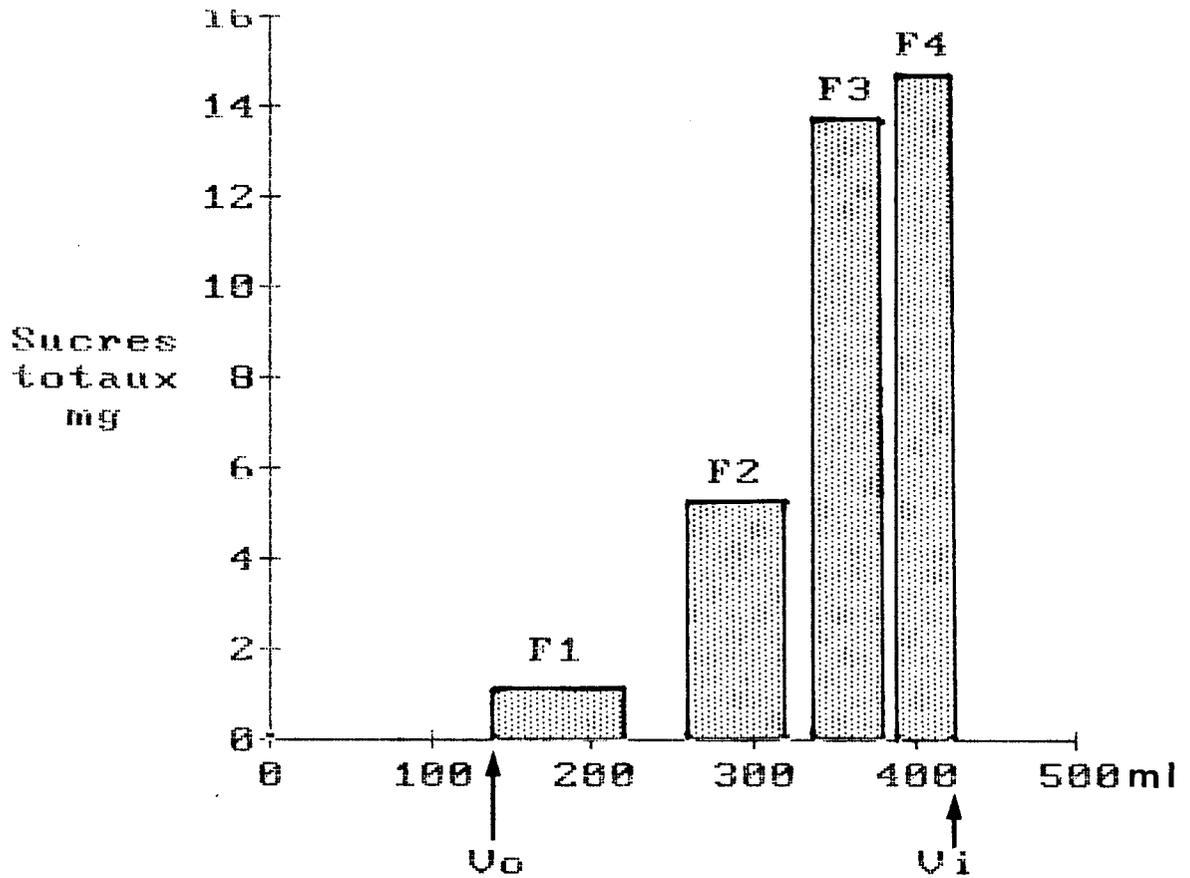


Figure 25 . - Profil d'éluion de la chromatographie-tamissage moléculaire sur Séphadex S 200 de la fraction non précipitante.
 Colonne 135 x 2,2 cm, H₂O, 30 ml.h⁻¹.

Tableau 19 .

Distribution pondérale (sucres totaux, ST) et composition en acides uroniques (AU) et en oses neutres (ON) des fractions F 1, F 2, F 3 et F 4 obtenues par tamisage moléculaire Séphacryl S 200 de la fraction non précipitante.

	ST mg	AU %	ON %	Rdt %
Dépôt	44,08	10	90	100
F 1	0,98	27,4	72,6	2,2
F 2	5,23	13,2	86,8	11,9
F 3	13,58	14,0	86,0	30,8
F 4	14,38	10,0	90,0	32,6

Tableau 20 .

Composition en monosaccharides neutres (% molaire) des fractions après tamisage moléculaire sur Séphacryl S200.

	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
F 1	10,3	3,2	8,9	11,1	6,7	45,7	14,0
F 2	-	-	23,3	34,2	15,1	18,3	9,1
F 3	1,2	8,8	7,3	24,8	22,1	24,9	11,4
F 4	4,9	3,5	54,6	11,1	7,7	12,7	5,6

La composition en sucres a été déterminée par l'analyse des dérivés acétates d'alditols.

Rha, rhamnose ; Fuc, fucose ; Ara, arabinose ; Xyl, xylose ; Man, mannose ; Glc, glucose ; Gal, galactose.

Les oligosaccharides se séparent selon 2 zones bien distinctes : l'une, appelée F_3NR_a , qui a migré vers l'anode, manifestant ainsi son caractère acide ; une seconde, nommée F_3NR_n , ne s'est déplacée que très légèrement dans le même sens.

D. - Chromatographie préparative sur papier (Fiche technique n°14)

Cette chromatographie est réalisée successivement sur les 2 fractions séparées par électrophorèse. La figure 26 représente le profil du chromatogramme après révélation analytique par l'oxalate d'aniline.

La fraction F_3NR_a est constituée d'une espèce majoritaire, appelée fraction 1-1. Une chromatographie sur couche mince (fig. 27) montre que cette dernière comprend en fait plusieurs oligosaccharides. Celui d'entre eux qui migre le plus loin est aussi le plus abondant. Dans les mêmes conditions, la fraction F_3NR_n présente 4 taches migrantes (2-4, 2-3, 2-2, 2-1) et un reste de dépôt n'ayant pas migré (2-sup). La chromatographie de contrôle sur couche mince montre qu'aucune de ces fractions n'est pure, mais que chacune d'elles contient un oligosaccharide principal.

La composition en monosaccharides de l'ensemble des fractions (tab. 21) est établie à partir des dérivés méthylglycosides trifluoroacétylés (TFA). Cette méthode offre l'avantage de pouvoir analyser simultanément les monosaccharides neutres et acides, ainsi que la glucosamine.

Le constituant majoritaire de la fraction F_3NR_a est l'acide galacturonique. La composition des autres fractions montre que le xylose, le mannose et le glucose caractérisent les fractions migrantes, alors que l'arabinose et le galactose sont les principaux constituants de la fraction 2-sup, la plus lourde. Le résultat intéressant et inattendu de cette analyse concerne la glucosamine qui est présente dans toutes les fractions et plus particulièrement dans celles issues de F_3NR_n où elle figure en proportions importantes.

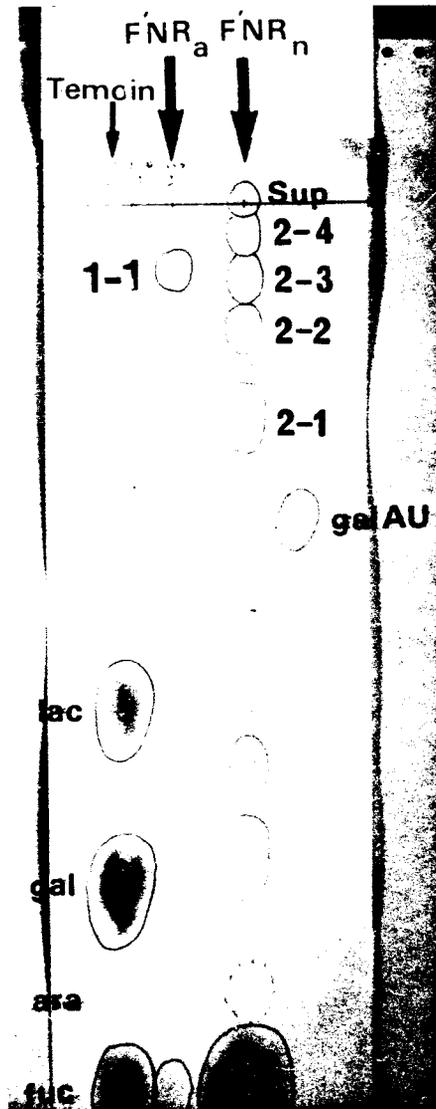


Figure 26 . - Chromatographie sur papier des fractions F'NR_a et F'NR_n.

L'ordre de numérotation correspond à l'ordre de migration, (Fiche technique n° 13).

lac, lactose ; gal, galactose ; ara, arabinose ; fuc, fucose ; galAU, acide galacturonique.

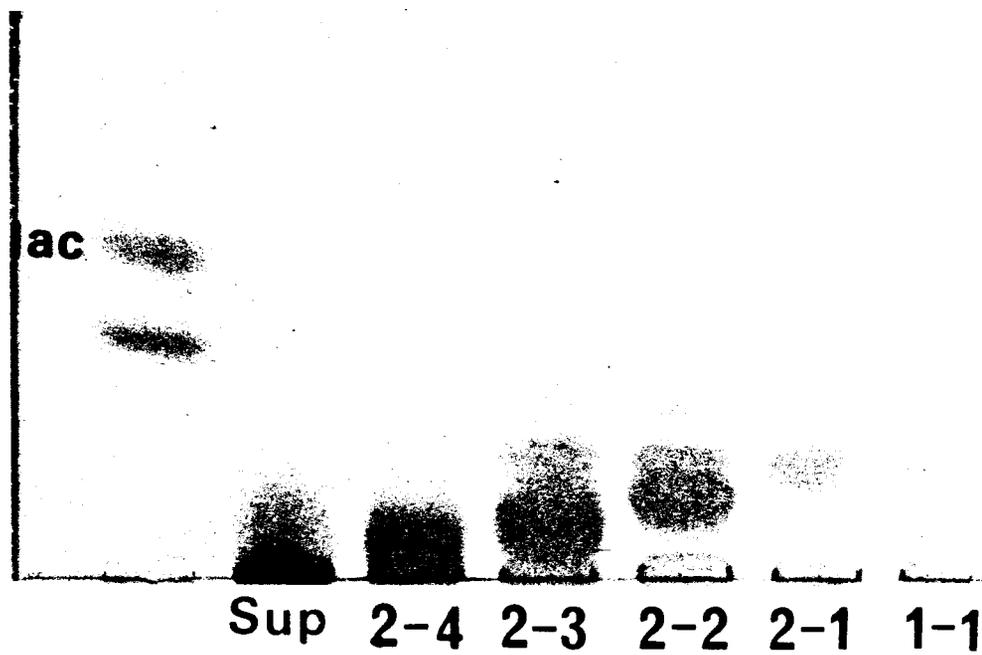


Figure 27 . - Estimation du degré de pureté, sur couche mince, des oligosaccharides purifiés par chromatographie sur papier.

Solvant : butanol - acide acétique - eau (2:1:1), double migration.
lac, lactose.

Tableau 21 .

Rapports molaires des monosaccharides des fractions F3NRa et F3NRn (1, 2, 3, 4 et sup) après chromatographie sur papier de la fraction F3NR.

Monosaccharides	Fuc	Gal	Man	Glc	Rha	GlcNAc	Ara	Xyl	GalAU
F 3 N R a	0,02	0,10	0,10	0,08	0,09	0,07	0,05	0,09	1,00
1*	0,08	0,42	1,00	0,51	0,05	0,27	0,16	0,48	0,00
2	0,05	0,14	0,75	0,65	0,03	0,23	0,13	1,00	0,00
F 3 N R n	0,14	0,36	1,00	0,72	0,11	0,58	0,16	0,74	0,22
3	0,14	0,36	1,00	0,72	0,11	0,58	0,16	0,74	0,22
4	0,10	0,65	0,75	0,72	0,06	0,27	0,59	1,00	0,03
Sup	0,07	0,79	0,38	0,82	0,08	0,17	1,00	0,52	0,01

* L'ordre de numération correspond à l'ordre de migration. La fraction "sup" est celle qui n'a pas migré.

La composition en sucres a été déterminée par l'analyse des dérivés méthylglycosides trifluoroacétylés.

Fuc, fucose ; Gal, galactose ; Man, mannose ; Glc, glucose ; Rha, rhamnose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; Ara, arabinose ; Xyl, xylose ; GalAU, acide galacturonique.

E. - Conclusion

Cette étude préliminaire met en évidence, en même temps qu'elle évalue, la composition et l'hétérogénéité des composés glucidiques du milieu extracellulaire, débarrassés des exopolysaccharides.

Un mélange d'oligosaccharides acides (F_3NR_a), riche en acide galacturonique, a été isolé par électrophorèse à partir de la fraction oligosaccharidique F_3 , isolée par tamisage moléculaire. Les oligosaccharides représentatifs de cette fraction seront analysés plus en détail ultérieurement.

En ce qui concerne la fraction oligosaccharidique F_3NR_n , très hétérogène, la poursuite du fractionnement nécessitera de préparer préalablement des quantités suffisantes de milieu extracellulaire pour parvenir à la purification des oligosaccharides neutres.

La présence de glucosamine dans la plupart des enrichissements est un résultat nouveau qui doit être pris en considération dans la suite des travaux, notamment en ce qui concerne le mode de préparation des acétates d'alditols, où il faudra veiller à substituer l'acide acétique à la résine Dowex/ H^+ pour l'arrêt de la réduction, afin d'éviter que la glucosamine ne soit piégée dans la résine.

Pour la préparation ultérieure des échantillons, la première étape de fractionnement par précipitation sélective dans l'éthanol sera maintenue. Par contre, les oligosaccharides totaux seront débarrassés des sels contaminants à l'aide d'un gel plus réticulé que le gel Séphacryl S200, avant toute purification (Séphadex G10). L'étape d'électrophorèse sur papier, permettant d'isoler les oligosaccharides acides, sera conservée ou remplacée par toute autre technique fondée sur une séparation en fonction de la charge. En dépit de ses qualités préparatives, la chromatographie sur papier sera exclue pour des raisons pratiques (faibles quantités) et remplacée par une chromatographie sur Biogel P2, suivie de fractionnement par HPLC.

II. - CARACTERISATION DES OLIGOSACCHARIDES ACIDES

L'objectif du travail est d'identifier les oligosaccharides acides présents dans le surnageant extracellulaire. On utilisera pour cette étude la fraction 1-1, purifiée préalablement par électrophorèse et par chromatographie sur papier.

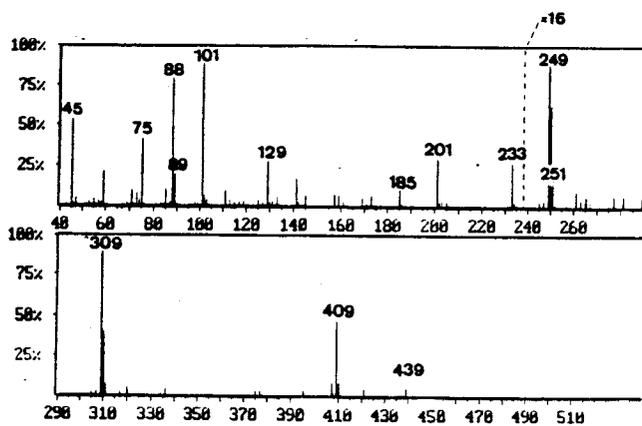
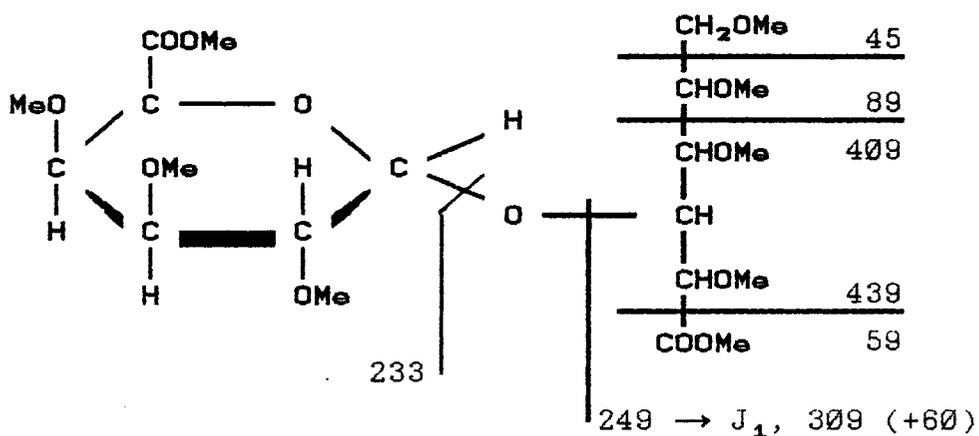
A. - Chromatographie sur couche mince

Le principe de cet essai est de comparer, par chromatographie sur couche mince, le contenu oligosaccharidique de la fraction 1-1 à des témoins d'oligogalacturonates purifiés au Laboratoire. Le résultat le plus démonstratif est la constatation que le spot majeur caractéristique de la fraction 1-1 migre de la même façon que le digalacturonate (fig. 28). Le caractère très résolusif de la technique et l'analyse de la composition molaire sont 2 arguments en faveur de l'identification de l'espèce oligosaccharidique acide majeure comme étant un dimère d'acide galacturonique. Les 2 autres spots, qui correspondent à des oligosaccharides plus lourds présents dans la fraction 1-1, ne s'identifient pas exactement aux témoins oligogalacturonates ; il s'agit probablement des mélanges d'oligosaccharides dont le constituant principal est l'acide galacturonique et dont les valeurs de DP sont estimées entre 3 et 5. Leur caractérisation définitive n'a pas été possible à cause de l'insuffisance pondérale des échantillons.

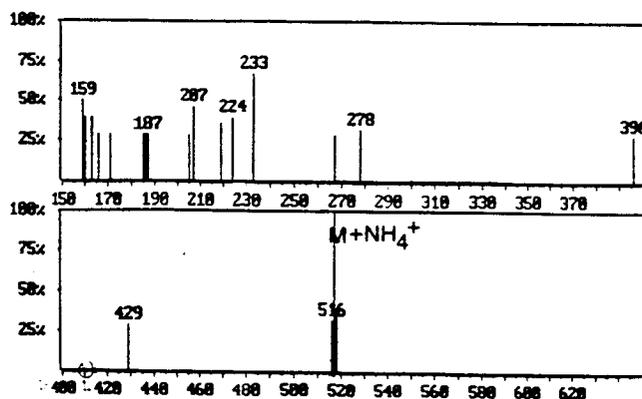
B. - Méthylation, CPG-MS* (Fiches techniques n°10 et 11)

La fraction 1-1 a été soumise à une méthylation, après réduction par le KBH_4 . Les dérivés, suffisamment volatils en raison de leur faible taille, ont été directement analysés par spectrométrie de masse, en impact chimique (confirmation de la masse) et électronique (fragmentations). Les résultats, présentés en figure 29, confirment la structure d'un dimère de résidus hexuroniques liés en 1-4. L'analyse préalable des dérivés méthylglucosides trifluoroacétylés ayant affirmé la nature galacturonique du résidu acide, ces fragments peuvent être considérés comme d'origine pectique.

* La méthylation et la spectrométrie de masse des oligosaccharides acides ont été réalisées au Laboratoire de Chimie-Biologique de Lille, avec l'aide de T. FONTAINE et de M. le Prof. FOURNET.



A



B

Figure 29 . - CPG-MS de l'oligosaccharide majeur de la fraction FNRA, après réduction (KBH₄) et perméthylation, et molécule proposée sur la base des fragmentations en impact électronique (A) et de l'ion moléculaire (M + NH₄⁺) identifié en impact chinique (B).

C. - Conclusion

Le milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène contient des oligosaccharides riches en acide galacturonique, l'espèce majoritaire étant l'acide digalacturonique. Celui-ci a été isolé à partir d'un litre de milieu de culture de 14 jours, et sans pouvoir établir avec précision sa concentration ; elle est très approximativement de quelques mg.l^{-1} .

III. - PURIFICATION ET CARACTERISATION DES AUTRES OLIGOSACCHARIDES NATIFS

L'organigramme du protocole de purification, qui est adopté pour préparer et isoler les oligosaccharides, est représenté sur la figure 30. La masse cellulaire représente, à ce stade, environ 200 g de matière fraîche par litre de milieu.

A. - Obtention de la fraction oligosaccharidique neutre

1 - Précipitation éthanolique de la fraction polysaccharidique

Cette étape permet l'élimination des polysaccharides extracellulaires. La fraction précipitante, F_1 , contient 7,9 g de sucres totaux (tab. 22) et sa composition correspond classiquement à un mélange d'exopolysaccharides. Le surnageant éthanolique (F_2), qui ne représente que 197 mg de sucres totaux et constitue un mélange de mono- et d'oligosaccharides, est conservé pour la suite du fractionnement.

2 - Chromatographie sur Séphadex G10 (colonne 90 x 2 cm, H_2O)

Cette étape permet de dessaler et de débarrasser les oligosaccharides des monosaccharides "contaminants". La fraction lourde (F_3), éluee la première, correspond aux oligosaccharides totaux tandis que la fraction plus retardée (F_4) comprend des monosaccharides et des sels.

La fraction oligosaccharidique totale (F_3) contient 96 mg de sucres totaux, dont 5 % environ d'acide galacturonique (tab. 22).

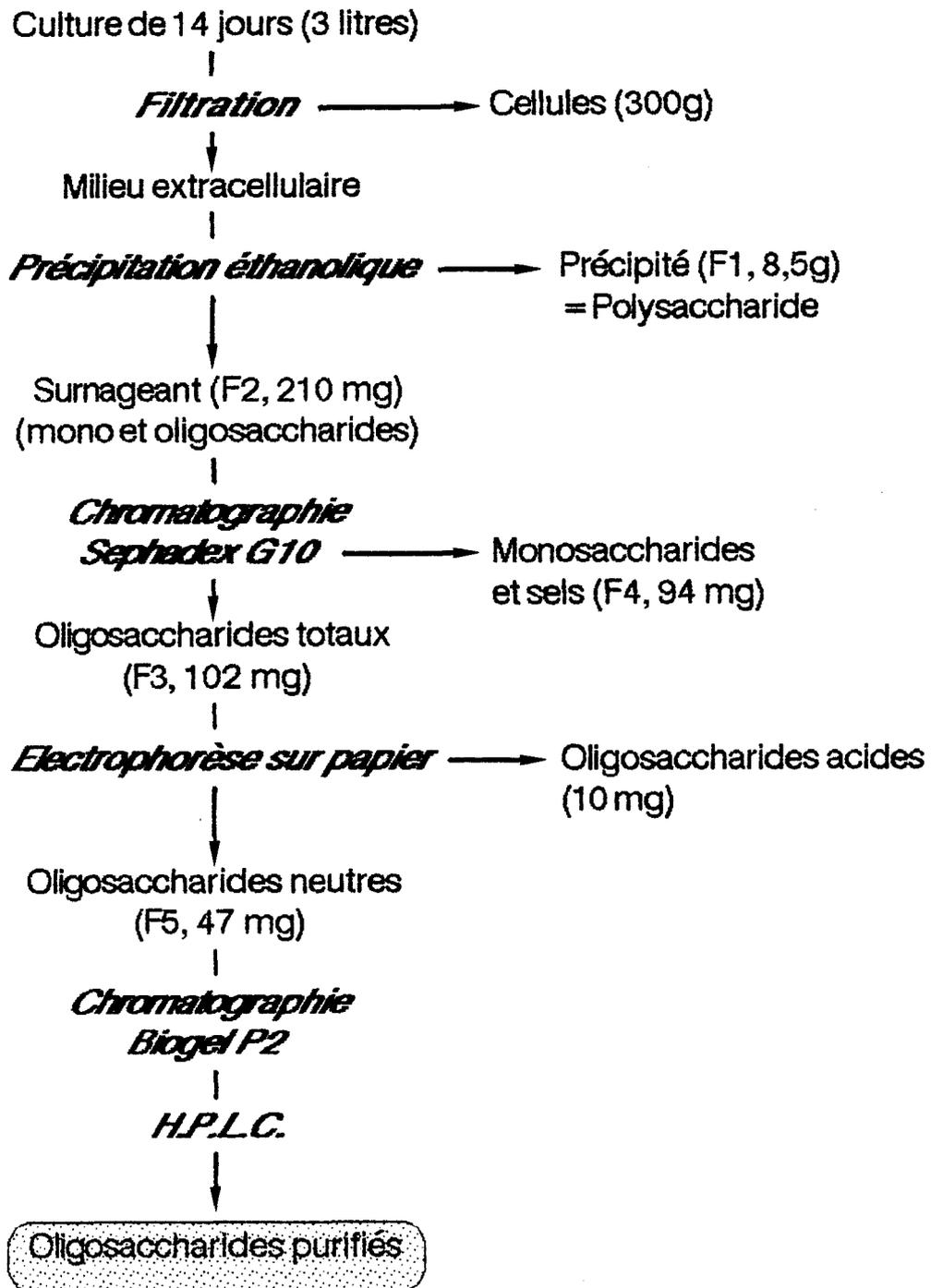


Figure 30 . - Protocole de purification des oligosaccharides neutres du milieu extracellulaire.

Tableau 22 .

Préparation de la fraction oligosaccharidique neutre.

Fractions		F 1	F 2	F 3	F 4	F 5
Sucres uroniques mg		615,0	15,0	5,5	9,0	-
Sucres neutres mg		7 880,0	197,0	96,0	85,0	47,0
	Rha	2,0	3,2	7,1	1,0	1,2
%	Fuc	-	3,6	1,6	-	3,4
M	Ara	11,5	21,4	10,7	4,5	13,8
O	Xyl	19,9	10,0	18,1	28,5	13,3
L	Man	15,7	18,0	17,0	11,2	30,7
A	Glc	32,2	37,6	19,0	42,3	13,5
I	Gal	18,5	6,2	26,4	12,5	15,0
R	GlcN	-	traces	traces	-	5,0
E						

La composition en sucres a été déterminée par l'analyse des dérivés acétates d'alditols.

F1 et F2 ont été obtenus par précipitation éthanolique : F1, précipité et F2, surnageant. F3 et F4 proviennent du fractionnement sur Séphadex G10 de la fraction F2 : F3, oligosaccharides et F4, monosaccharides et sels. F5 représente la fraction neutre récupérée après électrophorèse sur papier de la fraction F3.

Rha, rhamnose ; Fuc, fucose ; Ara, arabinose ; Xyl, xylose ; Man, mannose ; Glc, glucose ; Gal, galactose ; GlcN, glucosamine ou N-acétylglucosamine.

3 - Electrophorèse sur papier

Cette technique, qui nous a permis de préparer les oligosaccharides acides que nous avons analysés précédemment, est utilisée ici pour débarrasser la fraction neutre des fragments acides ainsi que des restes de sels. La fraction oligosaccharidique neutre, appelée F₅, se révèle riche en mannose (30 % mol.), elle contient également de la glucosamine (5 % mol.) (tab. 22).

B. - Purification des oligosaccharides neutres majoritaires

1 - Chromatographie sur Biogel P2

Une première séparation a été effectuée sur Biogel P2, qui est un support chromatographique très utilisé pour fractionner des oligosaccharides de taille moyenne. Le profil d'éluion correspondant est représenté sur la figure 31. 5 fractions ont été séparées sur la base du profil obtenu par le dosage des oses totaux et d'un repérage par CCM des espèces oligosaccharidiques contenues dans chaque tube.

La composition de ces fractions est mentionnée dans le tableau 23.

- La fraction A, la plus importante (40 %), renferme les fragments les plus lourds. Elle est riche en arabinose, en galactose et en rhamnose. Or, il s'agit de sucres caractéristiques des chaînes latérales de polysaccharides pectiques de type rhamnogalacturonane. Ce résultat est à rapprocher de l'analyse de la fraction 2-sup, fraction non migrante obtenue par chromatographie sur papier, qui était également riche en arabinose et en galactose (cf. tab. 21). La purification de ces arabinogalactanes qui sont en cours de caractérisation au Laboratoire dans le cadre d'une étude structurale complète des polysaccharides extracellulaires (SOLO-KWAN J.), n'a pas été entreprise ici.

- Les fractions B, C et D ont en commun de renfermer de la glucosamine :

- . la fraction B, minoritaire, n'est pas représentative du fractionnement entrepris dans la mesure où sa composition ne permet pas

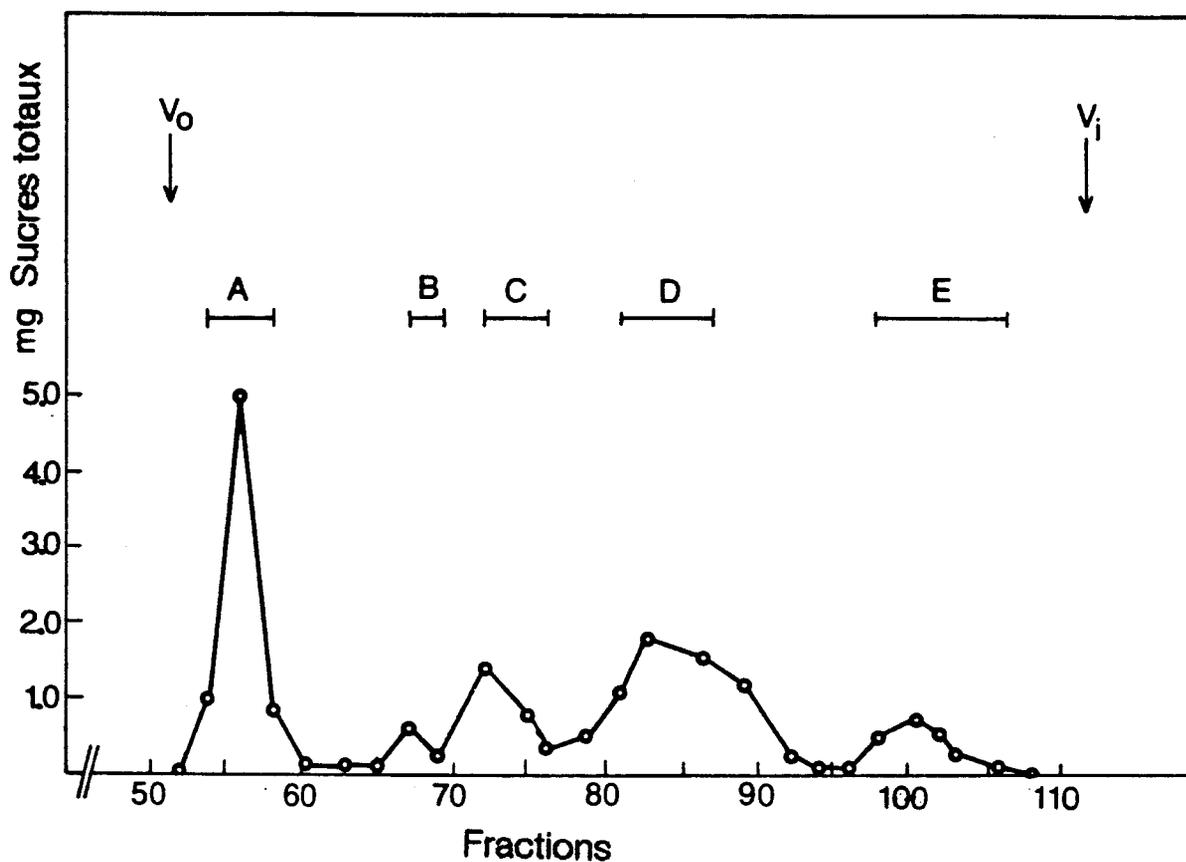


Figure 31 . - Profil d'élution de la fraction oligosaccharidique neutre F5.

La fraction F5, purifiée par électrophorèse sur papier, a été lyophilisée et dissoute dans 10 ml d'eau distillée. La colonne (129 x 2,7 cm) est éluée par l'eau avec un débit de 30 ml.h⁻¹, à raison de 4,2 ml par tube. Les sucres sont estimés par dosage à l'orcinol. Une analyse par chromatographie sur couche mince est réalisée sur les tubes orcinol positifs. Les fractions A, B, C, D et E, sont rassemblées suivant leur profil CCM.

Tableau 23 .

Composition en monosaccharides des fractions A, B, C, D et E obtenues par chromatographie sur Biogel P2 de la fraction oligosaccharidique neutre (F5). (Analyse par CPG des dérivés acétates d'alditols).

Fractions		A	B	C	D	E
Sucres neutres mg		13,9	1,0	4,7	10,9	6,0
	Rha	7,6	4,7	-	-	-
%	Fuc	-	5,0	16,6	-	-
M	Ara	48,3	10,8	-	-	3,6
O	Xyl	7,6	16,4	15,5	9,6	13,1
L	Man	11,7	33,5	39,4	66,0	11,8
A	Glc	6,9	14,0	5,5	11,0	18,7
I	Gal	18,0	12,7	3,0	4,7	53,0
R	GlcN	-	3,1	20,0	7,1	-
E						

Rha, rhamnose ; Fuc, fucose ; Ara, arabinose ; Xyl, xylose ; Man, mannose ; Glc, glucose ; Gal, galactose ; GlcN, glucosamine ou N-acétylglucosamine.

de distinguer une spécificité. En outre, la faible quantité de sucres totaux (1 mg) ne permet pas de poursuivre la purification ;

- . la fraction C renferme, comme sucres caractéristiques, le mannose et la glucosamine mais elle contient aussi en quantités non négligeables du fucose et du xylose ;
 - . la fraction D, à l'instar de la fraction C, est riche en mannose et en glucosamine. Cette dernière est toutefois présente en quantité plus faible. De plus, le xylose et le glucose représentent ensemble 20 % du total des sucres de cette fraction.
- La fraction E se caractérise par la prédominance du galactose (53 %). Les autres résidus sont par ordre décroissant le glucose, le xylose, le mannose et l'arabinose.

2 - H.P.L.C. (HW 40)

Cette étape, qui constitue une purification par tamisage moléculaire, est réalisée à l'aide d'une colonne remplie d'un gel (HW 40), conçue pour la chromatographie haute performance.

Les oligosaccharides majoritaires des fractions C, D et E sont purifiés une seconde fois par cette technique. Les oligosaccharides C et D sont élués respectivement à 50,1 et 52,3 ml. L'oligosaccharide E est élué beaucoup plus tardivement, à 59,8 ml.

En fait, chaque oligosaccharide est chromatographié plusieurs fois, et seules les fractions les plus riches en oligosaccharide majeur sont rassemblées, l'objectif étant à présent de parvenir à un état de pureté optimal pour aborder les analyses structurales fines dans les meilleures conditions.

A la suite de cette étape de purification, la composition en monosaccharides de chaque fraction est déterminée par CPG des dérivés acétates d'alditols (tab. 24).

Tableau 24 .

Rapports molaires des monosaccharides majeurs des fractions C, D et E après purification par HPLC (HW 40), obtenus par CPG des dérivés acétates d'alditols

Fractions		C	D	E
	Ara	-	-	-
	Fuc	0,33	-	-
	Xyl	0,33	0,18	-
Rapports molaires	Glc	-	0,24	-
	Man	1,00	1,00	-
	Gal	-	0,07	1,00
	GlcN	0,50	1,10	-

Ara, arabinose ; Fuc, fucose ; Xyl, xylose ; Glc, glucose ; Man, mannose ; Gal, galactose ; GlcN, glucosamine ou N-acétylglucosamine.

L'oligosaccharide C contient quatre résidus : le fucose, le xylose, le mannose et la glucosamine dont les trois premiers sont répartis selon une stoechiométrie simple de type 1:1:3.

L'oligosaccharide D est composé de cinq radicaux (Man, Glc, GlcNAc, Xyl et Gal), répartis selon des proportions incompatibles avec des rapports calculés correspondant à une espèce parfaitement pure. Une projection calculée aboutirait à une masse apparente trop élevée. L'hypothèse de travail retenue a consisté à supposer la présence en mélange de deux oligosaccharides de taille voisine, le premier ne comportant que le mannose et la glucosamine et le second constitué de xylose, glucose et un peu de galactose.

L'oligosaccharide majeur de la fraction E ne contient plus, après purification, que du galactose. Il s'agit donc à priori d'un résidu de galactane, dont l'identification structurale devrait être relativement simple.

C. - Caractérisation fine des oligosaccharides purifiés

Cette étape fait appel à l'ensemble des techniques modernes les plus utilisées pour réaliser l'analyse moléculaire fine des glucides, à savoir la méthylation, la spectrométrie FAB-MS ("fast atom bombardment-mass spectrometry) et la spectroscopie en résonance magnétique nucléaire (RMN).

1 - Dérivés partiellement méthylés et acétylés

Le protocole de préparation de ces dérivés est détaillé en annexe (fiches techniques n°10 et 11). Un aliquot de chacun des oligosaccharides subit une réduction suivie d'une méthylation. Une partie est destinée à la préparation des dérivés partiellement méthylés et acétylés, le reste de l'échantillon méthylé étant réservé à la spectroscopie FAB-MS.

La présence de la glucosamine et du mannose dans les oligosaccharides C et D a suscité la première tentative d'identification des substituants dans la mesure où elle suggérait l'existence de structures apparentées à des glycoconjugués. Les liaisons glycosidiques, qui sont déterminées ici, confirment particulièrement ces présomptions (tab. 25).

Tableau 25

Dérivés acétates d'alditols partiellement méthylés issus des oligosaccharides majoritaires des fractions C, D et E.

Oligosaccharide C

Dérivés	tFuc	tXyl	tMan	Man2,3,6	GlcNAc3,4-ol	GlcNAc4
Rapports molaires	0,60	0,74	1,63	1,00	0,32	0,06

Oligosaccharide D

Dérivés de type oligomannoside

Dérivés	tMan	GlcNAc4-ol	Man3,6
Rapports molaires	3,94	0,18	2,00

Dérivés de type xyloglucane

Dérivés	tGlc	tXyl	Xyl2	tGal	Glc6	Glc4,6
Rapports molaires	?	0,5	0,3	0,5	0,3	0,4

Oligosaccharide E

Dérivés	tGal	Gal6
Rapports molaires	1	1

Légende : tFuc, 2,3,4-tri-O-méthyl-fucitol ;
 tXyl, 2,3,4-tri-O-méthyl-xylitol ;
 tMan, 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-mannitol ;
 tGal, 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-galactitol ;
 tGlc, 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-glucitol ;
 Man3,6, 2,4-di-O-méthyl-mannitol ;
 Man2,3,6 4-O-méthyl-mannitol ;
 GlcNAc3,4-ol, 1,5,6-tri-O-méthyl-N-acetylglucosaminitol ;
 GlcNAc4-ol, 1,3,5,6-tétra-O-méthyl-N-acetylglucosaminitol ;
 GlcNAc4, 3,6-di-O-méthyl-N-acetylglucosaminitol ;
 Glc6, 2,3,4-tri-O-méthyl-glucitol ;
 Glc4,6, 2,3-di-O-méthyl-glucitol ;
 Gal6, 2,3,4-tri-O-méthyl-galactitol ;
 Xyl2, 3,4-di-O-méthyl-xylitol.

Les dérivés issus de l'oligosaccharide C sont tous caractéristiques de la structure xylomannosidique fucosylée, que l'on peut trouver comme motif chez les protéines N-glycosylées végétales (cf. Généralités).

Les dérivés issus de l'oligosaccharide D peuvent être répartis en deux catégories :

- les dérivés (mannosyl et glucosamine) caractéristiques des oligomannosides ;
- les dérivés (glucosyl, galactosyl, xylosyl) caractéristiques des xyloglucanes (cf. Généralités). On retrouve en particulier du glucose lié en 4 et du glucose lié en 4 et 6, qui constituent le squelette interne cellulosique, ainsi que du xylose terminal et du xylose substitué en 2 qui substituent en 6 les résidus glucosyls.

Les dérivés respectifs du mannose et du glucose en position terminale non réductrice sont habituellement séparés par le système chromatographique employé ; cependant, le glucose terminal (hypothétique), qui peut constituer un dérivé xyloglucanique, n'a pas été retrouvé à cause de la présence importante du dérivé mannosyl. L'hypothèse concernant la double origine des radicaux présents dans la fraction D se trouve ainsi renforcée. Cependant, des investigations par RMN et FAB-MS sont encore nécessaires pour confirmer définitivement cette hypothèse.

Les dérivés préparés à partir de l'oligosaccharide E indiquent d'une part la présence d'un résidu galactosyl en position terminale non réductrice et, d'autre part, celle d'un résidu galactosyl lié en 1 et en 6. Ces dérivés sont en quantité équimolaire, et aucun dérivé ne correspond à l'extrémité terminale réductrice. Ce résultat inattendu signifie que l'oligosaccharide E est constitué par un dimère de galactoses liés en 1,6 et dont l'extrémité réductrice est bloquée par un groupement non saccharidique.

2 - Spectroscopie RMN*

La spectroscopie RMN 400 MHz du ^1H est la technique qui est apparue la plus appropriée pour identifier sans ambiguïté la structure des oligosaccharides C et D. L'oligosaccharide D a été repurifié de façon à éliminer la contamination en xyloglucanes.

Les spectres RMN sont présentés sur la figure 32. Les assignements ainsi que les structures s'y rapportant sont représentés dans le tableau 26. L'interprétation des assignements a été facilitée par les résultats précédemment acquis à partir des composés 1 et 2.

En ce qui concerne l'oligosaccharide C, le résidu N,N'-diacetylchitobiose est caractérisé par les signaux des GlcNAc-1, H-1 α , H-1 β et NAc (α , β), qui sont respectivement de 5,162, 4,685 et 2,030/2,025 ppm. Un effet d'anomérisation est observé pour le signal GlcNAc-2 H-1, présent à $\delta = 4,561$ (α) et à $\delta = 4,545$ (β) ppm. Le noyau mannotriose est caractérisé par les signaux Man H-1 et Man H-2. Le résidu xylose lié en β -1-2 au Man-3 est identifié par les signaux caractéristiques H-1, H-2, H-3 et H-5, qui sont semblables à ceux du composé 1 (FOURNET *et al.* 1987).

Le résidu fucose lié en α -1-3 à la GlcNAc-1 est caractérisé par les signaux H-1, H-5 et CH₃ présents à $\delta = 5,080$ ppm, $\delta = 1,273$ ppm et 1,273 ppm. Ils sont très différents de ceux d'un fucose lié en α -1-6 à la GlcNAc réductrice (VAN KUIK *et al.* 1985). En conséquence, la structure de l'oligosaccharide C, établie à partir des spectres de référence peut se schématiser ainsi : Man α 1-6[Man α 1-3][Xyl β 1-2]Man β 1-4GlcNAc β 1-4 [Fuc α 1-3]GlcNAc. La structure de l'oligosaccharide D est directement identifiable grâce aux assignements du composé 2, il s'agit de l'oligosaccharide : Man α 1-6[Man α 1-3]Man α 1-6[Man α 1-3]Man β 1-4GlcNAc (MICHALSKI *et al.* 1990).

* Cette technique est en effet la plus communément utilisée pour la caractérisation des fractions glycaniques issues des N-glycoprotéines. Les nombreux travaux ayant trait à ce type d'analyse, effectués dans le Laboratoire de M. le Professeur MONTREUIL, ont facilité l'interprétation des spectres réalisée par Jean-Michel WIERUZESKI et Gérard STRECKER.

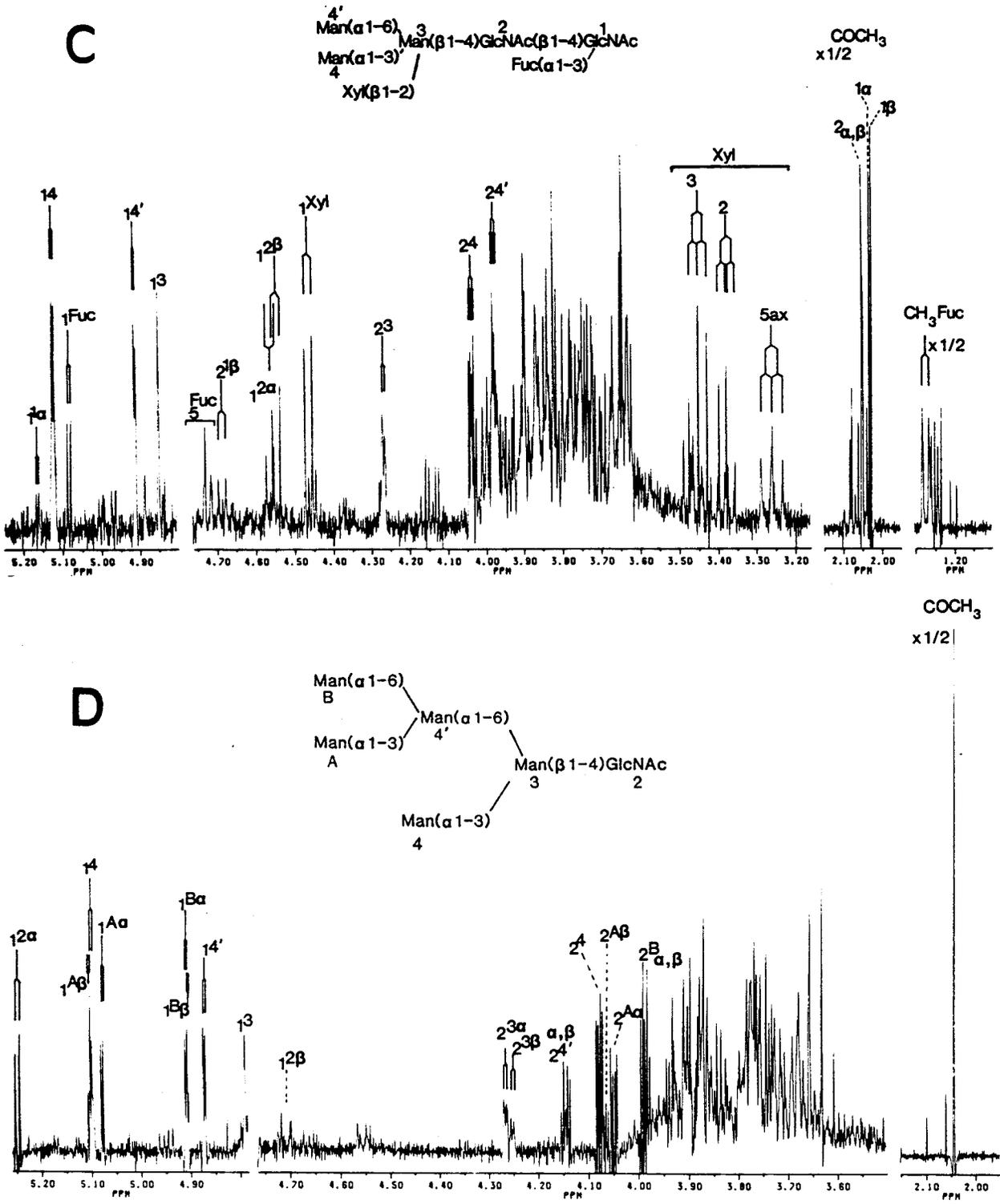
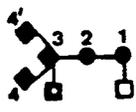
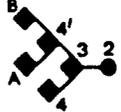


Figure 32 . - Spectres RMN 400 MHz du proton et identification des déplacements chimiques des oligosaccharides purifiés des fractions C et D. (Fiche technique n° 12).

Tableau 26 .

Déplacements chimiques des régions protoniques des monosaccharides constitutifs des oligosaccharides C et D isolés du milieu extracellulaire et comparaison avec les produits de référence 1 (FOURNET *et al.*, 1987) et 2 (MICHALSKI *et al.*, 1989)

Residue	Reporter-group				
		C	D	1	2
GlcNAc-1	H-1	α 5.162, β 4.685	-	5.082	-
	NAc	α 2.030, β 2.025	-	1.993	-
GlcNAc-2	H-1	α 4.561, β 4.545	α 5.246, β 4.710	4.568	α 5.247, β 4.709
	NAc	α 2.048, β 2.051	2.043	2.053	2.043
Man-3	H-1	4.849	α 4.790	4.887	α 4.787, β 4.782
	H-2	4.265	α 4.266, β 4.252	4.265	α 4.262, β 4.249
Man-4	H-1	5.120	5.099	5.122	5.101
	H-2	4.038	4.076	4.037	4.076
Man-4'	H-1	4.910	4.872	4.910	4.872
	H-2	3.975	α 4.146, β 4.142	3.980	4.140
Man-A	H-1	-	α 5.078, β 5.104	-	α 5.079, β 5.105
	H-2	-	α 4.048, β 4.066	-	α 4.048, β 4.061
Man-B	H-1	-	4.908	-	α 4.908, β 4.904
	H-2	-	α 3.988, β 3.983	-	α 3.987
Xyl	H-1	4.462	-	4.464	-
	H-2	3.375	-	3.372	-
	H-3	3.450	-	3.451	-
	H-5ax	3.257	-	3.258	-
Fuc	H-1	α 5.118, β 5.080	-	5.131	-
	H-5	4.721	-	N.D.	-
	CH ₃	1.273	-	1.290	-

L'oligosaccharide E n'a pas été analysé par RMN, faute de quantités suffisantes, mais l'analyse en spectroscopie FAB-MS permettra son identification.

3 - Spectrométrie FAB-MS

Cette étude est réalisée sur les oligosaccharides perméthylés C, D et E. Les préparations sont additionnées d'une solution d'acétate de Na à l'échantillon, de façon à ce que l'ion majoritaire complexé aux ions moléculaires soit le sodium. Cette précaution simplifie l'interprétation des masses.

a) Oligosaccharide C

Sur la figure 33, l'ion moléculaire de masse m/z 1523 correspondant à $(M + Na)^+$ est majoritaire. A elle seule, cette masse suffirait à l'identification d'un xylomannoside fucosylé, en complément de l'analyse des dérivés partiellement méthylés et acétylés. On distingue également les pics m/z 175 et 219, qui correspondent respectivement aux xylose et mannose terminaux.

Les masses des oligosaccharides sont en fait déterminées au dixième près. Pour justifier cette précision, la distribution naturelle des isotopes des atomes entrant dans la constitution des oligosaccharides (C, H, O, N) est intégrée par le calcul. Les valeurs théoriques sont ensuite comparées avec la distribution des masses obtenues expérimentalement (fig. 34) et leur similitude est remarquable. Une telle qualité de discrimination isotopique offerte par l'appareillage utilisé est une garantie et une satisfaction intellectuelle dans le cadre de cette détermination. Elle permet d'envisager la mesure du pourcentage d'incorporation d'un isotope donné lors d'une expérience de marquage isotopique.

b) Oligosaccharide D

Sur la figure 33, l'ion moléculaire majoritaire de masse m/z 1352, correspondant à $(M + Na)^+$ ainsi que l'ion moléculaire $(M + H)^+$ minoritaire de masse m/z 1330, sont les plus aisément repérables. On note la présence de 2 ions moléculaires supplémentaires de m/z 1338 et 1330. Ils sont attribuables aux ions $(M + Na)^+$ et $(M + H)^+$ d'un oligosaccharide contaminant de masse isotopique 1329. Il s'agit donc du contaminant de xyloglucane. La recherche

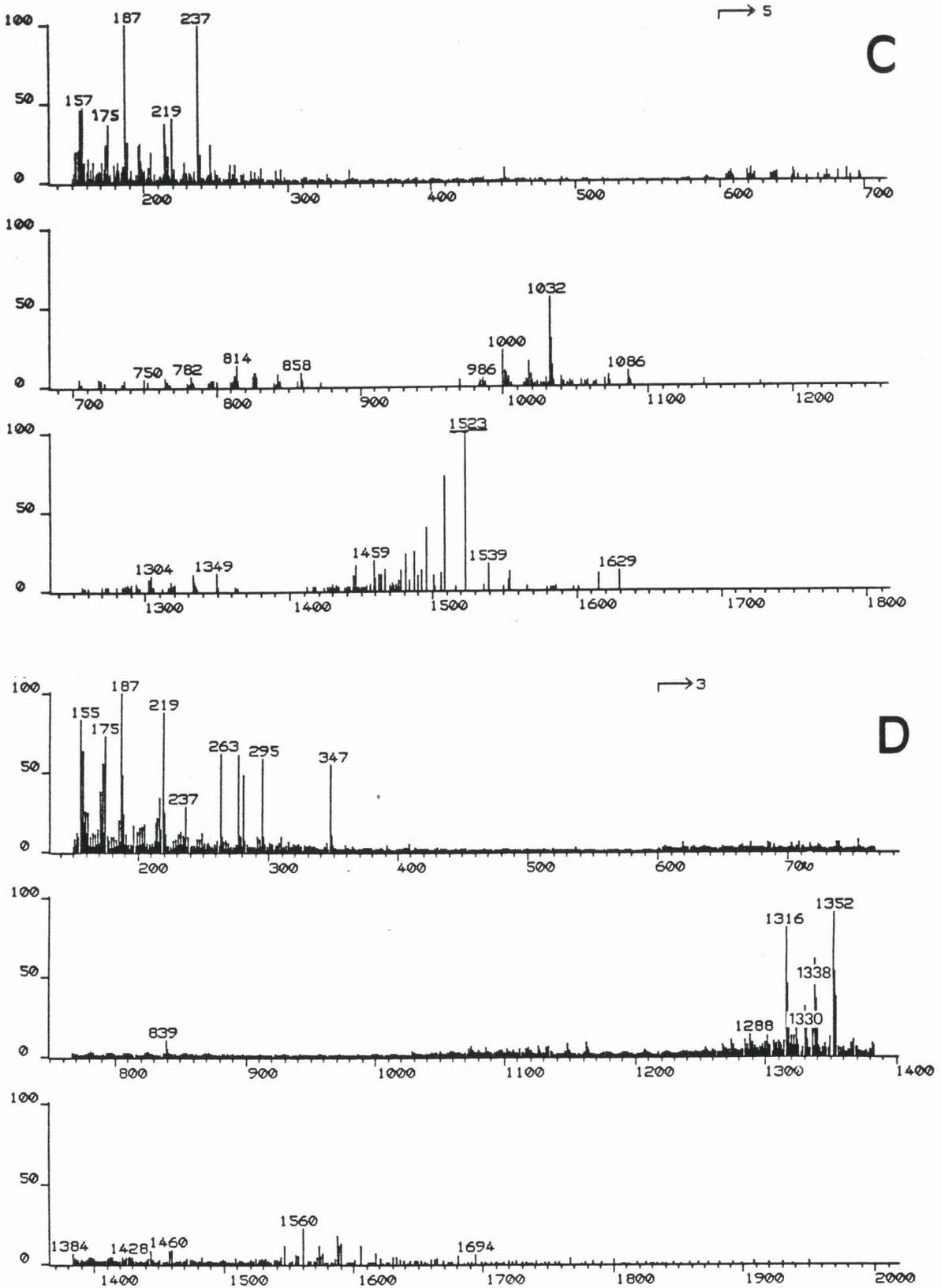


Figure 33 . - FAB-MS, mode positif, des oligomannosides C et D, de $(M+Na)^+$ respectifs 1 523 et 1 352.

Fiche technique n° 11).

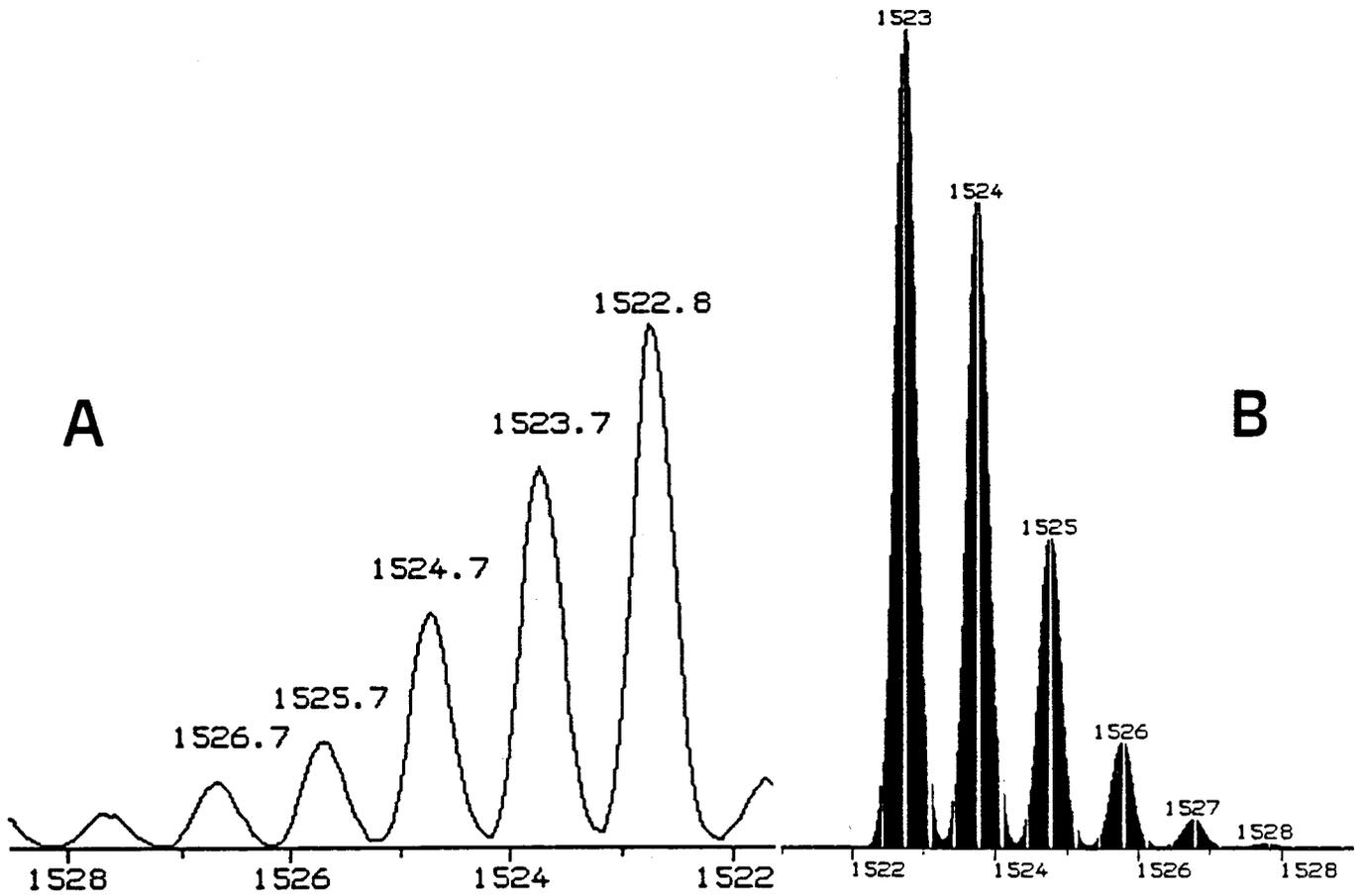


Figure 34 . - Répartition des masses isotopiques $(M + Na)^+$ du xylomannoside perméthylé C.

A, valeurs expérimentales ; B, valeurs théoriques.

d'une structure brute conduisant à cette masse aboutit à la conclusion que cet oligosaccharide peut être constitué de 4 résidus xylose et de 3 résidus glucose. La présence de l'arabinose est exclue puisqu'il ne fait pas partie des acétates d'alditols identifiés, ni non plus des dérivés partiellement méthylés et acétylés. Si on admet la présence de galactose dans la composition de ce xyloglucane, celà veut dire que les xyloses substitués sont au nombre de 3 et que l'on a un seul xylose terminal. Cependant, le rapport des dérivés partiellement méthylés et acétylés tXyl/Xy12 qui est de 0,5/0,3 (cf. tab. 25), plaide plutôt en faveur de la structure brute Xyl4Glc3. En effet, la présence de galactose, nécessairement substitué à un xylose terminal, aboutirait à un rapport théorique de 1/3 (au lieu de 2/2 lorsque celui-ci est absent).

La présence de glucose lié en 1 et 4, bien qu'il puisse être un dérivé de xyloglucane, ne convient à aucune des deux structures. On doit donc admettre que même si le fragment correspondant à l'une des deux structures est majoritaire, il y a vraisemblablement d'autres contaminations de résidus xyloglucanes dans la préparation de l'oligomannoside Man₅GlcNAc.

L'analyse du contaminant xyloglucane est poursuivie par des fragmentations MS-MS. L'ion 1316 (plus exactement 1315,7) est fragmenté sélectivement (fig. 35). La présence d'un pic m/z 219 signifie que la molécule de départ contient un hexose (glucose ou galactose) en position terminale. Ceci limite les possibilités de construction à 2 (fig. 36). Les autres pics m/z correspondent à une fragmentation périphérique de la molécule, ce qui laisse un doute quant au choix définitif entre les 2 structures. Seule une fragmentation moléculaire interne aurait pu permettre de lever l'ambiguïté, ce qui n'est malheureusement pas le cas. Il faut souligner que de nombreux fragments n'ont pu être identifiés.

c) Oligosaccharide E

Les ions moléculaires (M + Na)⁺ et (M + H)⁺ sont respectivement de 565 (majeur) et 543 (mineur). L'oligosaccharide E a donc une masse moléculaire de 542. Si on déduit de cette masse le résidu digalactose Gal-Gal-O- (439), le substituant a pour masse 103 (fig. 37), ce qui correspond parfaitement avec celle du glycérol perméthylé. Ceci signifie que l'oligosaccharide E aurait pour structure Gal1-6Gal-Glycerol. Il pourrait s'agir d'un fragment qui peut provenir des galactolipides présents dans les membranes intracellulaires.

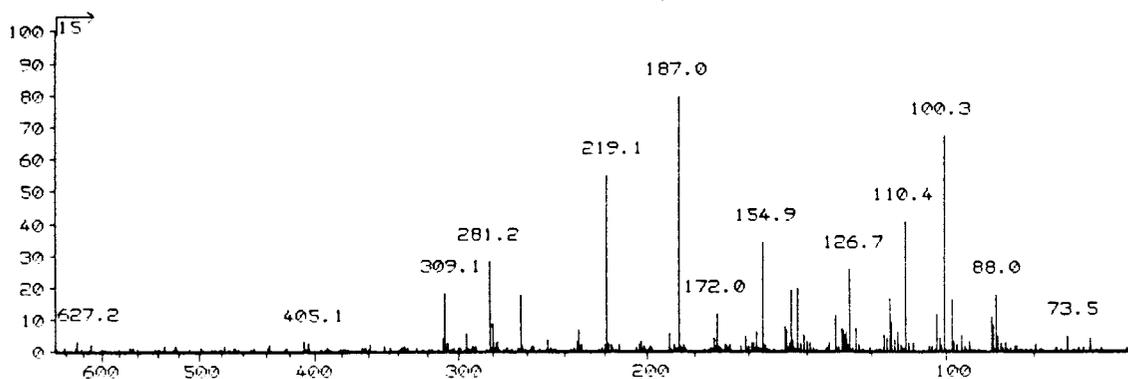
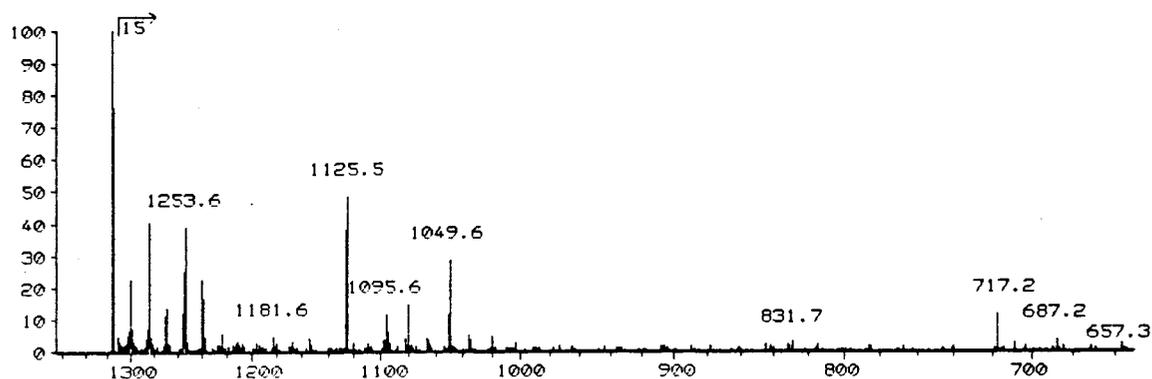
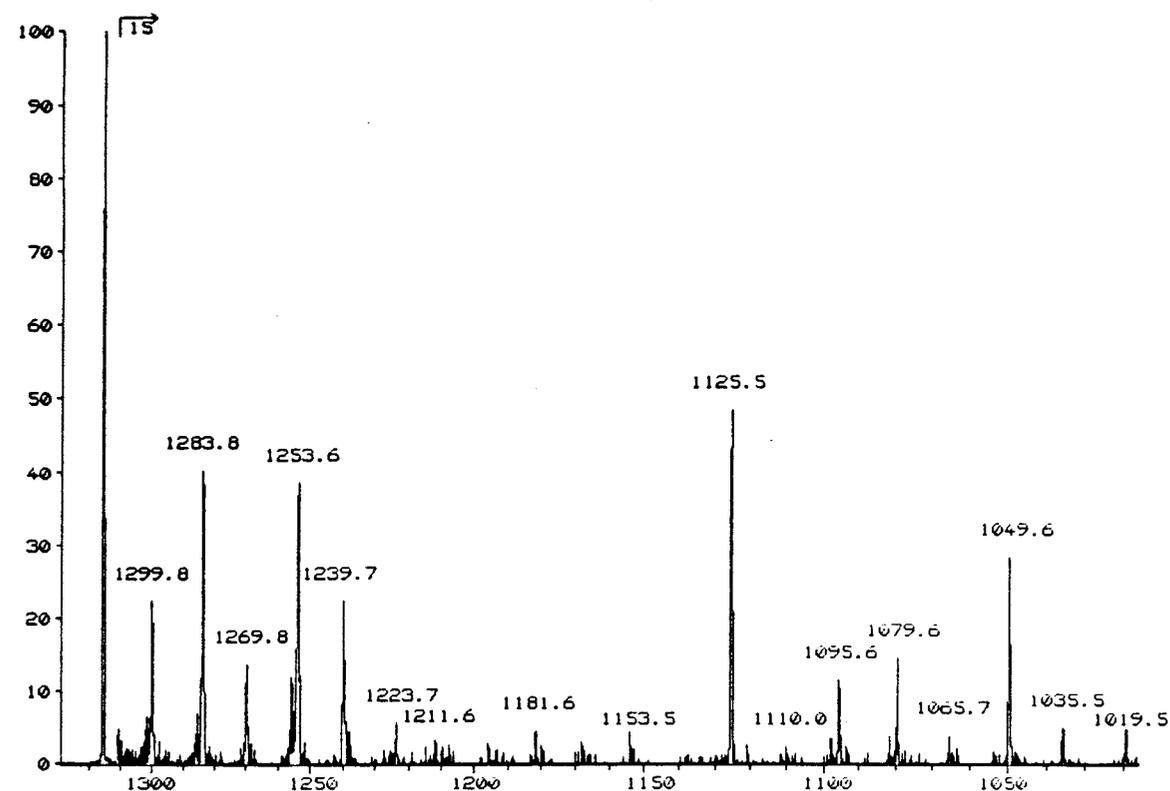


Figure 35 . - FAB MS-MS de l'ion moléculaire $(M + H)^+$ 1315,7 ; mode positif; énergie de collision 6 eV.

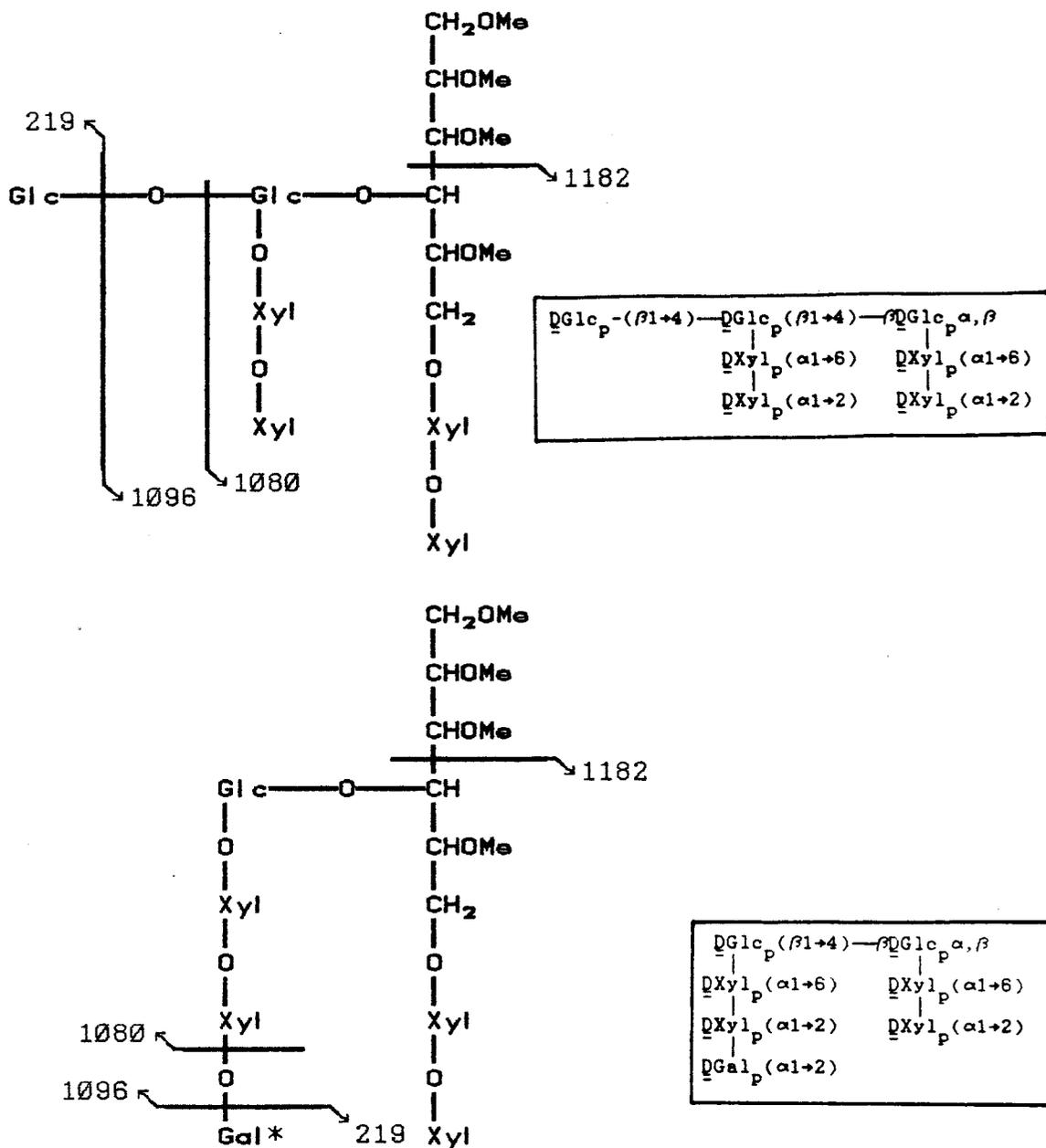


Figure 36 . - Structures possibles du contaminant xyloglucane (M + H)⁺ 1315,7 présent dans la fraction D, compte tenu du pic m/z 219 (MS-MS), caractéristique d'un hexose terminal non réducteur.

*, le galactose peut être situé sur l'autre résidu terminal de xylose (Xyl).

En encart, structures initiales correspondantes.

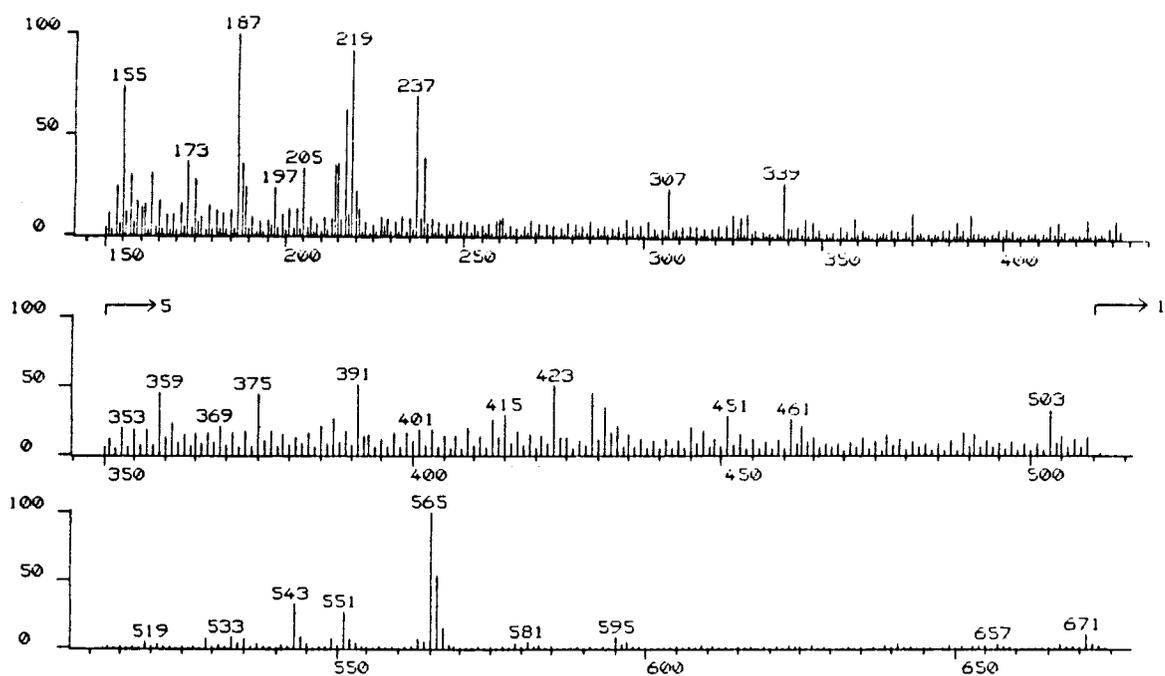
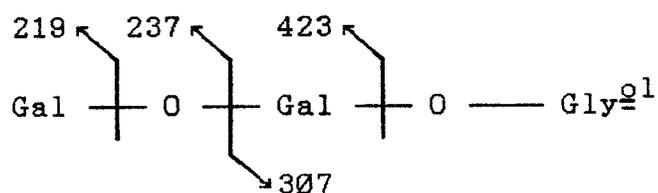


Figure 37 . - FAB-MS en mode positif de l'oligosaccharide E perméthylé, et structure proposée.

Les pics m/z 543 et m/z 565 correspondent respectivement aux ions $(M + H)^+$ et $(M + Na)^+$.

Gal, galactose ; Gly^{ol}, glycérol.

La méthylation, s'effectuant en milieu fortement alcalin, la question se pose de savoir si le glycérol de l'oligosaccharide E avant la méthylation était présent sous forme libre ou s'il était partiellement estérifié. Compte-tenu de la migration normale en CCM (le solvant étant apolaire) et du temps d'élution tardif en HPLC, on peut supposer que le glycérol devait se trouver initialement sous forme désestérifiée.

D. - Conclusion



A 14 jours de culture, les oligosaccharides extracellulaires présents dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène sont de nature glycoprotéique. Il s'agit des structures $\text{Man}_3\text{XylGlcNAcFucGlcNAc}$ (oligo. C) et $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (oligo. D). Leur concentration peut être estimée entre 5 et 10 mg.l^{-1} sur la base des analyses après chromatographie sur Biogel P2 (cf. tab. 23) et compte-tenu que nous sommes parti de 3 l de milieu de culture. Une analyse sur couche mince (fig. 38) montre la prépondérance de ces oligosaccharides dans la fraction neutre totale. Par ailleurs, un résidu de galactolipides, de structure $\text{Gal-1,6-GalGly}^{\text{ol}}$ et un fragment de xyloglucane de structure probable Xyl_4Glc_3 sont également présents dans le milieu de culture.

IV. - ETUDE CINÉTIQUE DE LA PRODUCTION DES OLIGO- ET XYLO-MANNOSIDES

L'étude réalisée a pour objectif d'établir des corrélations entre l'apparition des oligomannosides dans le milieu de culture et l'évolution de certains marqueurs physiologiques et biochimiques. Les variations de la fraction oligosaccharidique sont mesurées au cours d'un cycle de culture prolongée jusqu'à 30 jours. L'augmentation des exopolysaccharides et la disparition du substrat carboné dans le milieu de culture sont suivies en même temps qu'est mesurée l'évolution de la masse sèche, de l'amidon, des sucres solubles, des protéines totales et solubles des cellules. Les activités enzymatiques susceptibles de dégrader les protéines N-glycosylées sont également recherchées et partiellement caractérisées. Enfin, on effectue quelques contrôles cytochimiques en microscopie électronique.

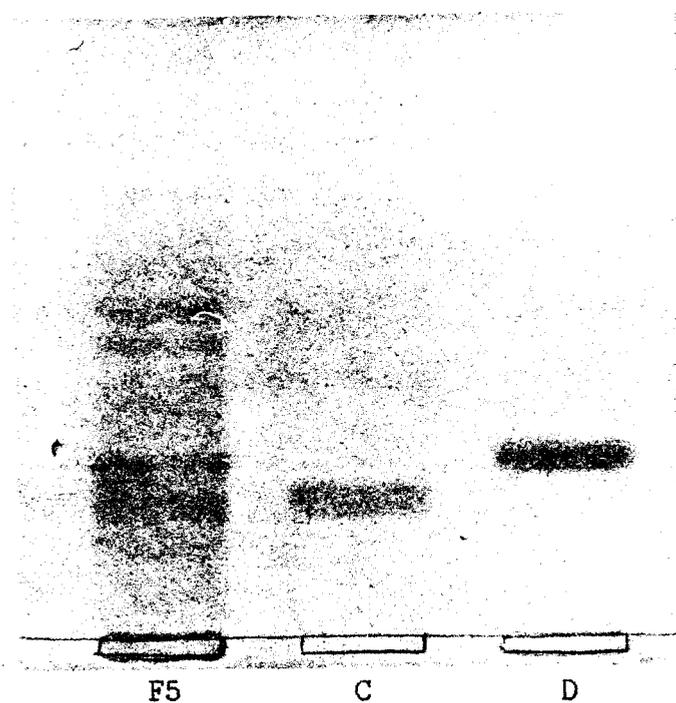


Figure 38 . - Analyse par chromatographie sur couche mince de la fraction oligosaccharidique neutre (F5) et des oligosaccharides majeurs purifiés des fractions C et D obtenues par passage sur Biogel P2, après purification par H.P.L.C. (HW40 Super Fine).

Solvant : butanol - acide acétique - eau (2:1:1), double migration.

A. - Oligosaccharides extracellulaires totaux

Les fractions oligosaccharidiques proviennent des surnageants éthanoliques après précipitation des exopolysaccharides. Elles sont séparées par tamisage moléculaire sur Séphadex G10. Le saccharose et les monosaccharides sont collectés ensemble, pour évaluer la disparition du substrat carboné.

1 - Aspect quantitatif

- Pendant la durée habituelle du cycle de culture (14 jours), la masse cellulaire sèche s'accroît exponentiellement pendant une dizaine de jours puis elle se stabilise (fig. 39). Simultanément, des oligosaccharides sont excrétés activement dans le milieu pendant la phase exponentielle de croissance jusqu'à atteindre la concentration de 15 mg.l^{-1} qui se stabilise alors jusqu'à 14 jours.
- Entre 14 et 17 jours, alors que la masse cellulaire diminue sensiblement (- 30 %), la quantité d'oligosaccharides extracellulaires double brusquement (32 mg.l^{-1}).
- A partir de 17 jours, la quantité d'oligosaccharides excrétés se stabilise aux alentours de 35 mg.l^{-1} , alors que la masse sèche continue lentement à diminuer.

Il apparaît donc nettement 2 périodes distinctes marquées par une production intense d'oligosaccharides : l'une correspondant aux 8 premiers jours de culture, c'est-à-dire pendant la phase exponentielle de croissance cellulaire ; l'autre, située entre 14 et 17 jours, et qui est marquée par une phase de régression pondérale cellulaire.

2 - Aspect qualitatif

Parmi les monosaccharides constitutifs des oligosaccharides, certains sont considérés comme des marqueurs des oligomannosides : la N-acétylglucosamine et le mannose d'une part, le fucose et éventuellement le xylose, pour les formes xylomannosidiques fucosylées, d'autre part. Ces différents constituants

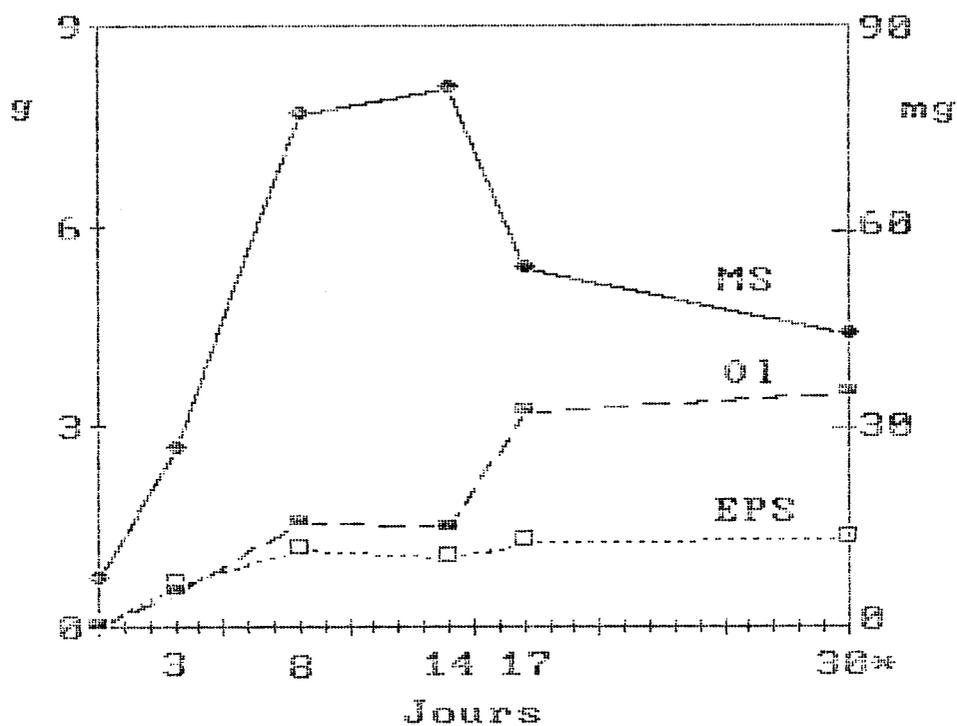


Figure 39 . - Evolution de la fraction oligosaccharidique extracellulaire au cours de la culture de la suspension cellulaire de Silène.

(-•-), matière sèche cellulaire en g (MS) ; (•□•), exopolysaccharides en g (EPS) ; (-■-), oligosaccharides en mg (OI) ; (*), début de lyse cellulaire.

ont été estimés aux différents temps de culture, les résultats sont présentés dans le tableau 27.

Pendant les 14 premiers jours de culture, il se produit une augmentation plus ou moins régulière de l'ensemble des monosaccharides, les fluctuations particulières n'étant pas analysées davantage. C'est entre 14 et 17 jours qu'interviennent des augmentations spectaculaires des concentrations en fucose (x 5,5), rhamnose (x 3,7) et N-acétylglucosamine (x 3,2). Ces variations sont largement supérieures au facteur d'augmentation de la fraction oligosaccharidique totale qui n'est que de 2. En fin d'expérience, c'est-à-dire après 30 jours de culture, la N-acétylglucosamine, le fucose et le mannose représentent ensemble 50 % des monosaccharides extracellulaires totaux. On peut donc s'attendre à trouver en fin de culture des quantités importantes d'oligo- et xylomannosides. L'analyse des différentes fractions par chromatographie sur couche mince (en présence des témoins précédemment purifiés) permet de constater que les 2 bandes correspondant aux oligosaccharides de référence ($\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ et $\text{Man}_3\text{XylGlcNAcFucGlcNAc}$) apparaissent et s'accroissent progressivement au cours du temps. Elles sont nettement majoritaires à 30 jours de culture (fig. 40).

La fin de la croissance cellulaire coïncide donc avec l'apparition des oligosaccharides riches en glucosamine dans le milieu de culture.

Par la suite, une attention particulière sera portée sur les événements intervenant entre 14 et 17 jours de culture, période cruciale dans l'excrétion des oligosaccharides à glucosamine.

B. - Substrat carboné

Au moment du repiquage, le milieu de culture contient 20 g.l^{-1} de saccharose, qui constitue la seule source carbonée du milieu de culture. Une activité invertasique le dégrade rapidement en fructose et en glucose. L'estimation du substrat carboné est effectuée sur la fraction légère (sacc. + monosacc.) séparée des oligosaccharides par chromatographie sur G10.

Tableau 27 .

Evolution des concentrations des monosaccharides constitutifs de la fraction oligosaccharidique extracellulaire au cours de la culture.

Monosaccharides* mg.l ⁻¹	Jours de culture				
	3	8	14	17	30
Ara	0,32	0,30	0,63	1,48	2,05
Rha	0,03	0,04	0,15	0,56	0,73
Gal	0,68	2,66	2,80	4,34	3,81
Glc	1,43	5,88	3,35	5,97	4,75
Xyl	0,96	2,48	3,30	6,85	7,08
Man	1,16	2,86	3,32	9,01	10,83
Fuc	0,06	0,08	0,08	0,44	0,86
GlcNAc**	0,27	0,92	0,79	2,52	3,78
GlcAU	0,07	0,13	0,32	0,88	1,14
4-O-meGlcAU	0,03	0,07	0,11	0,48	0,53
GalAU	0	0	0	0	0

*, Dérivés méthylglycosides triméthylsilylés ; **, valeurs corrigées par rapport au témoin Mans GlcNAc.

Ara, arabinose ; Xyl, xylose ; Man, mannose ; Fuc, fucose ; GlcNAc, N-acétylglucosamine ; GlcAU, acide glucuronique ; 4-O-meGlcAU, acide 4-O-méthyl-glucuronique ; GalAU, acide galacturonique.

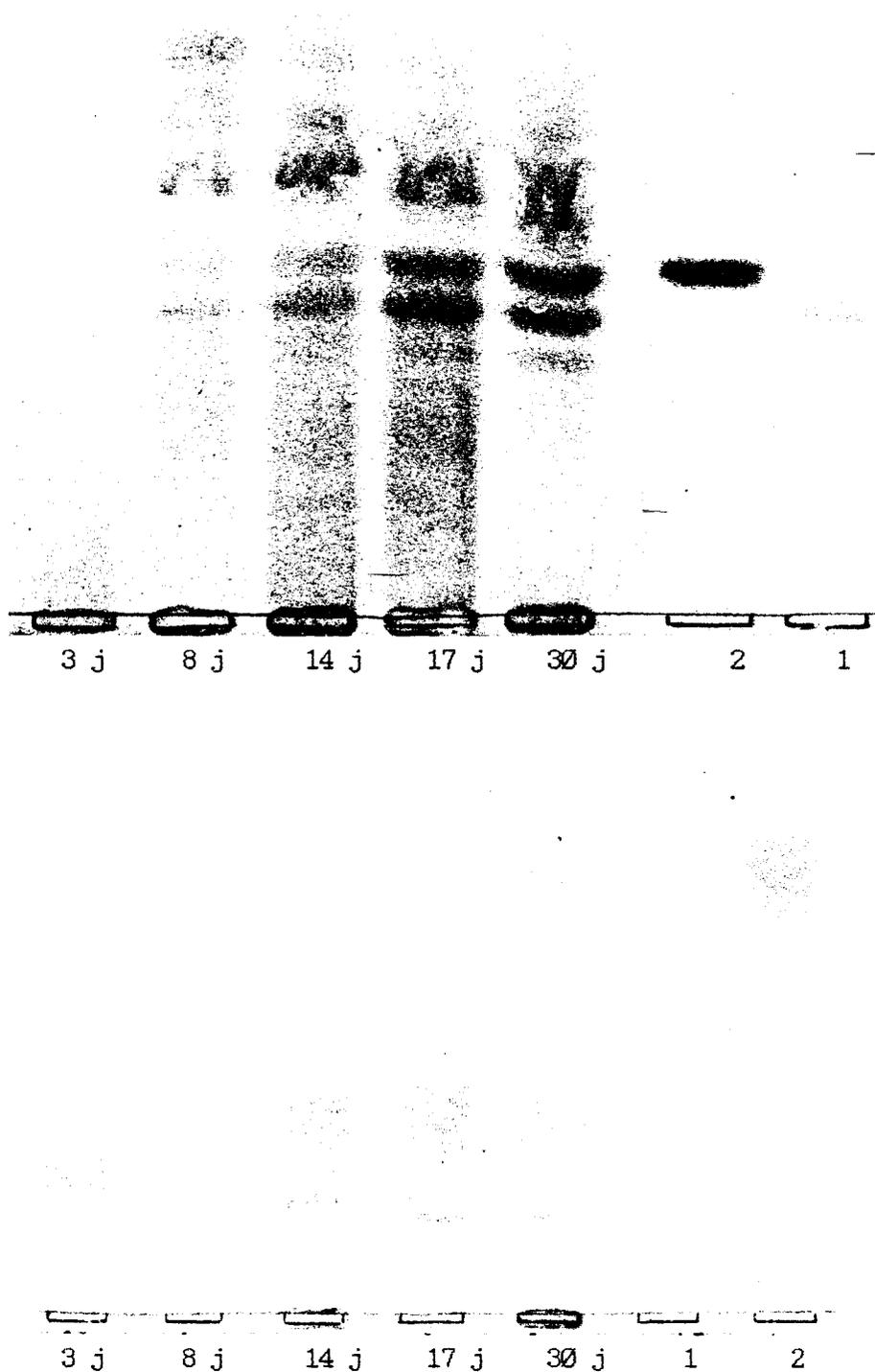


Figure 40 . - Chromatographie sur couche mince des fractions oligosaccharidiques extracellulaires à différents temps de culture.

A, solvant butanol - acide acétique - eau (2:1:1)

B, solvant n-butanol - pyridine - éthanol - acide acétique - eau (10:10:10:1:30)

1, témoin $\text{Man}_3\text{XylGlcNAcFucGlcNAc}$ ("oligo C")

2, témoin $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ ("oligo D")

On constate que les monosaccharides provenant de la dégradation du saccharose sont absorbés très rapidement et disparaissent complètement du milieu après 14 jours de culture (tab. 28).

Le liquide intracellulaire, obtenu par éclatement des cellules et élimination des débris cellulaires après centrifugation, a été analysé par chromatographie sur couche mince (fig. 41). S'il reste des monosaccharides dans les cellules âgées de 14 jours, ce n'est plus le cas dans celles âgées de 17 jours où il n'y a plus de traces de sucres "migrants". L'analyse par HPLC du liquide intracellulaire confirme que le glucose est le constituant soluble majoritaire de la cellule. Il représente en effet 20 % de la matière sèche, en début de culture. Le fructose représente toujours une faible part de la matière sèche. Après 14 jours de culture, les teneurs des 2 monosaccharides sont équivalentes et ne représentent plus, ensemble, que 5 % de la masse sèche cellulaire.

Les réserves amylacées s'accumulent progressivement en début de culture et constituent 5,3 % de la matière sèche à 8 jours de culture. Puis elles diminuent rapidement et disparaissent après 17 jours de culture.

La période de culture entre 14 et 17 jours, qui est marquée par une augmentation des oligo- et xylomannosides, semble correspondre à la fin de la mobilisation des réserves glucidiques disponibles dans les cellules.

C. - Protéines

Deux catégories de protéines ont été évaluées :

- les protéines totales, mesurées sur un broyat cellulaire brut ;
- les protéines intracellulaires, dosées dans le liquide intracellulaire récupéré comme décrit précédemment, après éclatement des cellules et élimination des débris cellulaires.

Tableau 28 .

Evolution du substrat carboné dans le milieu et des réserves glucidiques cellulaires au cours de la culture.

	Jours de culture				
	3	8	14	17	30
Substrat carboné ¹ dans le milieu g.l ⁻¹ eq.saccharose	10,09	5,23	0,01	0,01	< 0,01
Réserves glucidiques ² intracellulaires					
Glc	19,3	16,9	3,7	0,5	0,0
Fru	8,3	8,2	3,0	1,0	0,0
% matière sèche Amidon ³	2,5	5,3	0,6	0,2	< 0,1

1, Estimation basée sur le dosage des sucres totaux de la fraction (saccharose + monosaccharides) séparée sur Sephadex G10 par tamisage moléculaire.

2, Dosage H.P.L.C.

3, Glucose libéré sous l'action d'une amyloglucosidase.

(Fiche technique n° 7)

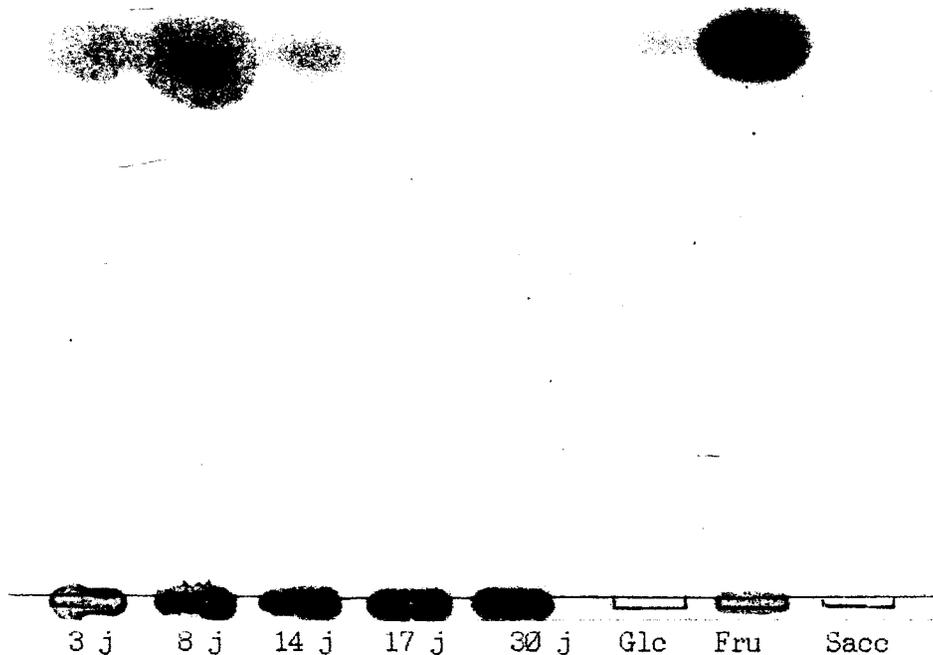


Figure 41 . - Chromatographie sur couche mince d'un extrait cellulaire, à différents temps de culture.

Sacc, saccharose ; Glc, glucose ; Fru, fructose.

Quantité déposée : 10 µl d'un extrait à 15 mg/ml de matière sèche.

1 - Protéines totales

Les protéines totales constituent 20 à 40 % de la masse cellulaire (tab. 29), ce pourcentage augmentant progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation.

En début de culture, leur évolution quantitative est parallèle à celle de la masse cellulaire totale (fig. 42). Cependant, entre 14 et 17 jours, alors que la baisse de matière sèche est de 33 %, la quantité de protéines totales ne diminue plus que de 14,5 %. Ceci paraît signifier que la perte pondérale cellulaire durant cette période ne concerne pas, en particulier, cette fraction protéique.

2 - Protéines solubles intracellulaires

Les protéines intracellulaires, qui constituent en début de culture un pourcentage élevé des protéines totales (37 %), ne représentent plus au bout de 30 jours de culture que 13 % de ce total.

Leur évolution est absolument identique à celle de la masse cellulaire (fig. 42). Entre 14 et 17 jours, la quantité diminue de 31 %, ce pourcentage est le même que celui de la perte cellulaire totale. Ceci signifie que même si quantitativement la diminution de cette fraction protéique ne peut expliquer complètement la perte de masse cellulaire, cette observation est qualitativement importante, compte-tenu de la nature (en partie N-glycosylée ?) et de la localisation intracellulaire de ces protéines.

D. - Recherche d'activités enzymatiques

1 - Méthodologie d'extraction

Les enzymes du catabolisme des glycoprotéines peuvent avoir une origine lysosomiale ou au contraire cytosolique.

Ces compartiments différents se caractérisent chacun par leur pH optimum d'activité, acide pour les enzymes lysosomiales, neutre pour les enzymes

Tableau 29 .

Evolution des protéines totales et des protéines cellulaires au cours de la culture.

	Jours de culture				
	3	8	14	17	30
Matière sèche cellulaire g.l ⁻¹	2,65	7,65	8,05	5,35	4,35
Protéines totales % de la matière sèche	22,3	21,3	26,7	34,4	39,8
Protéines solubles cellulaire % de la matière sèche	6,4	8,3	6,4	6,4	5,0

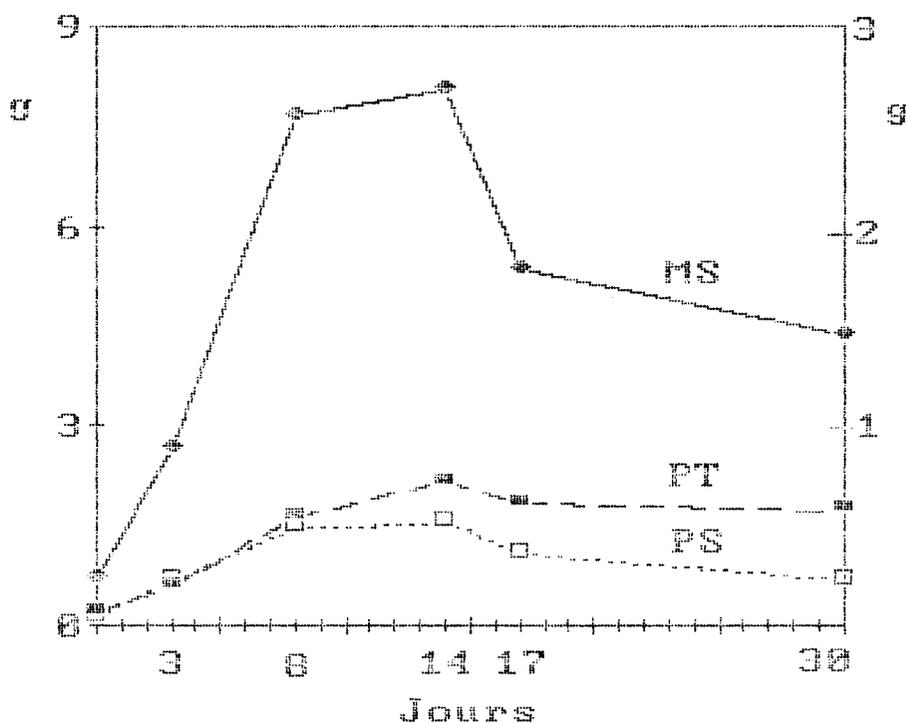


Figure 42 . - Evolution des protéines totales et solubles par rapport à la croissance cellulaire.

(-.-), masse cellulaire sèche en g (MS) ; (-■-), protéines totales en g (PT) ; (-□-), protéines solubles en g, échelle de droite (PS).

cytosoliques. La méthodologie d'extraction doit prendre en compte ces différentes données. Aussi, les expériences suivantes ont été réalisées à partir d'extraits complets (éclatement des cellules et des organites à la presse de French), d'une part dans un tampon acide (acétate, pH 4) et, d'autre part, dans un tampon neutre (phosphate, pH 7).

2 - Mise en évidence d'une activité endo- β -acetylglucosaminidase ("ENGasique")

Les broyats cellulaires sont incubés en présence d'un substrat oligomannosidique $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$, pendant une durée de 12 h aux différents pH (fig. 43). Les incubations sont réalisées à température ambiante, sans ajouter d'inhibiteurs d' α -mannosidases. On constate une hydrolyse complète de ce substrat et apparition simultanée du produit de réaction $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$ (oligosaccharide D), et ce, seulement à pH 7. L'activité est observée quel que soit l'âge des cellules. L'enlèvement de l'asparagine et de la N-acétylglucosamine peut théoriquement avoir lieu sous les actions successives d'une aspartamidase et d'une endochitobiase. Ces 2 enzymes n'ont cependant été décrites que dans les lysosomes (cf. Généralités). L'activité observée plaide donc plutôt pour l'action d'une ENGase cytosolique. Il n'y a pas de libération de mannose, ce qui signifie qu'il n'existe pas d'activité α -3 et α -6 mannosidases.

3 - Evaluation de l'activité ENGasique

L'activité ENGasique des différents extraits cellulaires est évaluée par la réalisation d'une cinétique enzymatique, par prélèvements et dépôts successifs sur couche mince. Cette expérience doit permettre de comparer sommairement cette activité selon l'âge des cellules, par rapport à une même quantité de matière sèche (fig. 44).

Sur la base d'une simple observation visuelle, on constate une légère augmentation d'activité à partir de l'extrait cellulaire de 14 jours. En effet, après 12 h d'incubation, on constate des bandes résiduelles qui correspondent au substrat pour les extraits de 3 et 8 jours alors que pour les extraits de 14, 17 et 30 jours, il a complètement disparu. Rappelons que les incubations

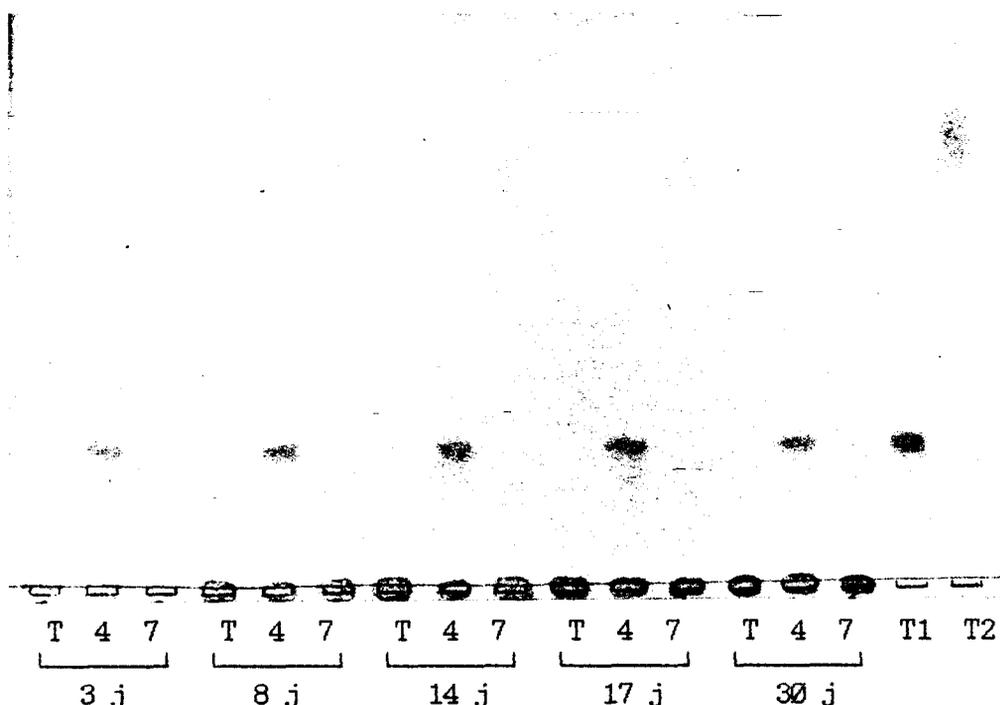


Figure 43 . - Incubation enzymatique des broyats cellulaires en présence du substrat oligomannosidique MansGlcNAc₂Asn.

Mélange réactionnel : 50 μ l de broyat cellulaire à une concentration en matière sèche de 15 mg.ml⁻¹ de tampon + 50 μ l de MansGlcNAc₂Asn, 1mg.ml⁻¹.

Conditions d'incubation : 12 heures, température ambiante.

Nature des dépôts : broyats à 3, 8, 14, 17, 30 jours de culture ; (T), broyats seuls et 2 conditions de pH, (4), tampon acétate de sodium 100 mM, pH 4 et (7), tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7.

Témoins de migration : (T1), MansGlcNAc₂Asn ; (T2), MansGlcNAc (oligo D).

Quantité déposée : 10 μ l.

Solvant : n-butanol - pyridine - éthanol - acide acétique - eau (10:10:100:1:30).

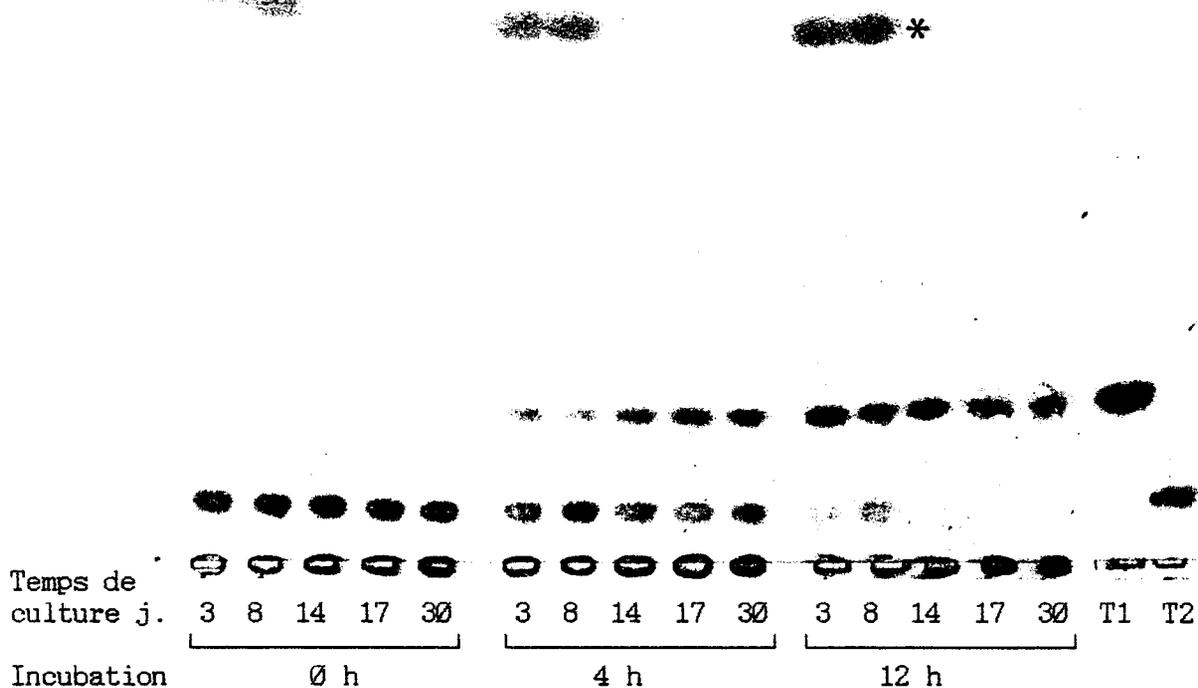


Figure 44 . - Cinétique d'activité ENGasique des extraits cellulaires à différents temps de culture.

Mélange réactionnel : 50 μ l de broyat cellulaire à une concentration en matière sèche de 6 mg.ml⁻¹ de tampon phosphate de sodium pH7 + 50 μ l de substrat MansGlcNAc₂Asn, 1mg.ml⁻¹.

Durée d'incubation : (0 h), 0 heure, (4 h), 4 heures, (12 h), 12heures.

Température d'incubation : 20°C.

Quantité déposée 10 μ l.

Témoin de migration : (T1), MansGlcNAc (oligo D), (T2), MansGlcNAc₂Asn.

* Glucose intracellulaire.

Remarquer à 12 heures d'incubation la présence résiduelle du substrat MansGlcNAc₂Asn pour les broyats de 3 et 8 jours et sa disparition complète pour ceux de 14, 17 et 30 jours de culture.

correspondent à des quantités égales de matière sèche, et non de protéines, dont la concentration diminue dans les cellules à partir de 17 jours de culture.

4 - Spécificité vis-à-vis d'autres substrats

Des glycanes complexes, de nature sialidosidique et asialidosidique, sont utilisés comme substrats potentiels pour juger de la spécificité de l'ENGase vis-à-vis d'autres substrats. Ils ne sont absolument pas hydrolysés comme le montre la figure 45. Précisons toutefois qu'il s'agit de molécules de nature animale, non présentes chez les Végétaux.

E. - Observations en microscopie électronique

L'observation en microscopie électronique des cellules à différents temps de culture constitue l'étape finale de notre travail.

Les coupes de cellules jeunes (3 jours de culture) montrent un cytoplasme très dense, riche en ribosomes, avec de très nombreuses mitochondries et des plastes amylières témoignant de leur forte activité métabolique (fig. 46a).

Les cellules âgées (culture de 14 jours) sont fortement vacuolisées, les plastes renferment peu ou pas d'amidon, les mitochondries sont moins nombreuses et le cytoplasme est moins riche en ribosomes. Ces cellules montrent fréquemment des vacuoles de séquestration avec de nombreuses vésicules, organites divers et cytomembranes destinés à être détruits (fig. 46b). Ils sont généralement localisés près de la paroi. L'application de la technique de GOMORI (1952) aux cellules de 14 jours permet de montrer que les amas de vésicules et cytomembranes de la figure 46b sont très riches en hydrolases (phosphatase acide) et sont donc des lysosomes (fig. 46c). Les résidus de la lyse intravacuolaire sont organisés en enroulements membranaires très caractéristiques de l'autophagie cellulaire (fig. 46d).

F. - Conclusion

L'expérience de cinétique montre que l'excrétion des oligosaccharides contenant de la N-acétylglucosamine a lieu en fin de culture, lorsque les sucres disparaissent du milieu (14 jours). C'est également à ce moment que la

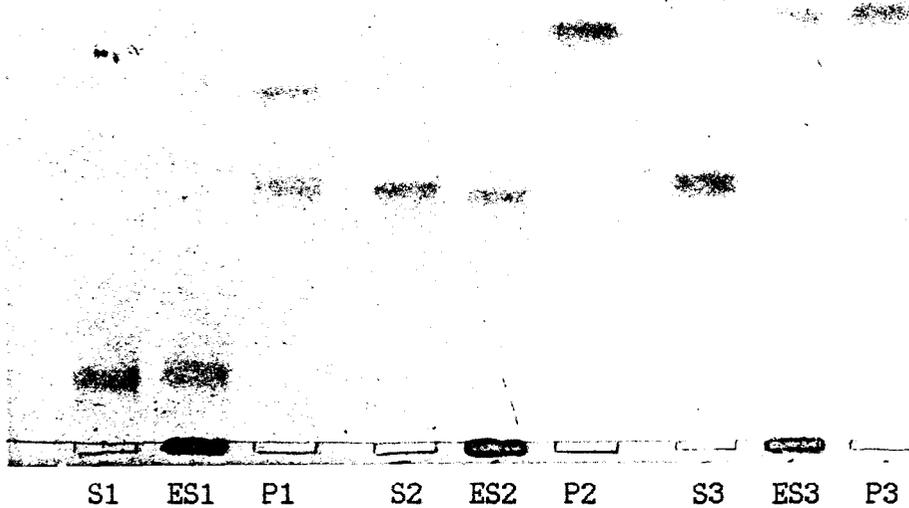


Figure 45 . - Spécificité d'action de l'activité ENGasique.

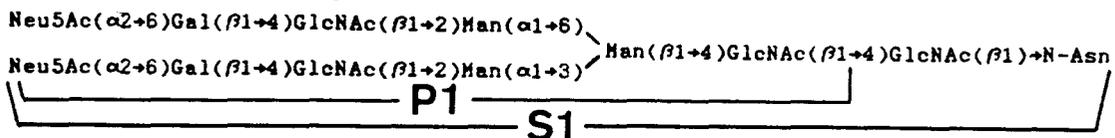
Mélange réactionnel : 50 μ l de broyat cellulaire à une concentration en matière sèche de 10 mg.ml^{-1} de tampon phosphate de sodium pH7 + 50 μ l de l'un des substrats S1, S2, S3, 1 mg.ml^{-1} .

Dépôts (20 μ l) : - S1 et P1, témoins sialosidiques ; ES1, extrait cellulaire + S1 ;
- S2 et P2, témoins asialosidiques ; ES2, extrait cellulaire + S2 ;
- S3 et P3, témoins oligomannosidiques ; ES3, extrait cellulaire + S3.

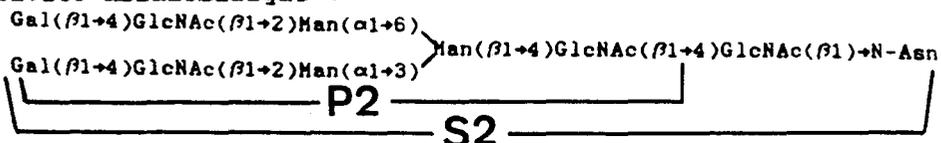
Incubation : 12 heures à 20°C.

Solvants : butanol - acide acétique - eau (2:1:1) 1 heure puis n-butanol - pyridine - éthanol - acide acétique - eau (10:10:100:1:30).

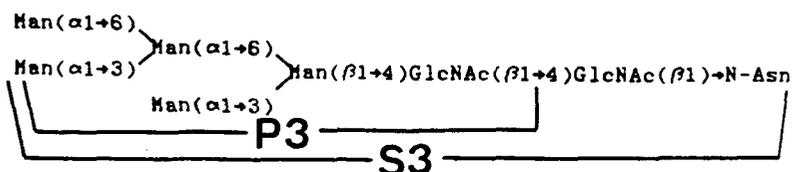
Activité sialosidique :



Activité asialosidique :



Activité oligomannosidique :



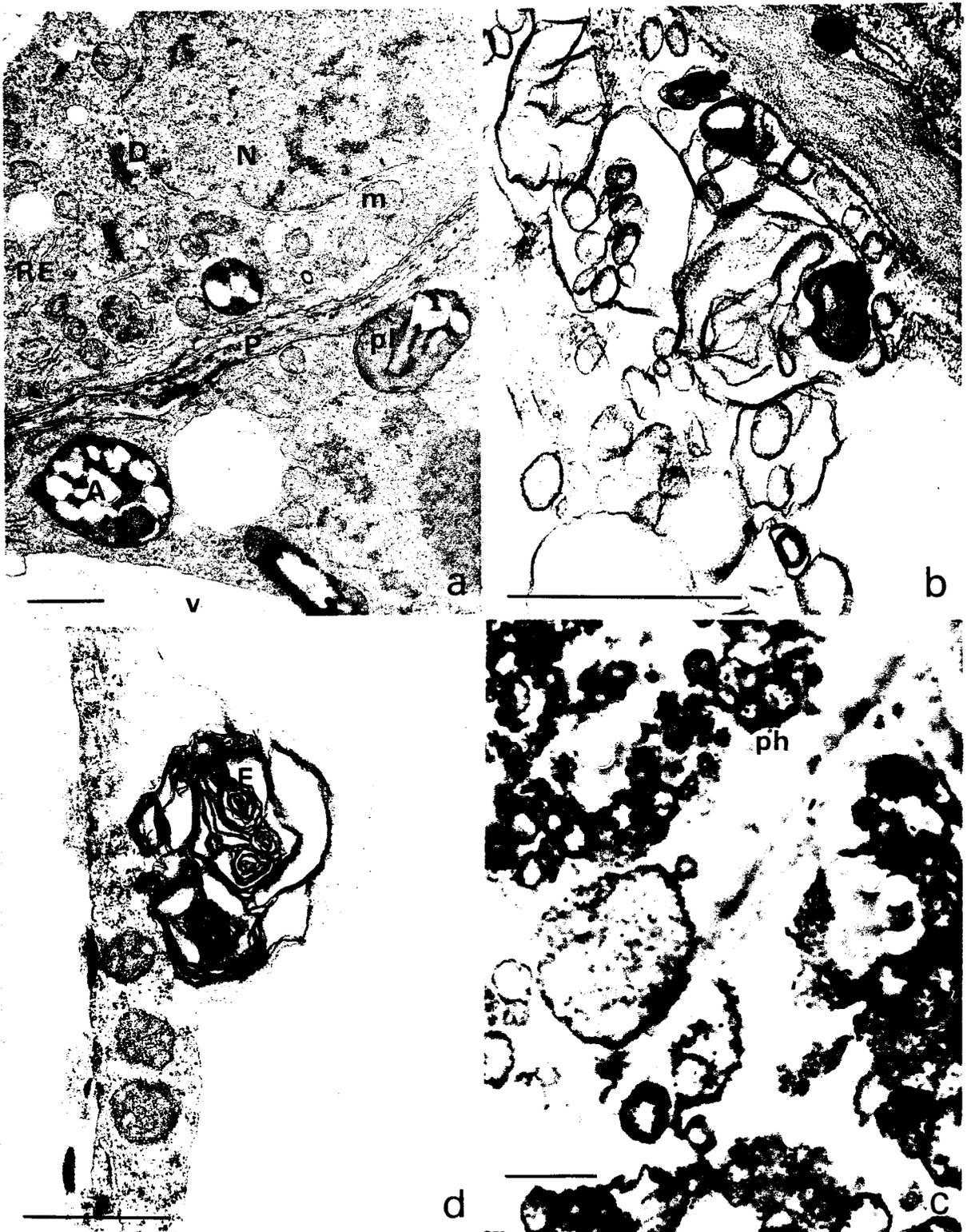


Figure 46 . - Ultrastructure des cellules de Silène.

a, Culture de 3 jours ; b, c, d, culture de 14 jours.

a, b et d, contrastant acétate d'uranyle et citrate de plomb ; c, mise en évidence de la phosphatase acide par la technique de GOMORI (1952) coupes observées sans autre contrastant.

A, amidon ; D, dictyosomes ; E, enroulements membranaires ; m, mitochondries ; N, noyau ; P, paroi ; ph, vésicules riches en phosphatase acide ; pl, plastés ; RE, réticulum endoplasmique ; v, vacuoles.

Echelle : 1 μ m.

matière sèche cellulaire diminue, conséquence de la carence en substrat carboné. Cette baisse s'explique en partie par une diminution des protéines et de la disparition des réserves glucidiques. L'observation en microscopie électronique de cellules âgées montre de nombreuses zones d'autophagie et, par conséquent, la perte de matériel cellulaire.

Une activité endoglucosaminidase est présente dans les cellules. Elle a un pH optimal de 7, ce qui plaide pour une origine cytosolique. Cette activité paraît augmenter au cours de la culture, puisqu'une cinétique enzymatique en présence du substrat $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ montre que l'hydrolyse est plus rapide pour les extraits cellulaires de 14, 17 et 30 jours, comparativement aux extraits des cellules de 3 et 8 jours. Une incubation en présence de glycannes complexes d'origine animale montre que ceux-ci ne sont pas dégradés.

DISCUSSION GENERALE

STRUCTURE ET FONCTION DES ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES

Le but du travail entrepris était d'étudier la relation structure-fonction des acides oligogalacturoniques, dans la perspective d'une meilleure compréhension de leurs propriétés biologiques. Ces dernières dépendent en grande partie de la taille des fragments pectiques utilisés. La technique de préparation employée a permis l'obtention de quantités importantes d'oligosaccharides, indispensables pour mener à bien des essais biologiques, au laboratoire et au sein des équipes collaboratrices. La spécificité des résultats, obtenus au cours des expérimentations effectuées avec ces molécules, est garantie par les caractérisations structurales précises et la vérification de l'état de pureté de chaque échantillon.

La conformation des acides oligogalacturoniques dépend en grande partie de leur forme d'association avec le calcium, c'est ce qui se dégage des études réalisées sur les polyélectrolytes en solution. Les données de la littérature concernant le type d'association des fragments pectiques avec le calcium sont donc essentielles pour appréhender leurs propriétés biologiques. Ceci est vrai non seulement en ce qui concerne la conformation des oligomères, mais aussi vis-à-vis de la mobilisation du calcium dans la cellule, compte-tenu de l'affinité particulière des polyuronates pour les cations divalents. Cependant, aucune étude n'a tenté de rapprocher les travaux des physico-chimistes et ceux des physiologistes.

Jusqu'à présent, les études des propriétés physico-chimiques des oligogalacturonates n'étaient basées que sur l'utilisation des techniques physiques, chimiques et spectroscopiques. Très récemment, LINNERS *et al.*, en 1989, sont parvenus à préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre l'acide pectique. Selon les auteurs, la reconnaissance est fonction de l'adoption d'une configuration en dimères "d'egg-box", c'est-à-dire de l'agencement intermoléculaire des molécules d'acide pectique avec le calcium. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'ion calcium est nécessaire à la reconnaissance antigénique, que celle-ci est optimale pour un rapport divalents/monovalents de 1/150 et que ce rapport est également le plus efficace pour la formation de dimères d'egg-box.

L'essentiel des résultats obtenus consiste en la démonstration d'un début de reconnaissance par l'anticorps à partir d'une taille de 7 résidus d'acide galacturonique (DP7)

Il est généralement admis (KOHN et LARSEN 1972, KOHN 1987) que la conformation en egg-box des acides pectiques n'apparaît qu'à partir des formes dodécamériques alors que chez les formes de moindre degré de polymérisation prédominent les liaisons électrostatiques. D'autres études sont plus nuancées. RAVANAT, en 1979, remarque qu'une sélectivité particulière des oligogalacturonates vis-à-vis du calcium s'établit à partir du tétramère. Il y aurait alors formation de paires d'ions, reliés autrement que par de simples liaisons électrostatiques. La structure supramoléculaire du pectate de calcium peut être appréciée par viscosimétrie. REES, en 1982, étudie l'influence de l'addition de rhamnogalacturonanes contenant des séquences variables d'acide homogalacturonique sur la variation de la viscosité d'un pectate de calcium. Il observe que les polymères contenant des séquences moyennes de 7 résidus d'acide galacturonique (calcul statistique) provoquent une baisse importante de la viscosimétrie. L'auteur en déduit que cette séquence limite est suffisante pour assurer une conformation en "egg-box". Pour faire concorder cette observation avec les travaux de KOHN sur les oligogalacturonates, REES propose que ceux-ci adoptent une conformation en "egg-box" par le biais d'un repliement intramoléculaire, ce qui explique une taille minimale d'environ 12 résidus.

Les résultats obtenus au cours de cette étude montreraient plutôt qu'un "egg-box" est possible à partir de l'heptamère, par la formation d'agrégats solubles d'au moins 2 molécules.

Que conclure de ces apparentes contradictions ?

Le modèle "egg-box" n'est au départ qu'une hypothèse permettant d'expliquer le comportement particulier des polyuronates de calcium, à travers la mesure de certains paramètres physico-chimiques. La nature de ces complexes chélatés est assez bien comprise à l'heure actuelle. La complexation des oligogalacturonates avec le calcium est probablement intermédiaire entre la formation de seules liaisons électrostatiques et l'adoption d'un réseau supramoléculaire. De plus, la nature des complexes ioniques dépend

vraisemblablement des conditions expérimentales liées au type d'analyse, qui garantissent une stabilité plus ou moins grande des associations. En respectant l'hypothèse selon laquelle la présence de calcium est indispensable pour que les anticorps anti-pectate reconnaissent un agencement moléculaire, il reste possible que cet agencement puisse être reconnu sans que la formation de chelats (egg-box) soit obligatoire. Les résultats obtenus, bien que préliminaires, montrent la difficulté d'appréhender les problèmes de conformation des polyélectrolytes.

Oligogalacturonates et déstabilisation pariétale

Lorsqu'un mélange d'acides oligogalacturoniques est introduit dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de *Silène*, on constate une augmentation de la fraction polysaccharidique acide extracellulaire. Cet effet est proportionnel à la taille des fragments utilisés. Il se produit très rapidement, dans les premières heures après le transfert des cellules dans le milieu contenant les oligogalacturonates. La même expérience, réalisée avec des parois isolées, provoque également une libération accrue de la fraction polysaccharidique pectique.

Des résultats comparables ont été obtenus par TAIZ, en 1984, consécutivement à l'ajout de pectines dans une préparation de parois isolées. L'auteur invoque l'affinité des pectines ajoutées pour le calcium pariétal, et donc une destructuration de la matrice pectique, formée en partie par des pectates de calcium. De même, cette affinité pourrait expliquer la non mobilité des gros fragments pectiques au sein d'un mésophylle de feuille observée par BAYDOUN et FRY (1985).

L'effet déstabilisateur des acides oligogalacturoniques porte vraisemblablement sur la compétition qui s'établit vis-à-vis du calcium pariétal. La proportionnalité de l'effet avec la taille des fragments pectiques et sa précocité corroborent cette hypothèse. Quantitativement, la libération des pectines est faible puisqu'elle ne dépasse pas quelques mg par gramme de matière fraîche. Par contre, les conséquences de ce stress restent méconnues. L'inhibition observée sur la croissance est peut-être attribuable à ces perturbations.

MORVAN, en 1982, avait remarqué que les polymères pectiques acides (PPA), isolés du milieu en fin de culture et ajoutés dans un milieu neuf, avaient une influence favorable sur la croissance. L'effet des oligogalacturonates est manifestement inverse. Cependant, il a été montré récemment que ces PPA contenaient des gibbérellines (hormones de croissance) liées covalentiellement, probablement responsables des effets stimulateurs (MORVAN *et al.* 1989).

Les effets sur la déstabilisation pariétale nécessitent des concentrations 10 à 100 fois plus élevées que les doses employées dans la plupart des essais biologiques. Ceci ne limite en rien l'intérêt de ces résultats. En effet, on peut admettre que l'effet de stress occasionné par un début de décapage de la matrice pectique ou au début de démobilitation calcique est un facteur de déclenchement d'effets biologiques, bien avant que l'on puisse détecter une modification de l'excrétion pectique.

Les propriétés physico-chimiques des acides oligogalacturoniques et leur influence sur la destructuration de la matrice pectique constituent donc une hypothèse quant à leur mode d'action au sein des systèmes biologiques.

Oligogalacturonates et élévation

Le rôle stimulateur des oligogalacturonates dans les réactions de défense a été recherché en collaboration avec d'autres laboratoires sur plusieurs modèles.

Les essais de protection antivirale, réalisés sur le modèle tabac/virus de la mosaïque, se sont révélés infructueux.

Loin de protéger la plante contre le virus, les oligogalacturonates semblent favoriser l'infection. Il s'agit peut-être d'une conséquence indirecte de l'effet qu'ils occasionnent sur la matrice pariétale.

Cependant, les oligogalacturonates sont parvenus à stimuler la biosynthèse d'enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes qui sont des marqueurs de la stimulation des défenses de la plante. Pourtant aucune protection n'a été observée. On mesure ici l'intérêt relatif des résultats de la littérature ne prenant en compte que ce type de marqueurs métaboliques.

D'autres essais ont été effectués sur le modèle hypocotyle de haricot. Là encore, les effets observés sont assez décevants. Tout au plus constate-t-on une légère stimulation d'un inhibiteur d'endopolygalacturonase. La biosynthèse des glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) n'est absolument pas stimulée.

Une remarque est toutefois intéressante : lorsqu'il y a un léger effet des fragments pectiques, celui-ci se manifeste plutôt pour les grands fragments. On retrouve donc l'importance de la taille dans la transmission d'un effet biologique.

Sans remettre en cause les résultats concernant les propriétés biologiques des acides oligogalacturoniques, il est probable que leur mode de présentation dans un tissu végétal et le choix même de ce tissu soient déterminants. De plus, certaines réponses nécessitent peut-être une action synergique de plusieurs éliciteurs, qui sont naturellement présents lors d'une infection parasitaire.

IDENTIFICATION ET ORIGINE DES OLIGOSACCHARIDES NATIFS

Identification de fragments pectiques

In situ, les polysaccharides pectiques sont constitués par une série de blocs disposés en alternance (JARVIS 1984), riches en acide galacturonique (homogalacturonanes) ou fortement branchés (rhamnogalacturonanes). Ces derniers contiennent principalement des monosaccharides neutres tels que le rhamnose, le galactose, l'arabinose et le glucose. Les fragments pectiques, mis en évidence dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène, proviennent de l'un ou de l'autre de ces blocs :

- les fractions oligosaccharidiques les plus lourdes, qui ne migrent pas en chromatographie sur papier (fraction 2-sup) ou qui sont exclues sur Biogel P2 (fraction A), sont riches en rhamnose, arabinose et galactose. On en déduit qu'il s'agit de fragments de type rhamnogalacturonane ;

- les oligosaccharides acides, riches en acide galacturonique, proviennent vraisemblablement des homogalacturonanes. Un constituant majeur, l'acide digalacturonique, est identifié par analyse de la composition molaire (GalAU majoritaire), par comparaison des migrations en chromatographie sur couche mince avec un témoin digalacturonate, préparé au laboratoire, et par analyse en spectrométrie de masse.

La présence d'oligosaccharides pectiques résulte, a priori, d'activités pectinasiques extracellulaires. Une activité pectinasiq ue a d'ailleurs été mise en évidence dans les parois des cellules de Silène, par incubation d'un extrait pariétal salin (NaCl 2 M) en présence d'acide pectique, à pH 4,5. Cette activité endopariétale, non détectable pendant les premiers jours de culture, atteint 150 équivalents GalAU.h⁻¹ et par gramme de matière fraîche au 14ème jour de culture. Quelques travaux font état de polygalacturonases, dont les activités sont intimement liées à la croissance (KONNO **et al.** 1981, 1989 ; GAFFE **et al.** 1989).

La prépondérance de l'acide digalacturonique peut s'expliquer par l'incapacité des exopolygalacturonases à l'utiliser comme substrat, comme le témoigne l'exopolygalacturonase d'*Avena sativa*, dont le Km est 50 fois plus élevé et une vitesse maximale d'hydrolyse 5 fois plus faible pour le dimère que pour l'acide polygalacturonique (PRESSEY et AVANTS 1977).

L'acide digalacturonique n'est pas le seul oligosaccharide acide présent dans le milieu extracellulaire. D'autres oligosaccharides acides, plus lourds, existent bien qu'ils n'ont pu être complètement identifiés. On peut les apparenter à l'acide pseudoaldobigalacturonique (Rha- α -1,2GalAU) ou à d'autres fragments contenant un ou plusieurs monosaccharides neutres, et qui empêchent ainsi l'action hydrolytique des pectinases.

L'acide galacturonique (dont le diGalAU) n'a pas été retrouvé dans les fractions oligosaccharidiques totales préparées pour l'étude cinétique d'excrétion (chap. IV). Il faut souligner que ces résultats ont été obtenus à partir d'une suspension cellulaire nouvellement préparée à partir de cals entretenus sur un milieu solide. L'absence de fragments acides peut être due à la déficience des activités pectinasiques ou à une réabsorption des produits

d'hydrolyse. On peut également supposer que ces activités ne finissent par s'exprimer qu'au terme d'un séjour prolongé des cellules en milieu liquide, lorsque la suspension commence à dégénérer.

Dans la première partie de l'étude, l'influence des acides oligogalacturoniques sur la stabilité de la matrice pariétale a été évoquée et discutée. Par ailleurs, les fragments pectiques sont doués d'activités biologiques, mises en évidence sur différents modèles (cf. Généralités). Leur présence dans le milieu extracellulaire correspond probablement à un état physiologique et à un métabolisme intrapariétal donnés. On peut imaginer que dans une plante ces molécules puissent constituer des messagers biologiques, dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire, en particulier. Il a été montré que les grands fragments pectiques injectés dans un tissu végétal ne pouvaient se déplacer (BAYDOUN et FRY 1985). Par contre, la migration de fragments pectiques de petite taille demeure une hypothèse que des études ultérieures devront confirmer.

Mise en évidence de glycannes de types oligomannosidique et xylomannosidique

Deux structures glycaniques, habituellement liées aux protéines N-glycosylées, ont été purifiées à l'état natif dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène. Leurs structures ont été identifiées par spectroscopie RMN du proton et spectrométrie de masse FAB-MS.

Le xylomannoside (oligosaccharide "C"), de structure $\text{Man } \alpha 1-6[\text{Man } \alpha 1-3][\text{Xyl } \beta 1-2]\text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc } \beta 1-4 [\text{Fuc } \alpha 1-3]\text{GlcNAc}$, a déjà été décrit dans de nombreuses glycoprotéines végétales (cf. Généralités). Cet oligosaccharide provient habituellement d'une digestion pronasique ou d'une hydrazinolyse, puisqu'il n'a pas encore été décrit à l'état libre. Son existence à l'état natif dans le milieu de culture a permis de l'isoler en quantité suffisante pour effectuer l'analyse RMN de la forme α / β , dont le spectre constitue une référence nouvelle.

L'oligomannoside (oligosaccharide "D"), de structure $\text{Man } \alpha 1-6[\text{Man } \alpha 1-3]\text{Man } \alpha 1-6[\text{Man } \alpha 1-3]\text{Man } \beta 1-4\text{GlcNAc}$, est également un constituant glucidique des glycoprotéines végétales. Ce type de structure a été très étudié, en particulier parce qu'on le retrouve dans la constitution des glycoprotéines animales et humaines.

La mise en évidence de glycannes de types oligomannosidique et xylomannosidique, libérés dans un milieu de culture de cellules végétales est assurément un résultat nouveau et original. Leur présence aurait pu être suspectée suite aux travaux de ROBERTS *et al.* (1982), car les auteurs, après avoir introduit de la glucosamine marquée dans le milieu de culture de la suspension cellulaire d'érable et éliminé le surplus, avaient constaté une augmentation de la radioactivité dans le milieu de culture et, particulièrement, dans la fraction non précipitée par l'éthanol. La radioactivité, portée par de petites molécules ("materials of low molecular weight"), apparaissait très faible jusqu'à 6 jours de culture et augmentait particulièrement à partir du 10^{ème} jour.

Une fois admise l'existence de ces composés dans les milieux extracellulaires, la question qui s'impose est celle relative à leur origine. Après vérification de l'absence de contamination par des microorganismes, la seule hypothèse valide consistait à prospecter dans le métabolisme cellulaire pour détecter des indices conformes aux données de la littérature et réunir des arguments expérimentaux cohérents.

Origine : protéolyse et autophagie

Hypothèse de départ : la protéolyse

A partir des données acquises sur le modèle animal, ce type d'oligosaccharides libres peut provenir soit d'une hydrolyse des complexes dolichol-PP-glycannes non transférés lors de la biosynthèse ("trimming"), soit du catabolisme protéique (cf. Généralités).

De ce fait, l'oligomannoside D pourrait avoir pour origine un disfonctionnement de la chaîne de biosynthèse, en admettant l'action complémentaire d'alpha-1,2-mannosidases pour libérer le mannose lié en α -1,2 sur le précurseur. Par contre, le xylomannoside C ne peut provenir que de la déglycosylation d'une protéine mature. L'hypothèse de départ consistera à considérer que les glycanes isolés et purifiés sont des produits de la dégradation de protéines N-glycosylées. Cette altération est probablement très spécifique car elle comprend des activités protéasiques (absence de résidus d'acides aminés) et apparaît comme incomplète de par la préservation des structures biantennées (absence de glycosidases).

Le processus d'autophagie

Lorsque des cellules végétales sont privées de substrat nutritif, il se produit un certain nombre d'évènements biochimiques qui ont pour but de les maintenir en état de survie. Ils induisent l'autophagie d'organites et de territoires cytoplasmiques. JOURNET *et al.*, en 1986, ont décrit en détail ces évènements chez les cellules d'érable, cultivées dans un milieu privé de saccharose et ont constaté une évolution chronologique du métabolisme cellulaire.

- Dans un premier temps, les saccharides solubles contenus dans les vacuoles sont consommés.

Dans les cellules de *Silène* âgées de 3 jours, le glucose constitue 20 % de la matière sèche totale, ce qui montre à quel point les cellules accumulent ce composé. Cette teneur élevée crée provisoirement un potentiel osmotique bas à l'intérieur des cellules et permet l'absorption de l'eau et des autres éléments nutritifs nécessaires à la croissance.

- Les sucres vacuolaires consommés, le phosphate organique augmente dans les cellules au détriment du phosphate inorganique, conséquence de l'action de phosphatases acides, caractéristique d'une consommation des réserves amylacées (REBEILLE *et al.* 1985).

Les grains d'amidon, très nombreux à 3 jours de culture (fig. 46), ont pratiquement disparu dans les cellules âgées de 14 jours. A ce moment de la culture, une réaction cytochimique spécifique des phosphatases acides montre effectivement leur abondance au niveau des zones d'autophagie, dans le cytoplasme.

- Lorsque les réserves glucidiques ont complètement disparu, le nombre de mitochondries par cellule diminue, ce qui se traduit par une baisse globale de la respiration. Les lipides, protéines et acides nucléiques sont alors utilisés à des fins énergétiques. La baisse de la quantité de protéines s'accompagne d'une diminution parallèle du taux des galactolipides. Ceux-ci, comprenant les mono- et digalactosylglycérides, sont caractéristiques des membranes plastidiales.

L'oligosaccharide E, de structure Gal-1,6-Gal-Gly⁰¹ (ou partiellement estérifié), est un résidu de digalactosylglycérides. Sa présence dans le milieu en fin de culture confirme la détérioration des membranes plastidiales. Une observation en microscopie électronique de cellules âgées montre l'abondance des lysosomes et l'enchevêtrement de membranes provenant de la résorption de ces organites (fig. 46). Un bon marqueur de cette lyse membranaire est l'augmentation de la phosphatidylcholine (DORNE **et al.** 1987).

Lors de l'étude cinétique de l'excrétion des oligosaccharides par les cellules de Silène, c'est à partir de la disparition totale du substrat carboné dans les cellules (14 jours) que la production en oligo- et xylomannosides est la plus forte.

Protéolyse, mais quelles protéines ?

L'évolution des protéines totales et des protéines cellulaires solubles a été suivie au cours du cycle de culture. La baisse de matière sèche est accompagnée d'une baisse parallèle des protéines cellulaires solubles alors que les protéines totales ne diminuent que beaucoup plus faiblement. Pour trouver une explication à ces observations, il est nécessaire de considérer la localisation des protéines dans une cellule végétale. Les parois peuvent contenir jusqu'à 40 % de protéines qui sont généralement immobilisées par des

liaisons ioniques et covalentes avec les polysaccharides pariétaux. Il s'agit surtout de protéines O-glycosylées qui sont souvent associées à des arabinogalactanes. Les parois des cellules de Silène de 14 jours représentent 15 % de la masse sèche totale (MORVAN 1986). Elles sont constituées d'environ 30 % de protéines (MORVAN, comm. pers.). Ces protéines pariétales représentent donc une proportion importante et relativement stable des protéines totales, expliquant que leur diminution ne soit pas très sensible, en fin de culture.

Les protéines cellulaires ont en partie un rôle fonctionnel. Elles ont alors une localisation cytosolique ou sont associées à des membranes. La baisse de l'activité métabolique peut expliquer leur dégradation et le phénomène d'autophagie aboutir à la digestion d'organites intracellulaires. Hormis les protéines enzymatiques, les végétaux sont à même de stocker des protéines dans leur vacuole où elles constituent une réserve azotée. Ainsi WITTENBACH (1983) a identifié une glycoprotéine de réserve dans les feuilles de soja. C'est également le cas dans les grains d'aleurone qui constituent des vacuoles déshydratées où les N-glycoprotéines représentent 50 % des protéines totales.

Un autre fait mérite d'être signalé : en 1972, ROBERTS *et al.* ont traité différents tissus avec de la glucosamine marquée, de façon à localiser par autoradiographie les régions ayant fixé la radioactivité.

Les cellules d'érable en suspension cellulaire ont été étudiées par cette méthode et la radioactivité a été essentiellement localisée au niveau des parois. Les auteurs n'ont pu formuler d'hypothèse particulière, ce résultat étant en contradiction avec la nature essentiellement O-glycosylée des protéines pariétales. Par contre, l'expérience a également été réalisée sur des tissus racinaires de maïs, et la radioactivité a été retrouvée uniquement dans le cytoplasme. Ainsi, les données figurant dans la littérature permettent de penser que ce sont effectivement les protéines intracellulaires qui supportent les premières dégradations lorsque se déclenche un processus d'autophagie. Toutefois, faute de l'avoir étudié chez les cellules de Silène, il faudra se garder de toute conclusion hâtive.

Les enzymes de déglycosylation

La libération des structures glycaniques s'effectue sous l'action d'endoglycosidases. On distingue 2 grandes familles selon qu'elles hydrolysent le résidu di-N-acétylchitobiose interne (endo- β -N-acétylglucosaminidases ou ENGases) ou la liaison asparagine-oligosaccharide (peptide-N⁴-(N-acétyl-glucosaminyl)-asparagine amidase, ou PNGases). L'ensemble des endoglycosidases et leurs substrats privilégiés ont été répertoriés par MALEY *et al.* (1989).

La libération des oligosaccharides C et D provient probablement de l'action d'endoglycosidases et la figure 47 représente les voies d'hydrolyse possibles pouvant conduire à cette libération. En effet, une activité endoglycosidasique a été mise en évidence dans un broyat de cellules de Silène. L'activité existe déjà en début de culture, mais elle paraît augmenter à partir de 14 jours (fig. 44). Cette enzyme est active sur le substrat $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ mais ne peut dégrader les sialilo- et asialilooligosaccharides (fig. 45). Cette enzyme peut donc être à l'origine de la libération de l'oligosaccharide D sans que l'on puisse préjuger de son substrat d'origine.

Chez les végétaux, d'autres endoglycosidases ont été isolées à partir de la figue (OGATA-ARAKAWA *et al.* 1977) et du haricot rouge (YET et WOLD 1988). Ces 2 enzymes sont incapables d'hydrolyser les glycannes complexes. L'ENGase du haricot agit sur des protéines mannosylées (RNase β , CM-RNase β , Invertase). Celle-ci est active dans une gamme très large de pH compris entre 4,5 et 7,5 ; l'ENGase de la figue entre 5,5 et 6.

L'ENGase, contenue dans les cellules de Silène, n'agit qu'à pH 7 et ne possède aucune activité à pH 4, ce qui plaide en faveur d'une localisation cytosolique. Il semble que son spectre d'activité soit donc beaucoup plus restreint que celui des ENGases décrites précédemment, encore que nous n'ayons étudié que 2 conditions extrêmes de pH.

Le xylomannoside C, fucosylé en 3 au niveau de la N-acétylglucosamine du point d'attache, ne peut être libéré sous l'action des endoglycosidases. Sa libération nécessite soit l'action préliminaire de fucosidases (mais il y aurait alors disparition du fucose), soit l'action des PNGases, capables d'agir en

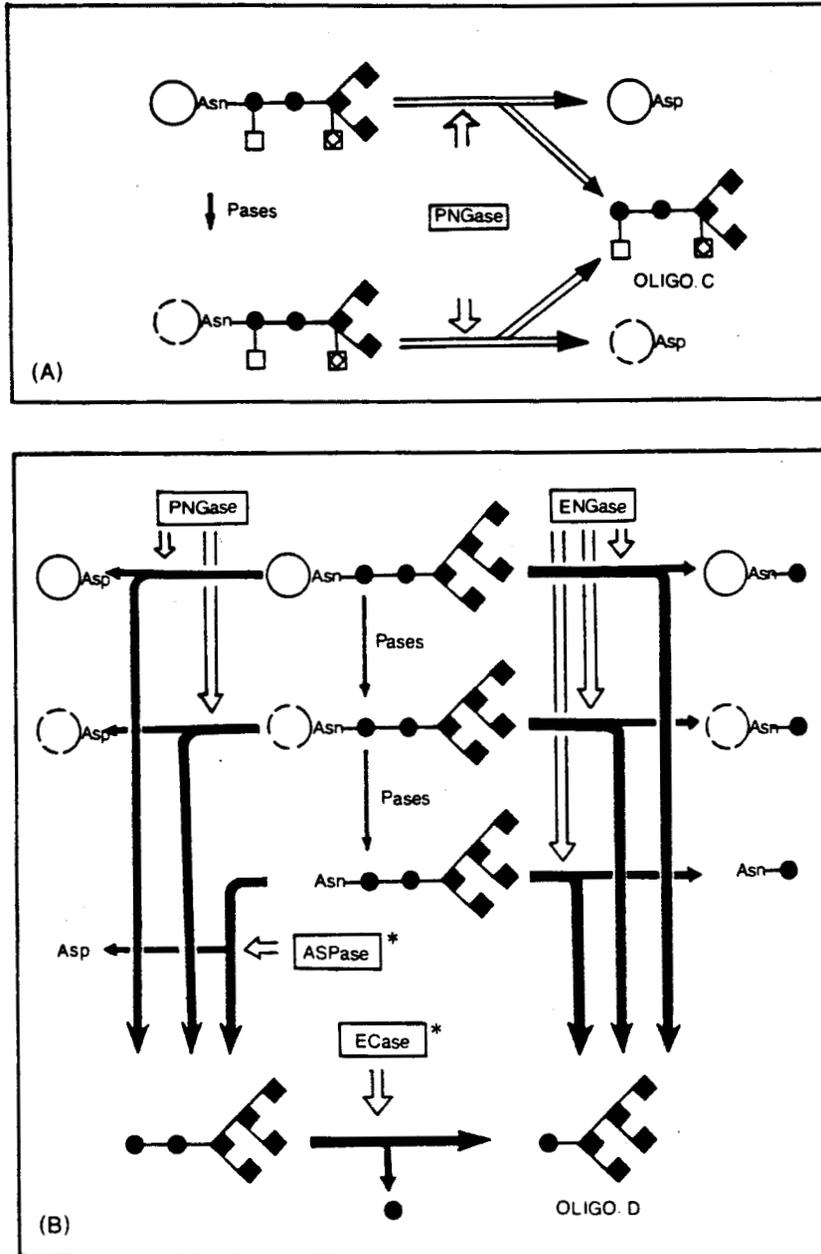


Figure 47. - Différentes voies de dégradation possibles des N-glycoprotéines pouvant être à l'origine des oligosaccharides C et D.

Enzymes : Pases, protéases ; PNGase, peptide-N⁴-(N-acétyl-β-glycosaminyl)-asparagine amidase ; ENGase, endo-β-N-acetylglucosaminidase ; ASFase, aspartyl-N-acetylglucosaminidase ; ECCase, endochitobiase.

Sucres : (●), GlcNAc ; (◆), Man ; (□), Fuc ; (◻), Xyl.

(*), enzymes non décrites chez les plantes.

présence du fucose. Les PNGases ont été purifiées à partir de l'amande (PNGase A) (TAGA **et al.** 1984) et du haricot rouge (YET et WOLD 1988). Elles sont par ailleurs présentes dans de nombreuses graines (PLUMMER **et al.** 1987). Leur pH optimal est compris entre 4 et 6. La PNGase d'amande est capable de déglycosyler des protéines non dénaturées à une vitesse toutefois plus faible qu'après dénaturation.

Ce type d'enzyme n'a pas été recherché dans les cellules de Silène, mais la présence des xylomannosides témoigne de leur existence.

De nouvelles oligosaccharines ?

La préservation des structures glycaniques lors de la protéolyse résulte de la déficience ou de la non expression de glycosidases spécifiques (mannosidases, fucosidases, ...). Les glycannes s'accumulent donc dans le milieu extracellulaire, à des concentrations élevées (plusieurs mg par litre).

Une hypothèse séduisante peut être formulée dans le cadre de la recherche d'activités éventuelles de ces molécules : les glycannes excrétés sont les témoins d'un état d'autophagie. D'abord véhiculés dans le liquide intercellulaire puis dans les tissus conducteurs, ils pourraient avoir un rôle de mise en alerte des tissus non encore concernés par la carence nutritive (étant donné le décalage temporel entre l'absence de nutriments extracellulaires et l'épuisement des réserves glucidiques intracellulaires). Cette information aurait pour but de ralentir le métabolisme énergétique des cellules environnantes.

Cette hypothèse est étayée par une expérience réalisée par STRUIK **et al.** (1987). Ces auteurs ont montré que l'injection d'extraits apoplastiques de feuilles de pomme de terre avait un effet inhibiteur sur la tubérisation et que cet effet augmentait si les feuilles avaient subi, au préalable, un séjour prolongé à l'obscurité. Dans ces conditions de mise en obscurité, il est évident qu'il se produit un appauvrissement des apports glucidiques et que les plantes puisent dans leurs réserves favorisant ainsi la protéolyse. En poussant la spéculation jusqu'à son terme, la mise en évidence par WITTENBACH, en 1983, d'une protéine de réserve foliaire N-glycosylée devient un résultat

susceptible de servir de point de départ pour tenter d'identifier l'inhibiteur apoplastique extrait des feuilles de pomme de terre.

Mise en évidence de fragments de xyloglucanes

En fin de culture, les fragments de xyloglucanes ne sont pas majoritaires dans le milieu, contrairement aux oligomannosides. Ceci n'est pas surprenant compte-tenu que leur présence dans les milieux de culture dépend surtout de la croissance pariétale (cf. Généralités). La caractérisation d'un fragment de xyloglucanes ayant été effectuée et le fait qu'ils appartiennent potentiellement à la famille des oligosaccharines amènent cependant quelques commentaires.

Un fragment xyloglucanique, de structure probable Xyl_4Glc_3 , a été analysé par spectrométrie FAB-MS. Cet oligosaccharide possède des ramifications à 2 résidus xylosyls, alors qu'habituellement les substitutions n'en possèdent qu'un seul sur lequel peuvent s'ajouter de l'arabinose, du fucose et du galactose (cf. Généralités). Ce type de substitution est d'ailleurs si peu usité que les dernières revues générales traitant du sujet (FRY 1989, HAYASHI 1989) n'en mentionnent même pas l'existence. Pourtant, le même type de structure a été rapporté dans les xyloglucanes de rose (JOSELEAU et CHAMBAT 1984) et de ronce (CARTIER 1986). Face à la pénurie des travaux concernant les propriétés biologiques de ce type d'oligosaccharides et compte-tenu de leur existence dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène, il s'agit là d'une des perspectives de développement de ce travail.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les acides oligogalacturoniques, issus de la dégradation des parois végétales, présentent des propriétés biologiques qui les apparentent à la famille des oligosaccharines. Quelques hypothèses ont été formulées à propos de leur mode d'action sans qu'aucune donnée expérimentale ne permette, jusqu'à présent, de privilégier l'une d'entre elles.

Le caractère acide de ces oligosaccharides oriente les investigations en direction de leurs propriétés physico-chimiques. En effet, les propriétés polyélectrolytiques de l'acide polygalacturonique ont été décrites précisément et ont servi de référence pour déterminer le comportement des fragments de moindre taille. Il a été ainsi démontré que l'affinité des oligosaccharides acides vis-à-vis du calcium devenait identique à celle des polymères dès lors que les premiers comptaient 12 résidus galacturonosyls. L'étude immunochimique, réalisée dans le cadre d'une collaboration et décrite dans ce mémoire, suggère un changement d'état conformationnel des oligogalacturonates de calcium à partir d'un degré de polymérisation égal à 7.

Il se dégage des résultats présentés dans la littérature que la taille des fragments pectiques influence leur activité biologique. C'est ainsi que l'induction de la biosynthèse des phytoalexines dans les cotylédons de soja n'apparaît qu'à partir du nonasaccharide. Il en est de même des effets morphogénétiques observés sur les couches cellulaires minces du tabac. Par contre, la biosynthèse d'un facteur inhibiteur de protéases peut être obtenue en présence du trisaccharide. La taille de l'éliciteur discrimine donc en plusieurs catégories les effets qu'il induit. L'hypothèse selon laquelle cette ségrégation est une conséquence d'états conformationnels différents peut être formulée.

L'influence des oligogalacturonates sur les cellules de *Silène* n'échappe pas à la règle et la stimulation de l'excrétion des polymères pectiques acides pendant les premières heures de culture varie en fonction de la taille des oligomères introduits dans le milieu. L'explication la plus vraisemblable est que les oligogalacturonates, dont l'affinité pour le calcium n'est plus à démontrer, entrent en compétition avec les pectines de la paroi vis-à-vis de ce cation. Etant donné le rôle important du calcium pour la cohésion de la

matrice pariétale, la présence des oligogalacturonates provoque localement une perturbation des équilibres physico-chimiques et déstabilise les polymères pectiques qui sont finalement libérés plus aisément dans le milieu de culture. L'importance du calcium a été soulignée, y compris dans les mécanismes de défense des végétaux. En effet, une privation en calcium supprime l'effet inducteur d'un éliciteur fongique sur la biosynthèse des phytoalexines par les cellules de soja.

Dans ces conditions, il se dégage une piste privilégiée pour expliquer le mode d'action des oligogalacturonates. Ceux-ci provoqueraient une déstructuration de la matrice pectique par l'intermédiaire de leur effet compétiteur vis-à-vis du calcium intrapariétal.

Les résultats obtenus dans cette étude de la relation structure-fonction des oligogalacturonates ont permis d'aborder sans ambiguïté la discussion des données acquises sur le sujet. Il faut toutefois tenir compte de leur caractère préliminaire et fragmentaire. Tout en admettant que des arguments nouveaux ont été apportés dans le débat concernant le mode d'action des oligogalacturonates, la description des effets biologiques devra être complétée par le suivi du pool calcique intrapariétal et par la mesure de l'état de cohésion intercellulaire. L'idéal serait de disposer d'un modèle où parallèlement on puisse observer une réaction d'élicitation décrite dans la littérature. L'acquisition de réponses positives confirmerait la validité des options prises.

Les effets physico-chimiques exercés par les oligogalacturonates dans la paroi n'excluent pas d'autres types d'action. Les activités hydrolasiques intrapariétales sont, en effet, susceptibles de réagir à la présence de fragments qui représentent des produits de leur activité et des perturbateurs potentiels de l'environnement local (pH, activité ionique, ...). Enfin, un point concerne la possibilité d'existence de récepteurs membranaires, avec ou non internalisation des oligosaccharides. Ce point reste à prospecter, à la lumière des controverses existant déjà à propos de la mobilité des oligogalacturonates dans les différentes parties d'une plante.

La prospection exhaustive du contenu oligosaccharidique du milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène a abouti à la découverte d'oligo- et xylomannosides, issus de protéines N-glycosylées. Il s'agit d'un résultat dont l'importance est difficile à apprécier parfaitement aujourd'hui. En effet, les études portant sur les oligosaccharides endogènes des végétaux se limitaient, jusqu'à présent, aux fragments pectiques et xyloglucaniques. Les résultats obtenus permettent en premier lieu d'assurer que ces oligosaccharides apparaissent en fin de culture. Selon toute vraisemblance, ils résultent du processus d'autophagie caractéristique de cellules carencées en substrats nutritifs.

Il faut reconnaître, à ce niveau, que la mise en évidence des oligosaccharides natifs a été facilitée par la nature du modèle biologique. Les suspensions cellulaires sont des systèmes auxquels on reproche fréquemment leur caractère artificiel parce que les observations qu'elles permettent ne sont pas toujours transposables à l'échelle du végétal entier. Elles montrent, dans le cas présent, une facette de leur atout principal, la dissociation relative des cellules qui autorise l'émission dans le milieu de culture de composés issus du métabolisme cellulaire, difficiles à repérer dans un organisme entier. Par contre, une fois signalée leur existence, il sera possible de prospecter dans le but de répondre à quelques questions :

- Quelle est l'importance de la glycosylation dans le stockage des réserves protéiques ?
- Les enzymes de déglycosylation, caractéristiques d'un état d'autophagie, sont-elles les mêmes que celles qui interviennent dans la protéolyse des graines en germination ?
- L'excrétion des glycannes, témoin du catabolisme des N-glycoprotéines, est-elle une caractéristique des tissus végétaux en état d'autophagie cellulaire ?
- La préservation des structures glycaniques constitue-t'elle un nouveau schéma de régulation, conférant aux oligosaccharides un rôle de témoin moléculaire du catabolisme cellulaire ?

- L'émission des oligo-N-glycannes dans les espaces intercellulaires est-elle la première condition à une distribution ultérieure de ces molécules dans d'autres tissus ou organes, leur conférant ainsi un rôle de vecteur d'information endogène ?

Nous sommes convaincu que ces questions ne resteront pas longtemps sans réponses et nous espérons qu'elles contribueront à la meilleure compréhension du métabolisme chez les végétaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERSHEIM P., DARVILL A.G., McNEIL A.G., VALENT M., SHARP J.K. **et al.**, 1983

Oligosaccharins, naturally occurring carbohydrates with biological regulatory functions.

In : Structure and function of plant genomes. Cifferi O. and L. Dure (Eds), III, New-York:Plenum, pp. 293-312.

ANUMULA K.R. and R.G. SPIRO, 1983

Release of glucose-containing polymannose oligosaccharides during glycoprotein biosynthesis.

J. Biol. Chem., 258 : 15271-15282.

ASHWELL S., 1957

Colorimetric analysis of sugars.

Meth. Enzymol., 3 : 73-105.

ASPINALL G.O., MOLLOY J.A. and J.W.T. CRAIG, 1969

Extracellular polysaccharides from suspension-cultured sycamore cells.

Can. J. Biochem., 47 : 1063-1070.

BARNOUD F., DUTTON G.G. et J.P. JOSELEAU, 1973

La D-xylane du roseau *Arundo donax*.

Carbohydr. Res., 27 : 215-223.

BARNOUD F., MOLLARD A. et G.G.S. DUTTON, 1977

Une xyloglucane β (1,4) présente dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de *Rosa glauca*.

Physiol. Vég., 15 : 153-161.

BAUER W.D., TALMADGE K.W., KEEGSTRA K. and P. ALBERSHEIM, 1973

The structure of plant cell walls. II - The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells.

Plant Physiol., 51 : 174-187.

BAYDOUN E.A.H. and S.C. FRY, 1985

The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone.

Planta, 165 : 269-276.

BELARD M., CACAN R. and A. VERBERT, 1988

Characterization of an oligosaccharide-pyrophodolichol pyrophosphatase activity in yeast.

Biochem. J., 255 : 235-242.

BISHOP P.D., MAKUS D.J., PEARCE G. and C.A. RYAN, 1981

Proteinase inhibitor-inducing activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 3536-3540.

BISHOP P.D., PEARCE G., BRYANT J.E. and C.A. RYAN, 1984

Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves : identify and activity of poly- and oligo- galacturonide fragments.

J. Biol. Chem., 259 : 13172-13177.

- BLUMENKRANTZ N. and G. ASBOE-HANSEN, 1973
New method for quantitative determination of uronic acids.
Anal. Biochem., 54 : 484-489.
- BOLLER T., 1985
Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens.
In : Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. Key J. and T. Kosuge (Eds), New-York, Liss, pp. 247-262.
- CACAN R., HOFLACK B. and A. VERBERT, 1980
Fate of oligosaccharide-lipid intermediates synthesized by resting Rat-spleen lymphocyte.
Eur. J. Biochem., 106 : 473-479.
- CACAN R., LEPERS A., BELARD M. and A. VERBERT, 1989
Catabolic pathway of oligosaccharide-diphospho-dolichol. Subcellular sites of degradation of the oligomannoside moiety.
Eur. J. Biochem., 185 : 173-179.
- CARTIER N., 1986
Les polysaccharides de la paroi primaire de cellules de **Rubus fruticosus** cultivées en suspensions. Intervention des polyosidases endogènes dans leur réarrangement au cours de la croissance.
Thèse ès-Sciences, Université de Grenoble, 466 p.
- CLELAND R., 1971
Cell wall extension.
Ann. Rev. Plant Physiol., 22 : 197-222.
- D'ANDREA G., BOUWSTRA J., KAMERLING J. and J.F.G. Vliegenthart, 1988
Primary structure of the xylose-containing N-linked carbohydrate moiety from ascorbic acid oxidase of **Cucurbita pepo medullosa**.
Glyconj. J., 5 : 151-157.
- DARVILL A.G., McNEIL M. and P. ALBERSHEIM, 1978
Structure of plant cell walls. VIII - A new pectic polysaccharide.
Plant Physiol., 62 : 418-422.
- DIXON R.A., 1986
The phytoalexin response : elicitation, signalling and control of host gene expression.
Biol. Rev., 61 : 239-291.
- DORLAND L., VAN HALBEEK H., Vliegenthart J.F.G. and N. SHARON, 1981
Primary structure of the carbohydrate chain of soybean agglutinin.
J. Biol. Chem., 256 : 7708-7711.
- DORNE A.J., BLIGNY R., REBEILLE F. and R. DOUCE, 1987
Fatty acid disappearance and phosphorylcholine accumulation in higher plant cells after a long period of sucrose deprivation.
Plant Physiol. Biochem., 25 : 589-595.

- DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1973
Culture *in vitro* de tissus et de suspensions cellulaires du Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause).
Bull. Soc. Bot. N. Fr., 26-27 : 43-54.
- EDA S., KODAMA H., AKIYAMA Y., MASATAKA M., KATO K., ISHIZU A. and J. NAKATO, 1983
An arabinoxyloglucan from the cell walls of suspension-cultured Tobacco cells.
Agri. Biol. Chem., 47 : 1791-1797.
- EDWARDS M., DEA I.C.M., BULPIN P.V. and J.S.G. REID, 1985
Xyloglucan (amyloid) mobilization in the cotyledons of *Tropaeolum majus* L. seeds following germination.
Planta, 163 : 133-140.
- ENGLISH P.D., MAGLOTHIN A., KEEGSTRA K. and P. ALBERSHEIM, 1972
A cell wall-degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*.
Plant Physiol., 49 : 293-297.
- ERNST R.A., 1966
In : Advances in magnetic resonance. Vaugh J.S. (Ed.), Academic Press, London, New-York, p. 1-135.
- FARKAS V. and G. MacLACHLAN, 1988
Stimulation of pea β -1,4-glucanase activity by oligosaccharides derived from xyloglucan.
Carbohydr. Res., 184 : 213-219.
- FAYE L., JOHNSON K.D. and M.J. CHRISPEELS, 1986a
Oligosaccharide side chains of glycoproteins that remain in the high-mannose form are not accessible to glycosidases.
Plant Physiol., 81 : 206-211.
- FAYE L., BOLLINI R., VITALE A. and M.J. CHRISPEELS, 1986b
The position of the oligosaccharide side-chains of phytohemagglutinin and their accessibility to glycosidases determines their subsequent processing in the Golgi.
Eur. J. Chem., 158 : 655-661.
- FAYE L., B. MOUATASSIM and A. GHORBEL, 1986c
Cell wall and cytoplasmic isozymes of radish β -fructosidase have different N linked oligosaccharides.
Plant Physiol., 80 : 27-33.
- FAYE L. and M.J. CHRISPEELS, 1987
Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in Jack-bean.
Plant Physiol., 170 : 217-224.
- FAYE L. and M.J. CHRISPEELS, 1989
Apparent inhibition of β -fructosidase secretion by tunicamycin may be explained by breakdown of the unglycosylated protein during secretion.
Plant Physiol., 89 : 845-851.

FAYE L., JOHNSON K.D., STURM A. and M.J. CHRISPEELS, 1989
Structure, biosynthesis and function of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins.

Physiol. Plant., 75 : 309-314.

FOURNET B., LEROY Y., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. and R.D. PORETZ, 1987

Primary structure of an N-glycosidic carbohydrate unit derived from *Sophora japonica* lectin.

Eur. J. Biochem., 166 : 321-324.

FRY S.C., 1983

Ferruloylated pectins from the primary cell wall : their structure and possible functions.

Planta, 157 : 111-123.

FRY S.C., 1986

In vivo formation of xyloglucan nonasaccharide : a possible biologically active cell wall fragment.

Planta, 169 : 443-453.

FRY S.C., 1989

The structure and functions of xyloglucan.

J. Exp. Bot., 40 : 1-11.

GAFFE J., MORVAN C., JAUNEAU A. and M. DEMARTY, 1989
Demonstration of polygalacturonase and pectinmethylesterase activities in cell walls of flax hypocotyls and calli.

C. R. Acad. Sci., 308 : 1076-113.

GOLLIN D.J., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1984

Plant cell wall fragments inhibit flowering and promote vegetative growth in *Lemna gibba* G3.

Biol. Cell., 51 : 275-280.

GOMORI G., 1952

Microscopic histochemistry : principles and practices.

Univ. Chicago Press, Chicago, p. 193.

HAGER A., MENZEL H. and A. KRAUSS, 1971

Versuche und hypothese zur primärwirkung des auxins beim strekungs wachstum.

Planta, 100 : 47-75.

HAHN M.G., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1981

Host-pathogen interactions. XIX - The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybean.

Plant Physiol., 68 : 1161-1169.

HARGREAVES J.A. and C. SELBY, 1978

Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to an extract of bean hypocotyl.

Phytochemistry, 17 : 1099-1102.

HARRIS N. and M.J. CHRISPEELS, 1975

Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. **Plant Physiol.**, 56 : 292-299.

HAYASHI T., 1989

Xyloglucans in the primary cell wall.

Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40 : 139-168.

HSU A.F., BAYNES J.W. and E.C. HEALTH, 1974

The role of a dolichol-oligosaccharide as an intermediate in glycoprotein biosynthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71 : 2390-2395.

ISHII K., IWASAKI M., INOUE S., KENNY P.T.M., KOMURA H. and Y. INOUE, 1989

Free sialooligosaccharides found in the unfertilized eggs of a fresh water trout, *Plecoglossus altivelis*.

J. Biol. Chem., 264 : 1623-1630.

JAMET E. and B. FRITIG, 1986

Purification and characterization of 8 of the pathogenesis-related proteins in tobacco leaves reacting hypersensitively to tobacco mosaic virus.

Plant Molec. Biol., 6 : 69-90.

JARVIS M., 1984

Structure and properties of pectin gels in plant cell walls.

Plant. Cell Env., 7 : 153-164.

JIN D.J. and C.A. WEST, 1984

Characteristics of galacturonic acid oligomers as elicitors of chitinase synthetase activity in castor bean seedlings.

Plant Physiol., 74 : 989-992.

JONES T.M. and P. ALBERSHEIM, 1972

A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides.

Plant Physiol., 49 : 926-936.

JOSELEAU J.P. and G. CHAMBAT, 1984

Structure of the primary cell walls of suspension-cultured *Rosa glauca*. II - Multiple forms of xyloglucans.

Plant Physiol., 74 : 694-700.

JOURNET E.P., BLIGNY R. and R. DOUCE, 1986

Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells.

J. Biol. Chem., 261 : 3193-3199.

KATO Y. and K. MATSUDA, 1981

Occurrence of a soluble and low molecular weight xyloglucan and its origin in etiolated mung bean hypocotyls.

Agric. Biol. Chem., 45 : 1-8.

KAUFFMANN S., LEGRAND S., GEOFFROY P. and B. FRITIG, 1987
Biological function of "pathogenesis-related" proteins : four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity.
EMBO J., 6 : 3209-3212.

KIMURA Y., HASE S., KOBAYASHI Y., KYOGOKU Y., IKENAKA T. and G. FUNATSU, 1988
Structures of sugar chains of ricin D.
J. Biochem., 103 : 944-949.

KOHN R. and B. LARSEN, 1972
Preparation of water-soluble glycuronans and their calcium salts, and the determination of calcium ion activity in relation to the degree of polymerisation.
Acta Chem. Scand., 26 : 2455-2468.

KOHN R. and O. LUKNAR, 1977
Intermolecular calcium ion binding on polyuronates-polygalacturonate and polyguluronate.
Coll. Czech. Chem. Comm., 42 : 731-744.

KOHN R., 1987
Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin.
Carbohydr. Res., 160 : 343-353.

KONNO H., KATOH K. and Y. YAMASAKI, 1981
Studies on the pectic depolymerases. I - Exopolygalacturonase from root tissues and cell suspension cultures of carrots.
Plant Cell Physiol., 22 : 899-909.

KONNO H., YAMASAKI Y. and K. KATOH, 1989
Extracellular exopolygalacturonase secreted from carrot cell cultures. Its purification and involvement in pectic polymer degradation.
Physiol. Plant., 76 : 514-520.

KOYAMA T., HAYASHI T., KATO Y. and K. MASUDA, 1981
Degradation of xyloglucan-degrading enzymes in soybean cell wall.
Plant Cell Physiol., 22 : 1191-1198.

KOYAMA T., HAYASHI T., KATO Y. and K. MASUDA, 1983
Degradation of xyloglucan by wall-bound enzymes from soybean tissue. II - Degradation of the fragment heptasaccharide from xyloglucan and the characteristic action pattern of the α -D-xylosidase in the enzyme system.
Plant Cell Physiol., 24 : 155-162.

KUROSAKI F., TSURUSAWA Y. and A. NISHI, 1987
The elicitation of phytoalexins by calcium and cyclic AMP in carrot cells.
Phytochemistry, 26 : 1919-1923.

LAFITTE C., 1983
Les inhibiteurs protéiques de polygalacturonases fongiques : étude particulière chez les haricots présentant ou non le gène "Cornell" de résistance à l'antracnose.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université de Toulouse, 75 p.

- LAMB C.J., BELL J.N., CORBIN D.R., LAWTON M.A. and M.C. MEHDY, 1987
 Activation of defense genes in response to elicitor and infection.
In : Molecular Strategies for Crop Protection. Arnyzen C.J. and C.A. Ryan
 (Eds), New-York, Liss, pp. 49-58.
- LEGRAND M., KAUFFMANN S., GEOFFROY P. and B. FRITIG, 1987
 Biological function of "pathogenesis-related" proteins : four tobacco
 PR-proteins are chitinases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 6750-6754.
- LESCURE A.M., 1966
 Etude quantitative de la croissance d'une culture d'*Acer pseudoplatanus* L.
Physiol. Veg., 4 : 367-378.
- LINNERS F., LETESSON J.J., DIDEMBOURG C. and P. VAN CUTSEM, 1989
 Monoclonal antibodies against pectin-recognition of a conformation induced by
 calcium.
Plant Physiol., 91 (3), sous presse.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L. and R.J. RANDALL, 1951
 Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193 : 265-275.
- MALEY F., TRIMBLE R.B., TARENTINO A.L. and T.H. PLUMMER, 1989
 Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides
 through the use of endoglycosidases.
Anal. Biochem., 180 : 195-204.
- McDOUGALL G.J. and S.C. FRY, 1989
 Structure-activity relationships for xyloglucan oligosaccharides with anti-auxin
 activity.
Plant Physiol., 89 : 883-887.
- McNEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1982
 Structure of plant cell walls. XII - Identification of seven differently linked
 glycosyl residues attached to 0-4 of the 2,4-linked L-rhamnosyl residues of
 rhamnogalacturonan I.
Plant Physiol., 70 : 1586-1591.
- MICHALSKI J.C., HAUEW J.F., WIERUSZESKI J.M., MONTREUIL J. and G.
 STRECKER, 1990
 Catabolism of N-glycosylprotein glycans. Hydrolysis of oligomannosyl
 oligosaccharides by the lysosomal α -D-mannosidases.
Eur. J. Biochem., sous presse.
- MIYATA S. and M.J. CHRISPEELS, 1982
 Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. 12 -
 Biosynthesis of α -amylase in relation to protein glycosylation.
Plant Physiol., 70 : 147-153.
- MONTREUIL J., 1984
 Spatial conformation of glycans and glycoproteins.
Biol. Cell., 51 : 115-132.

MORI M., EDA S. and K. KATO, 1980
Structural investigation of the arabinoxyloglucan from *Nicotiana tabacum*.
Carbohydr. Res., 84 : 125-135.

MORVAN H., 1982
Libération de polymères pectiques acides au cours de la croissance de la suspension cellulaire de Silène.
Physiol. Vég., 20 : 671-678.

MORVAN H., PRIEM B., VERDUS M.C., SOLO-KWAN J. and C. MORVAN, 1987
Relationships between the acidity of the pectic acid polymers from suspension cultured cells of white campion and their promoting effects of the growth.
Food Hydrocol., 1 : 501-503.

MORVAN H., THURETTE J. and M.C. VERDUS, 1989
Involvements of gibberelins in the stimulating effects of extracellular pectic acid polymers on the growth of suspension cultured cells of white campion.
Abst. Fifth Cell Wall Meeting, Edinbourg, p. 201.

NAGEL C.W. and T.M. WILSON, 1969
The isolation of oligogalacturonic acids by column chromatography.
J. Chromat., 41 : 410-416.

NOTHNAGEL E.A., McNEIL M., ALBERSHEIM P. and A. DELL, 1983
Host pathogen interactions. XXII - A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins.
Plant Physiol., 71 : 916-926.

OGATA-ARAKAWA M., MURAMATSU T. and A. KOBATA, 1977
Partial purification and characterization of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from Fig extract.
J. Biochem., 82 : 611-614.

O'NEIL R.A., WHITE A.R., YORK W.S., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1988
A gas chromatographic-mass spectrometric assay for glycosylases.
Phytochemistry, 27 : 329-333.

PAZ PARENTE J., CARDON P., LEROY Y., MONTREUIL J., FOURNET B. and G. RICART, 1985
A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl sulfinyl carbanion.
Carbohydr. Res., 141 : 41-47.

PLUMMER T.H., PHELAN A.W. and A.L. TARENTINO, 1987
Detection and quantification of peptide-N⁴-(N-acetyl- β -glucosaminyloxy) asparagine amidases.
Eur. J. Biochem., 163 : 167-173.

PRESSEY R. and J.K. AVANTS, 1973
Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches.
Plant Physiol., 52 : 252-256.

PRESSEY R. and J.K. AVANTS, 1975
Cucumber polygalacturonase.
J. Food Sci., 40 : 937-939.

PRESSEY R. and J.K. AVANTS, 1977
Polygalacturonase in *Avena*.
Plant Physiol., 60 : 548-553.

RAVANNAT G., 1979
Propriétés en solution des acides pectiques et de quelques oligomères.
Interactions avec le calcium.
Thèse de Doctorat de 3ème Cycle, Université de Grenoble, 82 p.

REBEILLE F., BLIGNY R., MARTIN J.B. and R. DOUCE, 1985
Effect of sucrose starvation on sycamore (*Acer pseudoplatanus*) cell
carbohydrate and Pi status.
Biochem. J., 226 : 679-684.

REES D.A., 1982
Polysaccharide conformation in solutions and gels. Recent results on pectins.
Carbohydr. Polymers, 2 : 253-263.

REISSIG J.L., STROMINGER J.L. and L.F. LEHOIR, 1985
A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars.
J. Biol. Chem., 217 : 959-966.

REYNOLDS E.S., 1963
The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron
microscopy.
J. Cell. Biol., 17 : 208-212.

RICHARD M., TYTGAT F. and P. LOUISOT, 1978
Study of nuclear mannosyl-transferase : lipid intermediates.
Biochimie, 60 : 593-599.

RIMINGTON C., 1931
The carbohydrate complex of serum protein. II - Improved method for
isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose
from proteins of ox blood.
Biochem. J., 25 : 1062-1071.

RINAUDO M. and G. RAVANAT, 1980
NMR investigation on oligo- and poly (galacturonic acid)s : gel formation in
the presence of calcium counterion.
Makromol. Chem., 181 : 1059-1070.

RING S.G. and R.R. SELVENDRAN, 1981
An arabinogalactoxyloglucan from the cell wall of *Solanum tuberosum*.
Phytochem., 20 : 2511-2519.

ROBERTS R.M., CETORELLI J.J., KIRBY E.G. and M. ERICSON, 1972
Location of glycoproteins that contain glucosamine in plant tissues.
Plant Physiol., 50 : 531-535.

ROBERTSEN B., 1986

Do galacturonic acid oligosaccharides have a role in the resistance mechanism of cucumber towards *Cladosporium cucumerinum* ?

Bailey J. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 177-183.

RYAN C.A., 1978

Proteinase inhibitors in plant leaves : a biochemical model for natural plant protection.

Trends Biochem. Sci., 5 : 148-151.

RYAN C.A., BISHOP P.D., PEARCE G., DARVILL A.G., McNEIL M. and P. ALBERSHEIM, 1981

A sycamore cell wall polysaccharide and a chemically related tomato leaf oligosaccharide possess similar proteinase inhibitor-inducing activities.

Plant Physiol., 68 : 616-618.

SELVENDRAN R.R., 1983

The chemistry of plant cell wall.

In : Dietary Fibre. Birch G.G. and K.J. Parker (Eds.), Applied Science Publishers, London, pp. 95-147.

SIMSON B.W. and T.E. TIMMEL, 1978

Polysaccharides in cambial tissues of *Acer pseudoplatanus* L. cells at four stage of growth in suspension cultures.

Physiol. Plant, 23 : 1212-1222.

SLY W.S. and M.D. FISHER, 1982

The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes.

J. Cell Biochem., 18 : 67-85.

SOMOGYI M., 1952

Determination of blood sugar.

J. Biol. Chem., 195 : 19-23.

SPURR A.R., 1969

A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.

J. Ultrastr. Res., 26 : 31-43.

STAB M.R. and J. EBEL, 1987

Effects of calcium on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells.

Arch. Biochem. Biophys., 257 : 416-423.

STEKOLL M. and C.A. WEST, 1978

Purification and properties of an elicitor of castor bean phytoalexin from culture filtrates of the fungus *Rhizopus stolonifer*.

Plant Physiol., 61 : 38-45.

STEVENS B.J.H. and R.R. SELVENDRAN, 1984

Structural features of cell wall polysaccharides of the carrot *Daucus carota*.

Carbohydr. Res., 128 : 321-323.

STEVENSON T.T., McNEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1986
Structure of plant cell walls. XVIII - An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension-cultured sycamore cells.
Plant Physiol., 80 : 1012-1019.

STRECKER G., 1980
Sialosidoses, new types of inborn diseases.
Adv. Exp. Med. Biol., 125 : 371-384.

STRECKER G., MICHALSKI J.C. and J. MONTREUIL, 1988
Lysosomal catabolic pathway of N-glycosylprotein glycans.
Biochimie, 70 : 1505-1510.

STRUICK P., BOON E.J. and D. VREUGDENHIL, 1987
Effects of extracellular extracts from leaves on the tuberization of cutting of Potato (*Solanum tuberosum* L.).
Plant Physiol., 84 : 214-217.

STURM A. and M.J. CHRISPEELS, 1986
The high mannose oligosaccharide of phytohemagglutinin is attached to asparagine 12 and the modified oligosaccharide to asparagine 60.
Plant Physiol., 81 : 320-322.

STURM A., VAN KUIK J.A., VliegENHART J.F.G. and M.J. CHRISPEELS, 1987
Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin.
J. Biol. Chem., 262 : 13392-13403.

SZUMILO T., HORI H. and A.D. ELBEIN, 1986
Purification and properties of a glycoprotein processing α -mannosidase from mung bean seedling.
Plant Physiol., 81 : 383-389.

TAGA E.M., WAHEED A. and R.L. VAN ETTEN, 1984
Structural and chemical characterization of an homogenous peptide N-glycosidase from almond.
Biochemistry, 23 : 815-822.

TAIZ L., 1984
Plant cell expansion : regulation of cell wall mechanical properties.
Ann. Rev. Plant Physiol., 35 : 585-657.

TANABE H., KOBAYASHI Y., MATUO Y., NISHI N. and F. WADA, 1984
Biochemical pulping. Part XI - Isolation and fundamental properties of endo-pectate lyases secreted by *Erwinia carotovora*.
Agric. Biol. Chem., 48 : 2113-2120.

TILLMANS J. and K. PHILIPPI, 1929
The carbohydrate content of the important proteins of foodstuff and a colorimetric procedure on the determination of nitrogen free sugar in protein.
Biochem. Z., 215 : 36-40.

TRAN THANH VAN K., TOUBART P., DARVILL A.G., GOLLIN D.J., CHELF P. and P. ALBERSHEIM, 1985

Manipulation of the morphogenic pathways of tobacco explants by oligosaccharins.

Nature, 314 : 615-617.

VAN KUIK J.A., VAN HALBEEK H., KAMERLING J.P. and J.F.G. Vliegenthart, 1985

Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of **Helix pomatia** α -hemocyanin. Xylose as a constituent of N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein.

J. Biol. Chem., 260 : 13984-13988.

VAN KUIK J.A., SIJBESMA R.P., KAMERLING J.P., Vliegenthart J.F.G. and E.J. WOOD, 1986

Primary structure of a low-molecular-mass N-linked oligosaccharide from hemocyanin of **Lymnaea stagnalis**. 3-O-methyl-D-mannose as a constituent of the xylose-containing core structure in an animal glycoprotein.

Eur. J. Chem., 160 : 621-625.

VERMA D.P.S., MacLACHLAN G.A., BYRNE H. and D. EWINGS, 1975

Regulation and *in vitro* translation of messenger ribonucleic acid for cellulase

from auxin-treated pea epicotyls.

J. Biol. Chem., 250 : 1019-1026.

YAMAOKA T. and S. SATO, 1977

Analysis of extracellular macromolecules of cultured tobacco cells in comparison with cell-wall macromolecules.

Bot. Mag., 90 : 153-163.

YET M.G. and F. WOLD, 1988

Purification and characterization of two glycopeptide hydrolases from Jack Beans.

J. Biol. Chem., 263 : 118-122.

YORK W.S., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1984

Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide.

Plant Physiol., 75 : 295-297.

YOSHIKAWA M., KEEN N.T. and M.C. WANG, 1983

A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation.

Plant Physiol., 73 : 497-506.

WITTENBACH V., 1983

Purification and characterization of a leaf storage glycoprotein.

Plant Physiol., 73 : 125-129.

ZANETTA J.P., BRECKEN-BRIDGE W.C. and G. VINCENDON, 1972

Analysis of monosaccharides by gas liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoprotein and glycolipids.

J. Chromato., 69 : 291-304.

A N N E X E S

FICHES TECHNIQUES N°1 A N°14

FICHE TECHNIQUE N° 1

PURIFICATION D'UNE ENDOPOLYGALACTURONASE

Référence : Protocole de ENGLISH et al. (1972), modifié par LAFITTE (1983).

1. - Culture du champignon : Colletotrichum lindemuthianum

- Milieu de culture : acide pectique, 10 g ; NH_4NO_3 , 1,2 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g ; KH_2PO_4 , 1 g ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,9 mg ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg ; thiamine, 0,1 mg ; biotine, 0,05 mg. Ajuster à pH 6 et compléter par de l'eau distillée q.s.p. 1 litre.
- Culture en fioles de Roux (100 ml de milieu), à l'obscurité et à 25°C, pendant 7 jours.
- Récupérer le milieu par centrifugation.

2. - Carboxyméthyl Sépharose (Cm-Seph)

Toutes les étapes de purification s'effectuent à 4°C.

- Colonne (2,6 x 18 cm) remplie d'un gel CM-Seph 50 (LKB - Pharmacia).
- Tampon d'équilibration (Tp1) : $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM, pH 5,2.
- Débit : 20 à 30 $\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$.
- Détection UV 280 nm.
- Déposer le milieu de culture (1 litre) sur le gel.
- Rincer avec Tp1 jusqu'à stabilisation de l'absorbance UV.
- Eluer par le Tp1, additionné de NaCl 0,5 M.

Alors que la majorité des protéines présentes dans le milieu de culture brut, y compris une exoPGase, ne sont pas retenues sur le gel CM-Sépharose, l'EPGase est éluée avec le Tp1 + NaCl.

Les protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY (1951). L'activité pectinasiq ue est mesurée par hydrolyse de l'acide pectique 0,1 % dans le Tp1 en suivant la libération des sucres réducteurs (SOMOGYI 1952). 1 U = 1 μM eq. GalAU.min⁻¹ à 30°C.

3. - Gel d'hydroxyapatite (HPA)

- Colonne (2,6 x 18 cm) remplie d'un gel d'HPA (Ultrogel, LKB-Pharmacia).
- Tampon d'équilibration (Tp2), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 5 mM, pH 6,8.
- Dépôt de la fraction (CM-Seph, NaCl), après dialyse dans le Tp2.
- Rincer avec le Tp2 jusqu'à stabilisation de l'absorbance UV.
- Eluer par un gradient continu de 5 à 500 mM du tampon phosphate mono-/dipotassique (500 ml).

L'EPGase est éluée approximativement en milieu de gradient. L'absence de contamination par l'exoPGase est vérifiée par chromatographie sur couche mince des produits d'hydrolyse pectique.

Conservation : congélation dans le Tp1 + sérumalbumine bovine 1 mg.ml^{-1} .

FICHE TECHNIQUE N° 2

PURIFICATION D'ACIDES OLIGOGALACTURONIQUES

Référence : NAGEL et WILSON (1969), modifié au laboratoire.

1. - Préparation de l'hydrolysat

- Dissoudre 10 g d'acide pectique (Serva) dans un litre de tampon $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 50 mM, pH 5,2.
- Introduire progressivement l'acide pectique dans 300 ml d'eau distillée, ajouter simultanément quelques ml de NaOH (0,5 M) pour faciliter sa dissolution.
- Ajouter 50 millimoles d'acide acétique puis NaOH q.s.p. pH 5,2.
- Ajouter 6,2 unités EPGase.
- Incuber à 30°C pendant 10 h, sous agitation.
- Inactiver l'enzyme par chauffage à 100°C.

Remarque : au préalable, réaliser une cinétique d'hydrolyse sur une faible quantité d'acide pectique et sélectionner la durée d'hydrolyse selon la taille des fragments souhaités. Les produits d'hydrolyse sont analysés par HPLC (HW40, CH_3COOH 0,5 %) ou par CCM ($\text{ButOH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ 2:1:1 pour les petits DP ; $\text{EtOH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 25 mM 27:29 jusqu'à DP 8).

2. - Séparation des acides oligogalacturoniques

- Colonne (2 x 30 cm) remplie de Dowex 1 x 2, 200-400 mesh.
- Tampon d'équilibration $\text{HCOOH}/\text{NH}_4^+$ 0,05 M.
- Débit : 30 $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$.
- Déposer l'hydrolysat pectique puis rincer par 500 ml de tampon formiate.
- Eluer les oligoGalAU par 4 litres d'un gradient continu de tampon $\text{HCOOH}/\text{NH}_4^+$, 0,05 M à 1 M.
- Vérifier l'état de pureté des oligoGalAU par CCM.
- Congeler les fractions pures.
- Lyophiliser plusieurs fois jusqu'à élimination complète du tampon.
- Mettre les oligoGalAU sous forme H^+ par passage sur Dowex 50 x 4/ H^+ .
- Lyophiliser.

FICHE TECHNIQUE N° 3

UTILISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-PECTIQUES

1. - Test ELISA de fixation de l'antigène (Ag)

Le principe de cette méthode consiste à fixer l'Ag pectique après activation des puits par la polylysine. L'anticorps (Ac) est ensuite introduit à la concentration adéquate et révélé par la technique d'immunoenzymologie (horse radish peroxidase), à l'aide d'un Ac secondaire.

Les différentes étapes peuvent se résumer comme suit :

- remplir les puits par 100 μl de polylysine à 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et laisser reposer 1 h à température ambiante ;
- vidanger ;
- introduire l'Ag : 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pH 7,4 ajusté par NaOH ;
- ajouter 50 μl d'une solution de CaCl_2 0,5 mM/NaCl 150 mM ; laisser 1 nuit à 4°C ;
- saturer les sites d'absorption non spécifiques des protéines par 250 μl de gélatine 20 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans le tampon tris/NaOH 20 mM, CaCl_2 0,5 mM, NaCl 130 mM ; laisser 2 h à 37°C ;
- ajouter le premier Ac (dilué dans le tampon tris précédent), 50 μl par puit et laisser 1 h à 37°C ;
- laver les puits 30 fois par le tampon tris déjà cité, contenant en plus du Tween à 0,1 %. On utilise un "autolaveur" pour éviter les contaminations de puit à puit ;
- ajouter l'Ac secondaire (anti-souris) couplé à la peroxydase, 50 μl par puit (l'Ac est dilué 500 fois dans le tampon Tris) et laisser 1 h à 37°C ;
- laver à nouveau 30 fois avec le tampon de lavage déjà utilisé ;
- vidanger la plaque ;
- ajouter l'ABTS ainsi que H_2O_2 pour le développement d'une coloration caractéristique de l'activité peroxydasique : 100 μl d'une solution contenant 4 mg d'ABTS dans 6 ml de tampon citrate (Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, 20,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$;

- ac. citrique $8,8 \text{ g.l}^{-1}$; pH 5,6 avec HCl) et 5 μl d'eau oxygénée, ajoutée au dernier moment. Laisser 10 min à 37°C ;
- lecture de la plaque.

2. - Test d'inhibition

Les étapes sont les mêmes que celles du test précédemment décrit, à l'exception des points suivants :

- au départ, tous les puits sont activés par de l'acide polygalacturonique ;
- ensuite, l'Ac est introduit en mélange avec l'Ag à étudier.

FICHE TECHNIQUE N°4**CULTURE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE
EVALUATION DE LA CROISSANCE****1. - Conditions de culture**

- Matériel biologique : suspension cellulaire de **Silene alba** (Miller E.H.L. Krause) établie par DUBOIS et BOURIQUET (1973).
- Milieu de culture : solution minérale de LAMPORT modifiée (LESCURE 1966) comprenant comme source carbonée du saccharose (20 g.l⁻¹) et comme facteurs de croissance l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et le chlorhydrate de thiamine (10⁻⁶ g.l⁻¹).
- Durée du cycle de culture : 14 jours.
- Température : 25°C.
- Lumière : 5 à 7 W.m⁻² en continu.
- Inoculum : 2 g de cellules dans 100 ml de milieu.

2. - Mesure de la masse fraîche (MF)

- Verser le contenu de chaque flacon de culture dans un entonnoir de Büchner garni d'un papier filtre et laisser la filtration se dérouler sous vide, jusqu'à écoulement total du milieu.
- Recueillir les cellules à la spatule et les peser immédiatement (précision 10⁻³ g).

3. - Mesure de la masse sèche (MS)

- Peser environ 5 g de MF.
- Sécher sous vide à 40°C, en présence de silicagel.
- Peser.

FICHE TECHNIQUE N° 5

PAROIS ET EXTRAITS CELLULAIRES

1. - Eclatement des cellules

- Mettre les cellules dans un tampon de broyage. Le choix du tampon dépend de l'expérience envisagée. Par exemple, pour le repérage des activités endoglucosaminidasiques, on utilise 2 tampons différents : un tampon acétate $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, 100 mM pH 4 ou un tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM pH 7. Un inhibiteur de protéases est systématiquement ajouté (phénolméthylsulfonylfluoride) à la concentration de 1 %.
- Homogénéiser (homogénéiseur type "Ultraturax"), pour dissocier les amats cellulaires.
- Eclater les cellules à la presse de French (1000 psis).

2. - Parois et extraits cellulaires

- Centrifuger (10 min, 1700 g).
- Le culot et le surnageant constituent respectivement la préparation de parois et l'extrait cellulaire.

FICHE TECHNIQUE N°6

ISOLEMENT ET FRACTIONNEMENT DES EXOPOLYSACCHARIDES

1. - Isolement des exopolysaccharides

- Séparer le milieu de culture des cellules par filtration sur papier.
- Concentrer sous vide (environ 10 fois).
- Dialyser contre une solution d'ac. acétique à 5 %, pH 2, 1 nuit à 4°C (élimination des acides oligogalacturoniques).
- Dialyser contre de l'eau distillée.

2. - Séparation EPS neutres/EPS acides

- Colonne DEAE A50/Cl⁻ (LKB - Pharmacia) équilibrée dans H₂O.
- Déposer la fraction exopolysaccharidique (1/5ème de la capacité du gel).
- Rincer avec H₂O jusqu'à disparition totale des sucres dans l'éluat = **EPS neutres.**
- Poursuivre l'élution avec une solution de NaCl 0,5 M = **EPS acides.**

FICHE TECHNIQUE N°7

DOSAGE DES RESERVES GLUCIDIQUES CELLULAIRES

1. - Amidon

Celui-ci est estimé par hydrolyse enzymatique et dosage du glucose libéré par HPLC.

- Broyer les cellules préalablement séchées.
- Dans un tube à hydrolyse, peser 20 à 30 mg de poudre.
- Laver 2 fois avec de l'éthanol à 80 %.
- Ajouter 5 ml d'eau distillée.
- Autoclaver à 120°C, 30 min.
- Ajouter 5 ml d'amyloglucosidase (Serva), à la concentration de 0,5 mg.ml⁻¹, dans du tampon CH₃COOH/CH₃COONa, 100 mM, pH 4.
- Incuber 1 nuit à 60°C.
- Filtrer sur 0,22 µM.
- Doser le glucose libéré par HPLC (colonne PA-O3 (YMC), 80°C, 0,5 ml.min⁻¹).
- Prévoir un témoin "enzyme".

2. - Dosage des sucres solubles intracellulaires

Après éclatement des cellules (voir Fiche technique n°5), le surnageant est filtré sur 0,22 µM puis les sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) sont estimés par HPLC, comme ci-dessus.

FICHE TECHNIQUE N° 8

CYTOCHIMIE

1. - Fixation des échantillons

- Placer environ 100 mg de cellules dans un mélange (1/1) de glutaraldéhyde 3 % et de tampon cacodylate 0,2 M, pH 7,2 pendant 2 h à 20°C.
- Rincer 2 fois 15 min, laisser séjourner pendant 1 nuit puis rincer 3 fois 5 min dans le tampon cacodylate.
- Post-fixer les échantillons dans OsO₄ 1 % pendant 1 h à 0°C.
- Rincer 2 fois 10 min dans le tampon cacodylate puis 3 fois 10 min dans l'eau bidistillée.

2. - Déshydratation des échantillons

Toutes les opérations sont effectuées sur un lit de glace.

- Transférer les échantillons dans des solutions d'acétone à 10, 30, 50, 70 et 90 % en les laissant séjourner 10 min dans chacun des bains.
- Traiter les échantillons 3 fois par de l'acétone pure.

3. - Inclusion et polymérisation

La résine de SPURR (1969) est composée du mélange suivant : ERL (10 g) + DER (6 g) + NSA (26 g) + S₁ (0,8 g).

- Placer les échantillons dans le premier bain composé de 50 % de résine et 50 % d'acétone, pendant 4 h à 0°C, dans un deuxième bain de résine pure pendant 4 h à 0°C puis dans un troisième bain de résine pure pendant 1 nuit à 0°C.
- Inclure les échantillons en gélules et laisser polymériser pendant 24 h à 60°C.

4. - Coloration des coupes sur grilles

(Acétate d'uranyle et citrate de plomb, REYNOLDS 1963)

- Préparer la solution d'acétate d'uranyle à saturation dans l'éthanol à 50°. Agiter vigoureusement, laisser reposer puis centrifuger.
- Faire flotter les grilles sur la solution d'acétate d'uranyle, à l'obscurité pendant 15 min.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée et recueillir les grilles sur un papier filtre.
- La solution de citrate de plomb se conservant mal, il convient de la préparer immédiatement avant l'emploi. Mélanger 15 ml de solution de citrate de Na 0,4 M et 15 ml d'une solution de nitrate de plomb 0,25 M, agiter vivement, laisser reposer 30 min puis ajouter 8 ml de NaOH 1 N et compléter à 50 ml avec de l'eau distillée.
- Diluer la solution au 1/5 avec NaOH 0,01 N puis centrifuger.
- Faire flotter les grilles sur quelques gouttes de la solution de citrate de plomb, pendant 5 min.
- Rincer les grilles avec NaOH 0,02 M puis à l'eau distillée.

5. - Mise en évidence de la phosphatase acide

- Fixer les cellules par le glutaraldéhyde à 3 % dans le tampon cacodylate 0,2 M pH 7,2 pendant 30 min à 0°C.
- Laver les cellules 18 h dans le tampon cacodylate à 0°C.
- Laver dans une solution de saccharose à 5 %, 15 min.
- Laver dans du tampon citrate de sodium 0,2 M pH 4,8, 50 min.
- Laver dans la solution de saccharose à 5 %, 15 min.
- Incuber les cellules dans le milieu de GOMORI (1952) 1 h à froid puis 30 min à 37°C.

Milieu de GOMORI : tampon acétate de Na 0,05 M pH 5 100 ml
 β -glycérophosphate à 3 % 10 ml
 Pb (NO₃)₂ 0,10 mg

- Préparation des témoins : incuber les cellules dans le milieu sans glycérophosphate, incuber un 2ème lot dans le milieu de GOMORI additionné de fluorure de Na 0,01 M.
- Laver 6 fois 5 min dans la solution de saccharose à 6 %.
- Postfixer les échantillons dans OsO₄ 1 % pendant 1 h.
- Déshydrater, inclure dans la résine et polymériser comme précédemment (paraphes 2 et 3).
- Observer les coupes sans autre coloration.

FICHE TECHNIQUE N°9

DETERMINATION DES RAPPORTS MOLAIRES EN MONOSACCHARIDES

1. - Acétates d'alditols (JONES et ALBERSHEIM 1972)*** Hydrolyse**

- Hydrolyse acide en présence de mésoinositol (étalon interne) : ATFA, 2N, 2 h à 100°C pour l'analyse des polysaccharides ; ou 4N, 4 h à 100°C pour l'analyse des oligosaccharides.
- Elimination de l'ATFA par évaporation en présence d'éthanol (3 fois).
- Réduction : NaBH₄ (env. 10 mg/2 ml eau dist.) + 10 µl de NH₄OH, 1 nuit, température ambiante.
- Arrêt de la réduction : polysaccharides, Dowex 50 x 8/H⁺ ; oligosaccharides, 10 µl CH₃COOH glacial.
- Elimination des borates par plusieurs coévaporations, en présence de méthanol.
- Lyophilisation.

*** Acétylation**

- Acétylation : pyridine/anhydride acétique (v/v), 1 nuit à température ambiante.
- Evaporation sous courant d'air comprimé.
- Dichlorométhane, 1 ml/10 µg de mésoinositol.
- CPG sur colonne CP Sil 5 CB (CHROMPACK ; 0,32 mm x 50 m) ; gaz vecteur, azote ; programmation du four, 15 min à 130°C, puis 2°C.min⁻¹ jusqu'à 230°C, 15 min.

2. - Préparation des dérivés méthyl-glycosides trifluoroacétylés (TFA) et triméthylsilylés (TMS)

* Méthanolyse

- Lyophiliser l'échantillon (env. 100 µg) après avoir ajouté l'étalon interne (érytritol pour les TFA ; mésoinositol pour les TMS).
- Ajouter 200 à 300 µl de MeOH/HCl anhydre 1 M (kit de préparation Altech).
- Laisser 24 h à 80°C.
- Evaporer sous azote.

* Trifluoroacétylation (ZANETTA et al. 1972)

- Ajouter 100 µl du mélange (v/v) d'anhydride trifluoroacétique et de pyridine.
- Laisser 1 nuit à température ambiante.
- Injecter en CPG sur colonne capillaire DB 210 (JW). L'emploi d'un injecteur Shimadzu avec précolonne série SPL7 permet l'élimination des solvants avant l'injection. La programmation est de 120°C à 160°C ; 1,5°C.min⁻¹ puis 160°C à 220°C ; 2°C.min⁻¹.

* Triméthylsilylation

- Ajouter 200 à 300 de MeOH + 1 pincée de Ag₂CO₃ + 2 à 3 gouttes d'anhydride acétique (N-réacétylation). La coloration doit rester verte.
- Laisser 1 nuit, obscurité, température ambiante.
- Centrifuger.
- Récupérer la phase supérieure.
- Délipider par l'hexane (phase supérieure).
- Evaporer à sec sous azote.
- Ajouter 100 µl de réactif de silylation (BSTFA, Pierce) et 100 µl de pyridine. Laisser 1 nuit à l'obscurité et à température ambiante.
- Analyser les TMS par CPG, sur colonne CP Sil 5 CB (CHROMPACK ; 0,32 mm x 50 m) ; gaz vecteur, azote ; programmation du four, 130°C à 230°C, 2°C.min⁻¹.

FICHE TECHNIQUE N° 10

METHYLATION DES OLIGOSACCHARIDES

Référence : PAZ PARENTE **et al.** (1985)

*** Réduction**

- Réduire 100 à 500 µg d'échantillon (NaBD_4).
- Arrêter la réduction par ajout de Dowex 50 x 8/ H^+ .
- Eliminer les borates par coévaporation en présence de méthanol.
- Compléter le dessalage par passage sur HW40 (HPLC).
- Lyophiliser.
- Maintenir les échantillons dans un dessiccateur + silicagel.

*** Méthylation**

- Pour les oligosaccharides neutres : dissoudre l'échantillon sec et réduit dans 100 µl de DMSO, soumettre aux ultrasons jusqu'à dissolution complète.
- Ajouter 100 µl de lithium méthylsulfinyl carbanion (base de méthylation) et soumettre aux ultrasons, pendant 1 h.
- Ajouter 200-300 µl de CH_3I et soumettre aux ultrasons pendant 1 h, en évitant toute élévation de température (4°C dans l'éthanol).
- Pour les oligosaccharides acides : la base de méthylation utilisée est NaOH (100 mg). Toutes les opérations sont effectuées en une seule étape, les réactifs étant introduits successivement et le mélange étant soumis aux ultrasons pendant une heure, sans augmentation de température.

*** Extraction des produits méthylés**

- Verser le produit méthylé dans un tube à essai, ajouter 2,5 ml d' H_2O .
- Ajouter quelques grains de thiosulfate de Na (neutralisation de KI formé).

- Extraire le produit méthylé par 3 fois 1 ml de CHCl_3 .
- Laver la phase chloroformique par H_2O .
- Sécher la phase chloroformique par Na_2SO_4 .
- Filtrer sur laine de verre.
- Enlever le DMSO par tamisage moléculaire (HPLC) sur colonne (0,5 x 30 cm) remplie de LH 20 (phase inverse), éluée par $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (v/v).
- Sécher sous azote.
- Lyophiliser.

FICHE TECHNIQUE N° 11

SPECTROMETRIE DE MASSE

1. - Acétates d'alditols partiellement méthylés

- 50 à 100 µg d'échantillon perméthylé sont hydrolysés (ATFA 4 N, 4 h).
- Réduction par NaBD₄ et acétylation (voir acétates d'alditols).
- Injection en CPG sur colonne DB1 (JW) (0,32 mm x 30 m).
- Programmation thermique 2°C.min⁻¹, de 130 à 230°C.
- Couplage avec un spectromètre RIBBER 10-10, énergie électronique de 70 eV, courant d'ionisation de 0,2 mA.

2. - FAB-MS, mode négatif*** Acides oligogalacturoniques**

- Dissoudre environ 1 mg d'échantillon dans une matrice de polyéthylène glycol/eau.
- Analyse à l'aide d'un spectrophotomètre KRATOS modèle MS 50.

3. - FAB-MS, mode positif

- Dissoudre l'échantillon (100-200 µg) dans 10 µl de méthanol, 2 µl d'acétate de Na (dans 1 % de méthanol) et 2 µl de matrice (trioglycérol).
- Déposer 1 µl.
- Bombardement par un faisceau de Xenon (1 mA, 8 kV), spectromètre KRATOS Concept II HH.

Les spectres sont enregistrés avec un pouvoir de résolution allant jusqu'à 2500.

Les conditions sont les mêmes pour l'analyse MS-MS.

FICHE TECHNIQUE N°12

RMN 400 MHz DU PROTON

Les solutions d'oligosaccharides (400-500 μg) sont échangées plusieurs fois dans l'eau lourde (D_2O , 99,95 %, CEA). Les spectres RMN sont réalisés à l'aide d'un spectromètre BRUKER AM-400 WB à transformateur de Fourier. Les déplacements chimiques sont calculés par rapport au 2,2-diméthyl-2-silapentane 5-sulphonate (indirectement par l'acétone dans D_2O : $\delta = 2,225$ ppm). La résolution est améliorée par l'équation de LORENTZ et GAUSS (ERNST 1966).

FICHE TECHNIQUE N°13

CHROMATOGRAPHIES SUR COUCHE MINCE

*** Préparation des chromatogrammes**

Les supports de chromatographie sur couche mince (CCM) sont des plaques de silicagel sur aluminium 20 x 20 cm (Merck).

- Déposer 1 à 10 µg d'échantillon en solution aqueuse.

*** Solvants**

- Solvant 1 : éthanol/acide acétique 25 mM (27/29).
- Solvant 2 : butanol/acide acétique/eau (2/1/1).
- Solvant 3 : butanol/éthanol/acide acétique/pyridine/eau (10/100/1/10/30).

- Acides oligogalacturoniques : 1 (rapide) et 2 (lent)
- Oligosaccharides neutres : 2 (lent) et 3 (rapide)

Remarque : le solvant 1 est à utiliser à 40°C.

*** Révélation**

- Pulvériser une solution à 0,1 % d'orcinol dans H₂SO₄ 20 %.
- Placer 5 à 10 min dans une étuve à 100°C. Dans ces conditions, les oses neutres et acides prennent des colorations bleues à indigo.

FICHE TECHNIQUE N° 14

CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROPHORESE SUR PAPIER

1. - Chromatographie sur papier

- Déposer le mélange d'oligosaccharides (50 mg.ml^{-1}) sur papier Whatman n°3, à une distance d'environ 10 cm du haut de la feuille.
- Faire migrer dans le solvant acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (5:5:1:3), pendant 24 h.

2. - Electrophorèse sur papier

- Déposer le mélange d'oligosaccharides (50 mg.ml^{-1}) sur papier Whatman n°3, au milieu de la feuille.
- Faire migrer 4 h sous une tension de 300 volts dans un solvant pyridine (20 ml)/acide acétique (9 ml)/eau (q.s.p. 2 litres), pH 4,5, 25°C.

3. - Révélation

- Pulvériser abondamment par une solution d'oxalate d'aniline.
- Placer pendant 5 à 10 min dans une étuve à 100°C.

Dans le cas d'une chromatographie préparative, seuls les bords extrêmes du dépôt sont révélés pour le repérage des distances de migration.



RESUME

Les acides oligogalacturoniques, issus de la dégradation des parois végétales, présentent des propriétés biologiques qui les apparentent à la famille des oligosaccharines. Après les avoir séparés selon leur taille, nous avons étudié quelques unes de leurs propriétés.

Ils provoquent une destabilisation de la matrice pectique des cellules de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause) cultivées en suspension. Il en résulte une augmentation des polymères pectiques extracellulaires dans les premières heures de culture. Cet effet est proportionnel à la taille des fragments, son instantanéité plaide pour un mécanisme de nature physico-chimique, avec pour origine la compétition s'exerçant vis-à-vis du calcium intrapariétal. Une approche immunochimique a permis d'apporter de nouvelles informations sur la conformation des oligogalacturonates de calcium. Ces résultats constituent de nouveaux éléments concernant la spécificité et le mode d'action des acides oligogalacturoniques dans l'induction de réponses biologiques.

Nous avons montré l'existence d'oligosaccharides excrétés dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène. Ceux-ci ont été purifiés et caractérisés chimiquement. Leur structure a été déterminée par spectrométrie FAB-MS et spectroscopie RMN. Certains sont d'origine pectique et xyloglucanique, ils résultent d'une dégradation de la matrice pariétale. D'autres ont une structure qui les apparentent aux glycanes N-liés. Il s'agit d'un oligomannoside, de structure $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$, et d'un xylomannoside, de structure $\text{Man}_3\text{XylGlcNAcFucGlcNAc}$, dont l'excrétion est liée à l'autophagie cellulaire qui survient en fin de culture. Une activité endoglucosaminidase a été caractérisée dans un extrait cellulaire, elle est plus élevée en fin de culture. Celle-ci pourrait être à l'origine de la libération de l'oligomannoside $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$. Outre l'intérêt que représente ce résultat pour une meilleure compréhension du métabolisme des glycoprotéines végétales, ces oligosaccharides, distribués dans différents tissus ou organes, pourraient constituer des signaux de régulation ou des vecteurs d'information liés à la sénescence ; il pourrait donc s'agir d'une nouvelle catégorie d'oligosaccharines.