

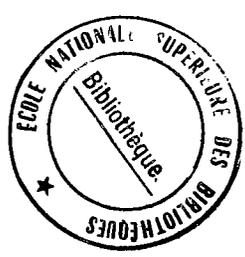
DESS
1984
10
A

DESS

Informatique Documentaire

NOTE DE SYNTHESE

ANTIGENES DE SURFACE : CARACTERISATION,
LOCALISATION ET ROLE CHEZ LES VEGETAUX.



Francoise MONOT

1984



PRESENTATION DU SUJET -

Ce travail m'a été proposé par Monsieur C. DUMAS, chercheur du Laboratoire d'Histophysiologie de la Sécrétion végétale, de l'Université LYON - I .

Ce laboratoire travaille à mieux connaître :

- d'une part les mécanismes qui régissent les symbioses micro-organismes-racines permettant à certains végétaux d'utiliser l'azote atmosphérique,
- d'autre part les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'incompatibilité entre pollens et stigmates observés chez les plantes à fleurs.

L'objectif commun étant l'amélioration des espèces végétales.

Dans les deux cas, des mécanismes de reconnaissance cellulaire sont mis en jeu, qui font intervenir des échanges d'informations entre cellules, informations portées par des molécules de surfaces cellulaires.

La compréhension des mécanismes de la reconnaissance cellulaire suppose la détermination du mode d'action de ces molécules, et pour cela une bonne connaissance de leur nature et de leur localisation est nécessaire.

On s'intéresse ici aux antigènes de surface en ce sens que beaucoup de molécules de surface sont des antigènes chez les animaux, et que les techniques immunologiques vont fournir des méthodes d'investigation performantes.

Il s'est agi de faire le point sur la manière dont l'étude des molécules antigéniques végétales intervenant dans les processus de reconnaissance cellulaire a été abordée par les chercheurs ces dernières années. (Il a été décidé de se limiter aux travaux postérieurs à 1978).

Les références ont été obtenues :

- par interrogation des bases de données automatisées PASCAL et BIOSIS,
- par recherche manuelle.

- RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE -

1 - Interrogation des bases de données automatisées -

Une recherche manuelle préalable dans les Biologicals Abstracts s'est vite révélée peu performante, les "entrées" proposées n'étant pas du tout adaptées au sujet.

La première étape de la recherche a donc consisté en une interrogation en ligne des bases de données dans le cadre d'une initiation à la recherche documentaire automatisée.

A - Interrogation de la B.D. PASCAL

Produite par le C.N.R.S., PASCAL est une banque de données pluridisciplinaire.

Nous avons interrogé cette base en passant par le serveur français QUESTEL de TELESYSTEME et en utilisant le réseau TRANSPAC.

PASCAL possédait deux sous-fichiers :

- PASCA73 qui répertorie les documents de 1973 à 1976
- PASCAL qui contient les documents à partir de 1977

Comme nous cherchons des travaux postérieurs à 1978, seul le sous-fichier PASCAL a été interrogé.

Le choix des termes de l'interrogation a été guidé par les deux outils mis à notre disposition : le lexique et le plan de classement des Sciences de la Vie.

La stratégie de recherche a été la suivante :

ETAPE DE RECHERCHE : 1
VÉGÉTA?? OU PLANTE?

ETAPE DE RECHERCHE : 2
1 ET RECONNAISSANCE +

ETAPE DE RECHERCHE : 3
1 ET ANTIGEN??

ETAPE DE RECHERCHE : 4
POLLEN OU INCOMPATIBILITE OU RELATION MICROORGANISME VEGETAL OU GREFFE

ETAPE DE RECHERCHE : 5
PHYTOPATHOGENE OU METHODE IMMUNOLOGIQUE OU IMMUNOCHEMIE OU IMMUNOCYTOCHEMIE.

ETAPE DE RECHERCHE : 6
3 ET (4 OU 5)

ETAPE DE RECHERCHE : 7
6 SAUF ALLERGIE?

RESULTATS : 20 60
 ↓ ↓
 étape 2 étape 7

Cette stratégie a été établie après un "essai" réalisé dans le cadre d'un stage à l'URFIST, qui avait permis de constater que :

- ° plusieurs termes étaient utilisables pour exprimer la notion de reconnaissance cellulaire, le lexique proposant : reconnaissance cellulaire, mais aussi reconnaissance inter-cellulaire, reconnaissance-soi, reconnaissance hôte. C'est pourquoi la troncature "reconnaissance +" a été retenue.
- ° un seul document présentait simultanément les deux termes reconnaissance et antigène, c'est pourquoi on a procédé à la sélection de deux groupes de documents : l'intersection entre ces deux groupes sélectionnés respectivement par les étapes 2 et 7 ne comprend qu'un seul document.
- ° la combinaison des notions antigènes et végétal apportait 213 documents. Il était nécessaire d'introduire des concepts plus précis permettant de réduire ce nombre, d'où les termes proposés aux étapes 4 et 5 essayant de couvrir les notions impliquées dans le sujet.

On a constaté d'autre part que de nombreux documents concernaient en fait les problèmes d'allergies provoquées chez l'homme par les antigènes polliniques. Une étape "sauf allergie" a pu être introduite, dans la mesure où nous avons constaté que ce terme était utilisé essentiellement pour des articles traitant des maladies allergiques en elles-mêmes, avec l'homme comme objet, alors que les articles traitant des allergènes végétaux étaient plutôt indexés par le terme allergène.

B - Interrogation de la B.D. BIOSIS

Cette base de données bibliographiques produite par Bioscience Information Service aux U.S.A., qui publie aussi les Biologicals Abstracts, couvre le domaine biologique et médical.

L'accès à cette B.D. s'est fait par le serveur européen ASE (Agence Spaciale Européenne) situé à Frascati en Italie, grâce au langage QUEST, par l'intermédiaire du réseau TRANSPAC.

La stratégie de recherche a été élaborée à l'aide du "Biosis search guide". BIOSIS permet d'utiliser des descripteurs, des "concepts codes" (CC) et des "biosystematic codes" (BC)

En pratique, la stratégie de recherche élaborée pour l'interrogation de BIOSIS ne s'est pas révélée satisfaisante, puisque sur les 44 références obtenues, 4 seulement répondaient au sujet. Les références obtenues ont montré que nous n'avons pas "visé" juste

les références concernant essentiellement des antigènes animaux, bien que la notion de végétal ait été introduite par les "biosystématics codes".

A notre décharge, il faut souligner les conditions de l'interrogation de la base BIOSIS, qui s'est déroulée dans le cadre d'une journée de présentation de cette base au cours de laquelle il a été procédé à un grand nombre d'interrogations, donc avec une certaine précipitation. La personne "spécialiste" de BIOSIS a eu quelques difficultés à cerner le sujet.

Cette expérience m'a permis de vérifier combien est nécessaire une bonne connaissance des caractéristiques de la base interrogée, associée à une bonne connaissance du domaine considéré.

2 - Recherche manuelle -

La recherche automatisée s'est révélée insuffisante.

A été consulté le fichier manuel du laboratoire mandataire de la question.

La consultation des bibliographies des articles a permis aussi de détecter quelques références.

3 - Accès aux documents primaires -

Les documents sélectionnés ont été localisés grâce au Catalogue des Périodiques du Rhône, qui se révèle être un outil très pratique mis à notre disposition dans les Bibliothèques. Cependant certains articles n'ont pu être localisés.

Un certain nombre de documents étaient possédés par la bibliothèque du Laboratoire d'Histophysiologie des sécrétions végétales. Les autres ont été récupérés à la B.U. de La Doua ou à la B.U. de Rockefeller. Quelques articles demandés par l'intermédiaire du prêt universitaire n'ont pu être obtenus.

NOTE DE SYNTHESE

ANTIGENES DE SURFACE : CARACTERISATION,
LOCALISATION ET ROLE CHEZ LES VEGETAUX.

INTRODUCTION -

I - CARACTERISATION DES ANTIGENES VEGETAUX -

1 - Isolation de l'antigène -

- 1°) Extraction de l'antigène
- 2°) Purification des antigènes

2 - Caractérisation de l'antigène

- 1°) Techniques physico-chimiques
- 2°) Techniques immunologiques :
 - Précipitation sur gel
 - A. Immunodiffusion radiale simple
 - B. Double diffusion d'Ouchterlony
 - C. Immunoélectrophorèse
 - ° Immunoélectrophorèse de GRABAR & WILLIAMS
 - ° Immunoélectrophorèse de LAURELL
 - ° Immunoélectrophorèse bidimensionnelle
 - Radio-immuno-essai
 - Problèmes de la spécificité

II - LOCALISATION DES ANTIGENES VEGETAUX

Introduction -

- 1 - Principe de l'immunocytochimie
- 2 - Problèmes particuliers
 - 1°) Spécificité des anticorps
 - 2°) Préparation des tissus

III - ROLE DES ANTIGENES DE SURFACE DANS LA RECONNAISSANCE

CELLULAIRE

- Corrélation antigène - allèle S.
- Action biologique des antigènes S spécifiques.

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

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

Les végétaux sont capables de discriminer le "soi" du "non-soi", comme le montrent les phénomènes de rejet ou d'acceptation qu'ils présentent dans différentes situations de la vie végétale (greffe, reproduction sexuée, défense contre les pathogènes, ...).

Si la reconnaissance cellulaire a été intensivement explorée chez les animaux, les végétaux ont été très négligés, et les processus qui interviennent sont encore peu connus.

Ils mettent en jeu des molécules extracellulaires qui incluent des déterminants antigéniques, des lectines, des arabino-galactane-protéines, des arabinoxylases et des allergènes.

La compréhension des mécanismes de la reconnaissance cellulaire passe donc par une meilleure connaissance des molécules impliquées. Il s'agit de répondre aux questions suivantes :

- Que sont ces molécules? = CARACTERISATION
- Où se trouvent-elles ? = LOCALISATION
- Comment agissent-elles ? = ROLE

De nombreux travaux ont été développés pour tenter de répondre à ces questions. Un grand pas a été franchi quand l'idée est apparue que beaucoup de protéines, glycoprotéines et polysaccharides végétaux étaient des antigènes chez les animaux, et que l'on pouvait donc utiliser leurs propriétés antigéniques. L'apport des méthodes immunologiques jusqu'alors développées en biologie animale a été considérable.

On se propose ici de montrer comment les auteurs ont essayé de répondre aux questions posées ci-dessus, en présentant les méthodes d'étude utilisées et les problèmes rencontrés.

I - CARACTERISATION DES ANTIGENES VEGETAUX -

1 - Isolation de l'antigène -

Dans toute étude visant à une meilleure compréhension de la nature des macromolécules antigéniques, le premier problème posé est celui de l'isolation de l'antigène considéré, isolation qui met en jeu deux étapes :

- l'extraction de l'antigène des tissus végétaux,
- la purification de la préparation antigénique ainsi obtenue par élimination des composants contaminants.

1°) - Extraction de l'antigène -

Différentes méthodes sont utilisées. L'extrait antigénique peut être :

- le diffusat obtenu par incubation des tissus végétaux dans une solution tampon aqueuse;
- le filtrat de culture cellulaire contenant les macromolécules de surface ou des produits sécrétés;
- un broyat d'organes, tissus ou cellules végétales;
- la fraction soluble après centrifugation (KNOX & Coll. 1980)

Le protocole le plus approprié est établi pour chaque cas précis. En effet, les résultats obtenus par la suite sont conditionnés par la procédure suivie lors de l'extraction :

Ainsi, FERRARI & Coll. (1981), pour extraire l'antigène S2 des stigmates de Brassicae oleracea, ont testé différents protocoles et ont constaté que :

- 2 à 10 fois plus d'antigènes étaient extraits par incubation dans l'eau ou dans une solution de sucrose que par incubation en milieu NaCl -
- jusqu'à 10 fois plus d'antigènes étaient libérés par broyage des tissus plutôt que par simple lavage - mais qu'on avait aussi 10 fois plus de molécules contaminantes : l'extraction par lavage des tissus avait l'avantage d'être une étape préliminaire de purification.

VIANDER & Coll. (1979), travaillant sur les antigènes du pollen de bouleau, ont testé différents temps d'extraction :

Effect of extraction time on the amount of total proteins and small peptides, the thermostable (TS) antigen and allergenic activity in birch pollen extract and its main allergenic fractions after gel filtration on Sephadex G-100

Extraction ^a time	Proteins ^b g/l	Peptides ^c		Antigen (% of reference) ^d		Allergenic activity (I ₅₀ U/ml) ^e	
		F-C nmol/l	Ninh. nmol/l	Whole extract	Peak C fractions	Whole extract	Peak C fractions
15 min	2.9	0.51	8.7	18	0.08	33 900	30
30 min	3.3	0.56	8.9	26	0.38	56 500	130
3 h	3.6	0.57	12.9	33	0.92	80 000	770
24 h	7.4	1.15	20.9	34	1.18	53 600	930

^a Birch pollen (1/10 w/v) in 0.15 M PBS (slow rotation at +4°C). Freshly collected fertile pollen 17 was used.

^b Concentration of total proteins in the whole extract according to Lowry et al. (19).

^c Concentration of peptides in the whole extract after removal of the proteins by TCA precipitation; F-C = Folin-Ciocalteu; Ninh. = ninhydrin method, performed as described in (16).

^d Concentration of thermostable (TS) antigen measured by rocket immunoelectrophoresis using heat-treated samples and heat-treated (100°C for 15 min) birch pollen extract (BP extract, 1/10 w/v; see material and methods) as a standard.

^e Total allergenic activity in the whole extract and in the pooled peak C fractions after gel filtration of the extract. The mean values of two separate determinations varied less than 5%.

Le doublement de la quantité de peptides et la diminution de l'activité allergénique observés avec l'extrait total pour un temps long d'extraction (24h) pose le problème d'une possible dégradation enzymatique des protéines au cours de l'extraction, dégradation qui ne semble pas, ici, toucher les antigènes principaux.

Un exemple de l'importance du mode d'extraction est donné par les travaux de HUSSAIN & Coll. (1981) : Travaillant sur les allergènes du pollen d'Ambrosia elatior, ils ont pu mettre en évidence la différence de composition des extraits polliniques suivant qu'il s'agit d'une extraction de longue durée (24h) ou de courte durée (16mn) et suivant que le pollen utilisé est préalablement dégraissé à l'éther ou non.

TABLE I. Properties of ragweed extracts

Extracts (10% w/v)	Nondialyzable solids (µg/ml)	Antigen content (µg/ml)			Skin reactivity mean wheal diameter (mm)*
		AgE	Ra3	Ra5	
Nondefatted 16-min	5,200	9.0	8.3	28.9	4.8
Defatted 16-min	5,900	9.1	8.3	28.9	4.7
Defatted 24-hr	9,000	489	89.3	31.3	Not tested

Standard deviations for measurements of nondialyzable solids and antigen contents were ±5% to 10%.

*Average wheal diameter for puncture tests in 57 ragweed-allergic subjects using antigens at 300 µg nondialyzable solids per milliliter.

C'est l'analyse de l'"extrait 16mn" qui a permis de mettre en évidence la présence d'antigènes basiques jusqu'alors ignorés car non décelables dans les "extraits 24h" qui, eux, avaient permis l'identification des antigènes acides AgE, Ra3, Ra4, Ra5, lors de travaux antérieurs.

2°) - Purification des antigènes -

Le but est d'éliminer au maximum les composés contaminants présents dans les extraits, pour obtenir les préparations antigéniques les plus pures possibles, permettant d'identifier et de caractériser au mieux les antigènes concernés.

Les protocoles expérimentaux de purification font appel aux procédures biochimiques conventionnelles, permettant de séparer les macromolécules présentes dans une solution par leurs poids moléculaires et par leurs propriétés électriques.

Sont ainsi généralement utilisés :

- le fractionnement par précipitation des protéines au sulfate d'ammonium (séparation basée sur les différences de solubilité).
 - la filtration sur gel : Séphadex ou Biogel (séparation selon le poids moléculaire).
 - la chromatographie par échange d'ions (séparation selon la charge électrique), avec les échangeurs :
 - de cations : carboxyméthyl cellulose (CMcellulose)
 - d'anions : diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE_cellulose)
- comme le montrent les deux exemples ci-dessous :

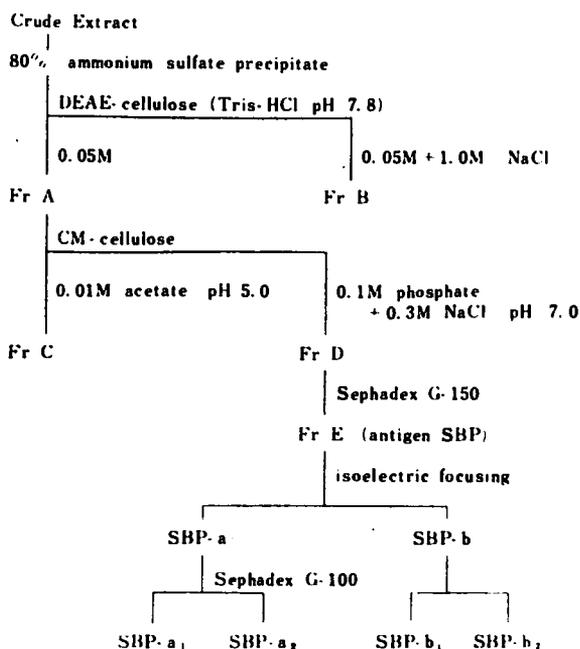


FIG. 1. Schematic diagram of the isolation of antigen SBP and its four subfractions from Japanese cedar pollen.

(Yasueda et al 1983)

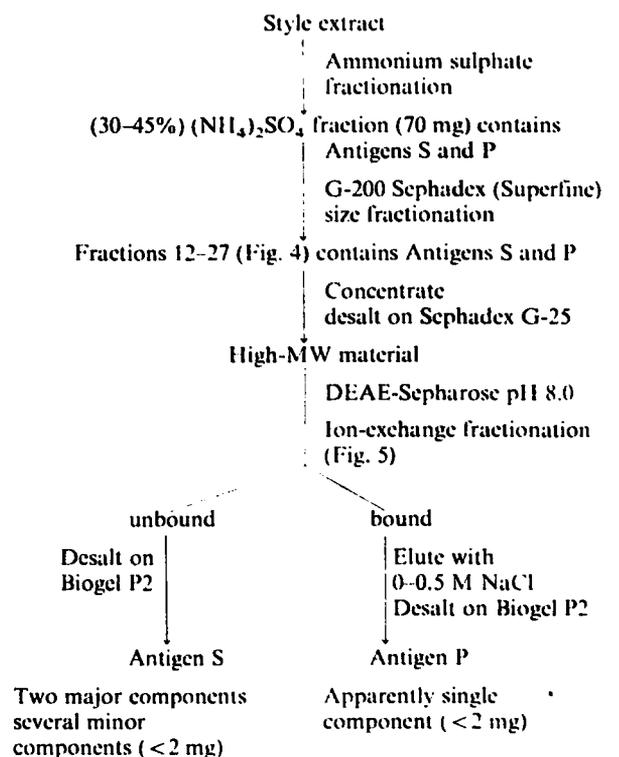


Fig. 1. Flow sheet illustrating sequence of steps in purifying Antigens S and P from *P. arinum* style extracts (genotype S₃S₄)

(Mau et al 1982)

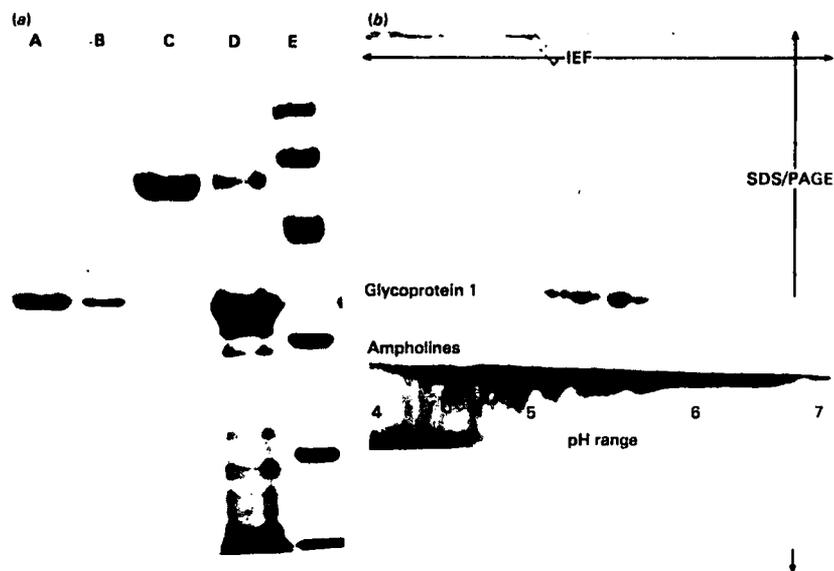


Fig. 3. (a) SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis of Glycoprotein 1 (A, B), Glycoprotein 2 (C), pollen extract (D), molecular-weight markers 94000, 67000, 43000, 30000, 20100 and 14400 (E) and (b) two-dimensional gel electrophoresis of Glycoprotein 1

(a) Gels containing 12.5% acrylamide and 0.1% SDS were stained with Coomassie Blue. (b) First dimension: isoelectric focusing (IEF) in 8M-urea, pH gradient 4-7; second dimension: SDS/polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS/PAGE).

Un seul composant apparait, aussi bien pour la glycoprotéine 1 (A, B) que pour la glycoprotéine 2 (C) - les contaminants présents dans l'extrait non purifié (D) ont effectivement été éliminés.

La détermination des poids moléculaires se fait par référence à des témoins standard (E). Une analyse par focalisation isoélectrique permet de constater que la glycoprotéine 1, qui apparait comme un seul composant par l'électrophorèse sur gel, correspond en fait à trois composants, qui diffèrent légèrement par la valeur de leur PI. Le PI de la glycoprotéine 2 n'a pu être déterminée ici dans la mesure où il est supérieur à 9.

On cherchera, bien sûr, à déterminer la composition moléculaire des substances isolées. La composition en amino-acides et en polysaccharides, et l'arrangement des résidus seront déterminés selon les méthodes classiques d'analyse quand cela est possible (hydrolyse chimique et enzymatique, méthodes colorimétriques, chromatographie sur papier, chromatographie gazeuse, ...).

Dans certains cas où les quantités d'antigènes disponibles ne sont pas suffisantes, des informations peuvent être déduites par l'analyse des interactions macromolécules-lectines et macromolécules-antisérums (HOWLETT et CLARKE - 1981).

Ainsi, par exemple, la liaison d'une glycoprotéine avec la Con A indique la présence de résidus manose ou glucose, soit en position terminale, soit en liaison α 1-2.

C'est pourquoi certains expérimentateurs introduisent dans leur protocole des chromatographies d'affinité pour les lectines.

La chromatographie d'affinité pour une lectine apparait d'ailleurs comme un outil de plus pour la séparation et l'isolement des glycoprotéines, comme le montrent les travaux de KARLSTAM et NILSSON (1982), qui ont employé la chromatographie d'affinité pour la Con A pour séparer les allergènes du pollen de différentes espèces végétales.

Dans leurs travaux, HOWLETT et CLARKE (1981) proposent une méthode simple pour l'étude des interactions glycoprotéine-lectine qui permet de détecter rapidement des quantités nanométriques de lectines liées.

2°) - Techniques immunologiques -

A ce stade, les techniques immunologiques vont apparaitre comme un outil particulièrement précieux.

Les techniques immunologiques utilisent les anticorps produits par un animal (lapin, chèvre, souris, ...) en réponse immunitaire à la pénétration d'un antigène. Elles s'appuient sur la propriété qu'ont ces anticorps de se lier de façon spécifique aux antigènes qui leur ont donné naissance.

* Différentes techniques sont utilisées, qui font appel à la réaction de précipitation qui se produit quand un rapport de concentration favorable existe entre antigène et anticorps. Cette réaction de précipitation peut être visualisée dans des gels, les précipités formés étant révélés par coloration (le plus souvent au Bleu de Coomassie).

• A - Immunodiffusion radiale simple (RID) -

La réaction s'effectue sur une plaque recouverte d'une gelose dans laquelle a été incorporé l'antisérum. L'antigène est déposé dans des puits creusés dans la gelose et diffuse. Des disques de précipitation se forment progressivement et se stabilisent. La taille de l'anneau de précipitation obtenu est proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans le puits. L'établissement d'une courbe étalon peut donc permettre un dosage précis de la concentration en antigènes.

Cette technique simple à mettre en oeuvre est fréquemment utilisée : YASUEDA & Coll. (1983) ont ainsi pu tester la pureté de l'Ag SBP isolé du pollen de Cryptomeria japonica. La procédure d'extraction (cf. Fig.p4) conduit bien à l'élimination des composants contaminants. On constate d'autre part que les quatre fractions obtenues en phase finale présentent la même identité immunologique.

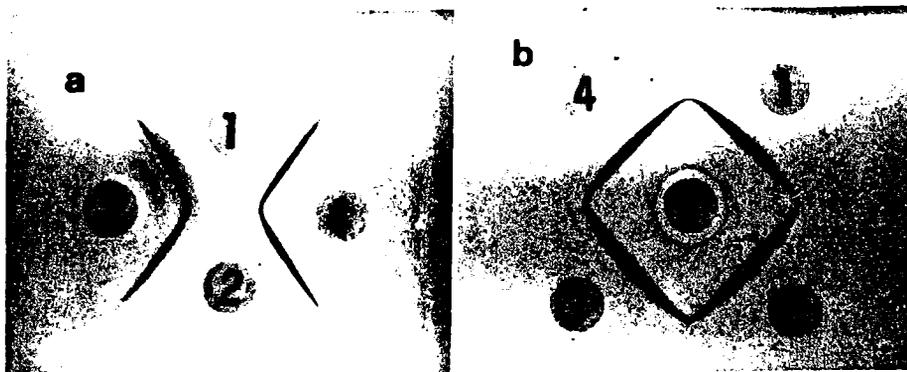


FIG. 7. Immunodiffusion analyses. a, CE in well 1 (10 mg/ml); antigen SBP in well 2 (0.1 mg/ml); rabbit anti-CE serum in well 3; rabbit anti-SBP serum in well 4. b, SBP-a₁, a₂, b₁, and b₂ in wells 1, 2, 3, and 4, respectively (0.1 mg/ml); rabbit anti-SBP serum in well 5.

MAU & Coll. (1982) mettent en évidence la composition antigénique des extraits stylaires de différentes variétés de Prunus avium. On constate que si l'un des antigènes est présent chez les quatre variétés testées ici (bande interne), l'autre n'est présent que dans les deux variétés de génotype S₃ S₄.

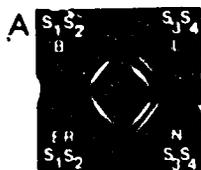


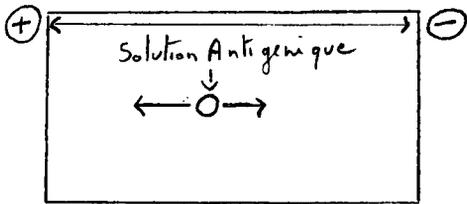
Fig. 2A-D. Antigenic components of *Prunus avium* styles. A, B Antigens were prepared from extracts of mature styles of different *P. avium* cultivars. B, Bedford (S₁S₂); ER, Early Rivers (S₁S₂); L, Lambert (S₃S₄); N, Napolcon (S₃S₄). Antiserum was raised to 80% ammonium sulphate precipitates of extracts prepared from mature styles of cv. Lambert (S₃S₄). (Antiserum to style extract.) A Immunodiffusion showing inner diffuse band (Antigen P) common to all cultivars tested; a strong outer band (Antigen S) is produced with antigen preparations from cultivars of the same genotype as the eliciting antigen used for antiserum production (S₃S₄). A faint, but detectable band corresponding to the outer (Antigen S) band was produced using antigen preparations from S₁S₂ varieties; this band is not visible in the photograph (unstained gel). B Immu-

• C - Immunoélectrophorèse (IE) -

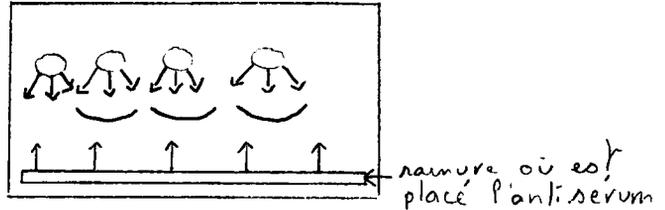
Lorsqu'on a affaire à des mélanges antigéniques complexes, les méthodes présentées ci-dessus ne sont pas performantes. Une séparation préalable des antigènes présents par électrophorèse avant diffusion et précipitation va permettre une meilleure identification des composants.

Différentes versions se sont développées :

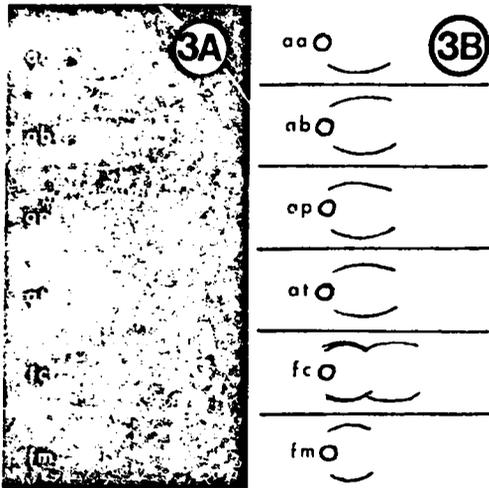
+ Immunoélectrophorèse de GRABAR et WILLIAMS -



1) séparation électrophorétique de la solution antigénique

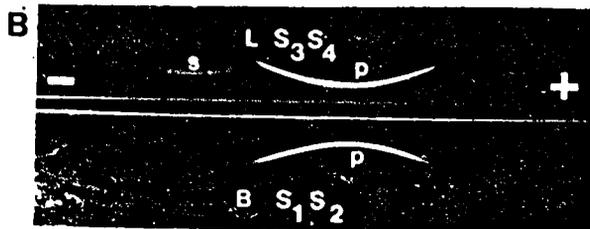


2) diffusion des antigènes et des anticorps
précipitation



LEE et DICKINSON 1979

3. Presence of AgE-like materials in pollen extracts of *Ambrosia* species as demonstrated by conventional immunoelectrophoresis. Whole pollen extracts were electrophoresed 2 hr at 2 V/cm (anode at right). 3A, photograph; 3B, sketch of precipitin bands. Troughs were filled with sheep antiserum for purified antigen E from *A. artemisiifolia*, and the photograph was taken 48 hr later. See Table 1 for key to abbreviations and the text for experimental details.



MAU et Coll. 1982

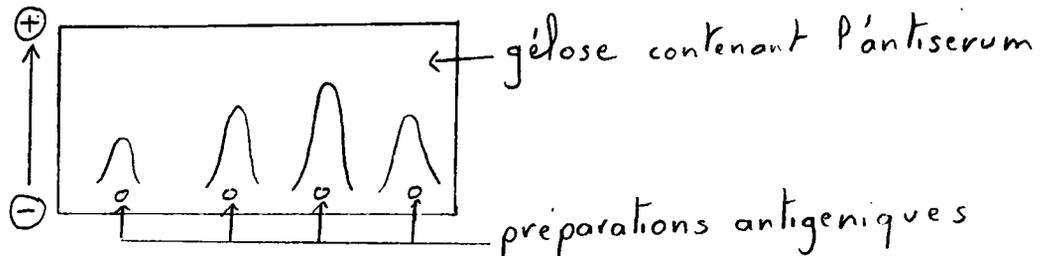


Immunoelectrophoresis at pH 8.8 showing separation of Antigens S and P. Antigen S, detected only in the S_3S_4 antigen preparations, is positively charged, and Antigen P, common to both S_1S_2 and S_3S_4 antigens is negatively charged (unstained gel). C Immunoelectrophoresis at pH 8.8 of purified Antigen S (upper cell) and purified Antigen P (lower well) using antiserum to style extract (stained gel). The Antigen S preparation contains two positively charged, closely related components which correspond to Antigen S in 2B. The Antigen P preparation gives a single negatively charged component which corresponds to Antigen P in 2B. D Immunodiffusion showing single bands

Les informations fournies sont qualitatives.

+ Immunoélectrophorèse de LAURELL (Rocket immunoélectrophorèse (RIE))

C'est une méthode quantitative qui consiste en l'électrophorèse de l'antigène dans un gel contenant l'anticorps.



La hauteur du pic (rocket) de précipitation est proportionnelle à la concentration de l'antigène. Un dosage des antigènes est donc possible par référence à une gamme étalon.

Une modification de cette méthode est parfois employée : Les préparations antigéniques à étudier sont appliquées dans les puits creusés dans un gel dépourvu d'anticorps et on laisse ainsi diffuser les antigènes pendant une certaine période avant de procéder à l'électrophorèse dans un gel contenant l'anticorps. De cette façon, les lignes de précipitation des antigènes communs aux différentes préparations fusionnent. C'est pourquoi on parle de "Fused-Rocket-Immunoélectrophorèse" (FRIE).

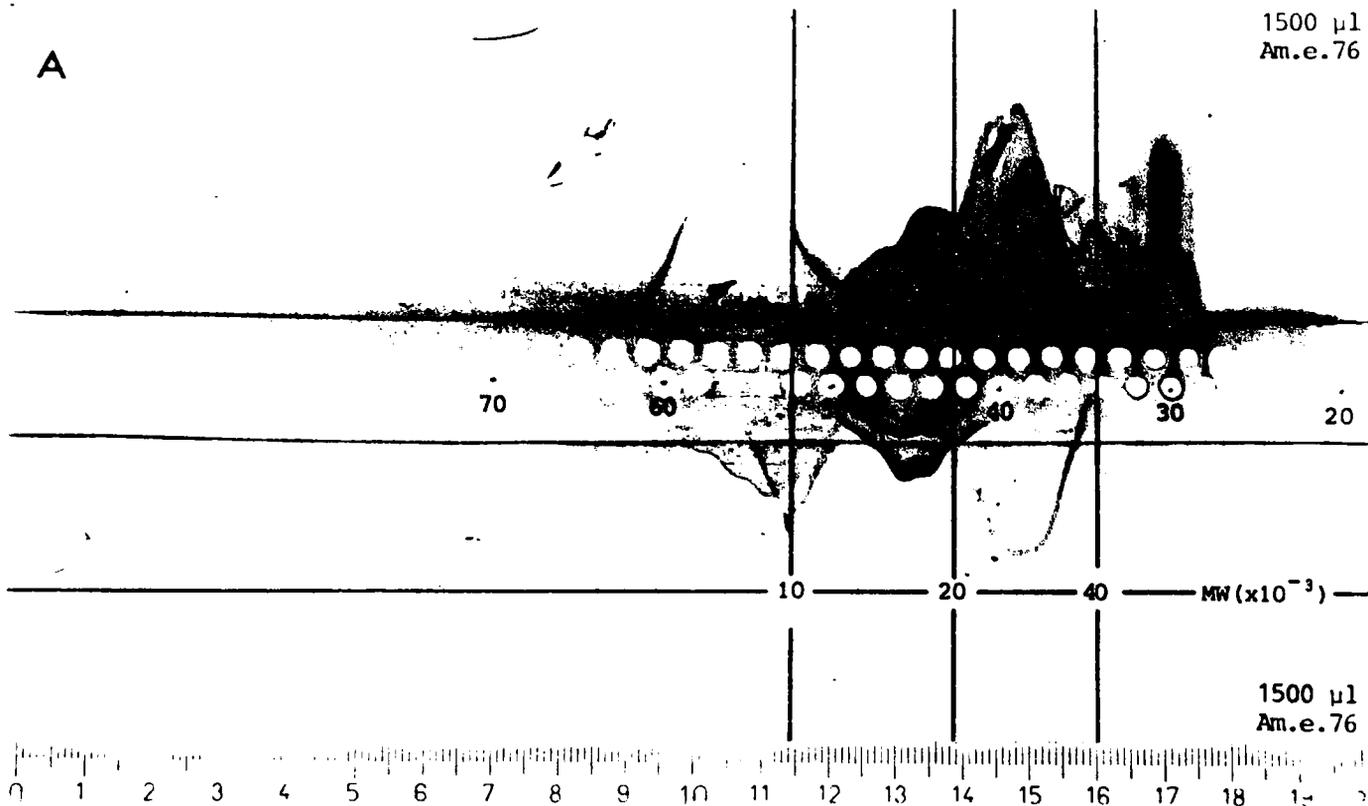


Figure 2 Quantitative immunoelectrophoretic (QIE) analysis of fractions of Am e.76 (against anti-Am e.76, 13 μ l/cm²) after chromatography on Sephadex G-75. A, aliquots (7 μ l) from the numbered column fractions were applied in adjacent wells and allowed to diffuse (1 hr) before being subjected to fused-rocket immunoelectrophoresis (15 hr at 2 V/cm) into gels containing anti-Am e.76. Approximately in m.w. ($\times 10^{-3}$) of the antigens are indicated. B, CLIE fraction No. 54 was

Dans cet exemple, LOWENSTEIN et MARSH utilisent cette méthode pour étudier les différentes fractions obtenues après chromatographie Sephadex de l'extrait pollinique d'Ambrosia elatior. En respectant l'ordre d'obtention des fractions par chromatographie Sephadex lors de l'application des solutions dans les puits, on conserve la correspondance antigène-poids moléculaire. Parmi les antigènes avec un poids moléculaire inférieur à 10.000, huit sont basiques et seulement deux acides. Tous les antigènes ayant un poids moléculaire supérieur à 40.000 sont acides. (LOWENSTEIN et MARSH 1981)

+ Immunoélectrophorèse bi-dimensionnelle (crossed immunoélectrophorèse (CIE))

Une première séparation électrophorétique du mélange d'antigènes est suivie par une deuxième électrophorèse perpendiculaire à la première, qui se fait en gel contenant l'anticorps. Cette méthode fournit des résultats à la fois qualificatifs et quantitatifs : On obtient des lignes de précipitation correspondant à chacun des systèmes antigène-anticorps; ces lignes ont une forme de pic dont la hauteur est proportionnelle à la concentration d'antigènes.

Ainsi LOWENSTEIN et MARSH ont utilisé l'immunoélectrophorèse bi-dimensionnelle pour analyser l'extrait pollinique d'Ambrosia elatior :

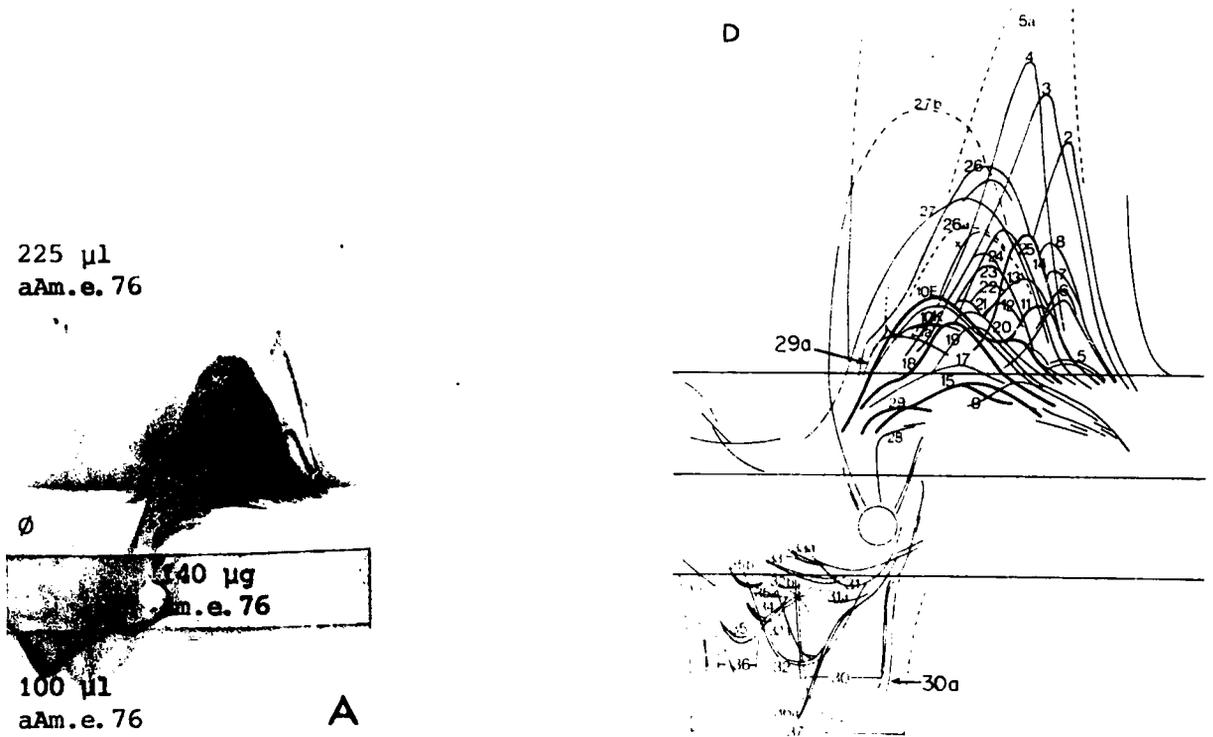
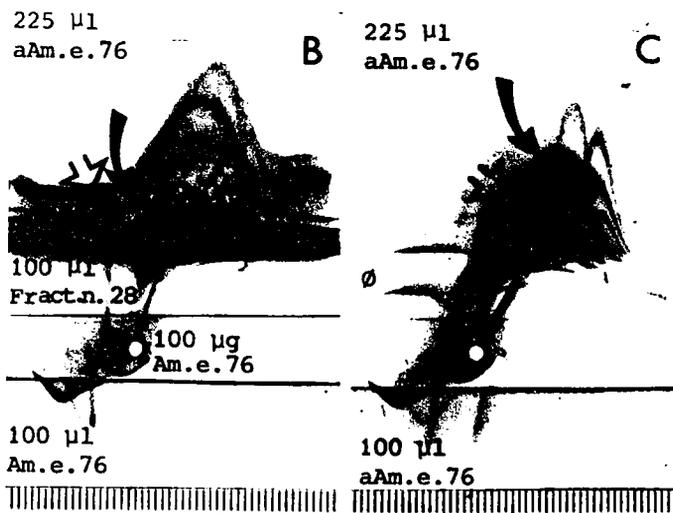


Figure 1. Crossed immuno-electrophoretic (CIE) analysis of the reference ragweed pollen extract, Am.e.76, against anti-Am.e.76 and anti-Am.e.78. CIE was performed in 1% agarose gel containing 0.073 M Tris, 0.024 M barbital, 0.0006 M calcium lactate, and 0.0003 M sodium azide (pH 8.6, 25°C) at 15°C using 10 V/cm for 30 min in the 1st dimension and 2 V/cm for 15 hr in the 2nd dimension (12). Anodes were to the right for the 1st dimension and at the top for the 2nd dimension. An intermediate gel containing no antigen or antibodies was placed between the 1st dimension gel and the anodic antibody-containing gel in order to improve resolution in the 2nd dimension. A, B, and C, amounts and types of antigens and antibodies are indicated on the figures. Figure B is overexposed in order to reveal the maximum number of basic precipitates. D, drawing of the reference precipitation pattern (Am.e. 76 vs antiAm.e. 76) with classification numbers for the precipitates and corresponding antigens. E, expanded drawing of the precipitated cathodic-moving antigens.

Une bonne séparation des antigènes a été obtenue en faisant varier les temps et la position du puits d'application de l'antigène pour la première électrophorèse et en faisant varier les concentrations d'antigènes et d'anticorps.

L'analyse révèle ainsi la présence de 52 antigènes, dont 33 migrent vers l'anode et 16 vers la cathode. Cette méthode se montre très sensible, et bien qu'elle ne puisse prétendre à déceler tous les antigènes présents, c'est un outil particulièrement performant pour l'étude des mélanges complexes d'antigènes. (LOWENSTEIN-MARSH 1981).

Une variante de cette méthode est parfois utilisée, couplée à une CIE "normale", pour identifier les antigènes présents dans une préparation antigénique purifiée. On parle de "crossed-line-immunoelectrophorèse" (CLIE). La procédure est la même que pour la CIE, mais lors de la deuxième électrophorèse, un gel contenant la fraction purifiée est introduit entre le gel résultant de la première électrophorèse et le gel imprégné par l'antisérum. On compare alors les lignes de précipitations obtenues dans ce cas au schéma de précipitation de référence obtenu avec la CIE "normale".



B, CLIE: fraction No. 28 was incorporated into the intermediate gel between 1st dimension gel and the cathodic antibody-containing gel and Am.e.76 in the well. C, control for B without antigen incorporated into the intermediate gel. Arrows illustrate antigen identification as follows: ↓, 10E, ↘, 27, and ↓, 26, which was obtained by comparing the fused-line- and crossed-immunoprecipitates in B with the crossed-immunoprecipitates in C.

LOWENSTEIN & Coll. ont abondamment utilisé cette méthode pour l'étude des antigènes du pollen d'Ambrosia elatior (LOWENSTEIN et MARSH 1981 - LOWENSTEIN & Coll. 1981).

On trouve aussi dans certaines études la réalisation de CIE "tandem" : LEE et DICKINSON ont soumis l'extrait pollinique de Ambrosia artemisiifolia à cette technique :

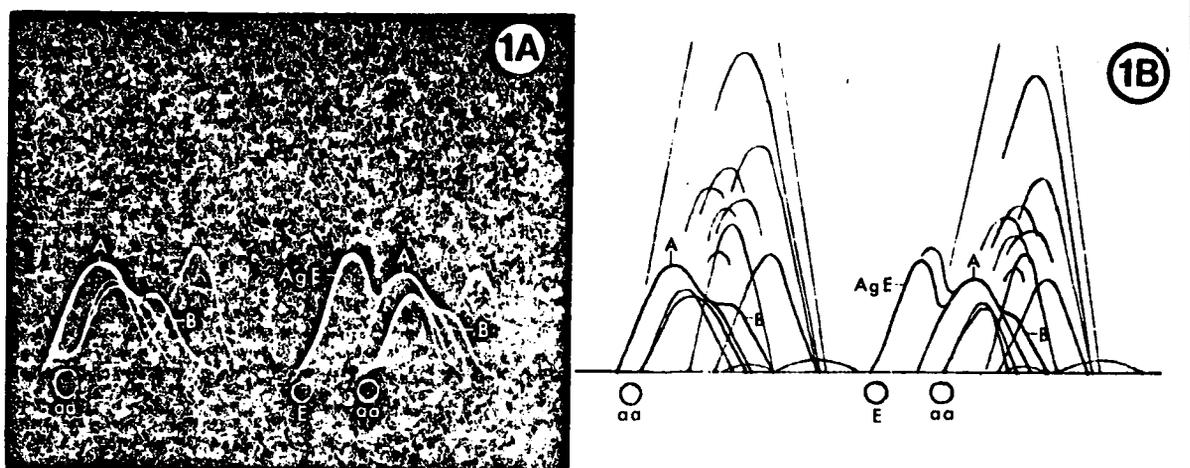


Fig. 1-3. 1. Crossed immunoelectrophoresis plate of a whole pollen extract of *A. artemisiifolia* alone (left) and in tandem with purified AgE from *A. artemisiifolia* (right). 1A, photograph; 1B, sketch of precipitin bands. The first dimension consisted of electrophoresis (2 hr at 2 V/cm) in buffered agarose and the anode was to the right of the three wells in which samples were placed initially. The second dimension consisted of electrophoresis (15 hr at 1.5 V/cm) into agarose which contained rabbit antiserum against whole pollen extract of *A. artemisiifolia*, and the anode was at the top. The wells labeled "aa" received concentrated pollen extract which represented 2.6 mg of pollen. The well that is labeled "E" received 7 μ g of AgE. The photograph was taken 48 hr after termination of electrophoresis. See text for other details. |

(LEE et DICKINSON 1979)

L'extrait pollinique est soumis à l'électrophorèse en tandem avec l'antigène E purifié pour déterminer quelle bande de l'extrait correspond à l'Ag E. Les antigènes identiques de puits différents produiront une seule bande de précipitation fusionnée au lieu de deux bandes de précipitations qui se chevauchent. Ainsi la ligne de précipitation de l'AgE fusionne avec la ligne notée A. Cependant la partie gauche de la ligne A existe encore : la fusion avec l'AgE n'est que partielle. La bande A contient l'Ag E, mais aussi au moins un autre antigène différent de Ag E.

On peut aussi constater qu'une fusion partielle existe entre la ligne B et la ligne A pour l'extrait total, ce qui indique que le pollen possède des substances présentant une même spécificité antigénique, mais avec des mobilités électrophorétiques différentes.

Dans leurs travaux, VIK & Coll. (1983) ont utilisé les techniques de CLIE et CIE "tandem" pour établir les relations immunologiques existant entre les différentes fractions allergéniques du pollen de bouleau.

* Une autre technique assez souvent utilisée dans les études immunologiques des antigènes végétaux est le radio-immuno-essai en phase solide, qui repose sur le principe suivant :

L'antigène est absorbé sur un support solide (on utilise beaucoup maintenant les plaques à microtitre en polyvinylchloride flexible), puis une incubation avec l'antisérum permet aux anticorps de se fixer sur leurs antigènes spécifiques. Les complexes antigènes-

anticorps sont révélés par des immunoglobulines anti-anticorps marqués le plus souvent par l'I¹²⁵, mais aussi parfois par un enzyme. Ainsi VIANDER & Coll. (1979) font appel à un enzymo-immuno-essai (EIA) pour la détection semi-quantitative des antigènes dans les différentes fractions obtenues après filtration sur gel.

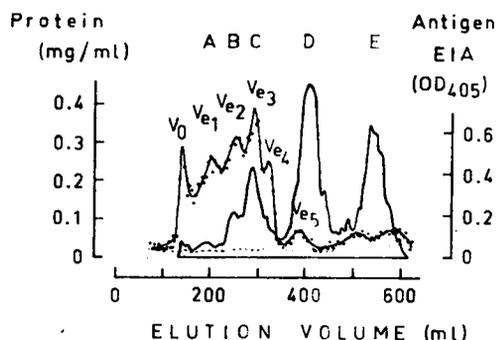


Fig. 1. Sephadex G-100 gel filtration of birch pollen extract (5 ml, 10⁻¹ w/v). Protein concentrations of the fractions (peaks A, B, C, D and E), are shown by solid line (—). Binding of rabbit antibodies to the different fractions (EIA, absorbancy at 405 nm = OD₄₀₅; peaks V₀, V_{e1}, V_{e2}, V_{e3}, V_{e4} and V_{e5}) is shown by dots connected by a line (·-·-·). Background binding of antibodies from a normal rabbit serum is indicated by dotted line (- - -).

* Remarque - Problème de la spécificité -

Si les méthodes immunologiques apportent une aide précieuse, il est nécessaire, pour une bonne utilisation de celles-ci et pour une interprétation correcte des résultats, de bien connaître la nature des inter-actions antigènes-anticorps et en particulier ce que recouvre la notion de spécificité antigénique.

L'existence des réactions croisées (l'anticorps peut reconnaître un antigène autre que son immunogène si cet antigène possède des déterminants antigéniques identiques - ou de structure voisine - à ceux de l'immunogène) impose des limites à la notion de spécificité. L'idée d'une spécificité plus ou moins étroite invite à la prudence dans l'interprétation des résultats.

En particulier se pose le problème de la spécificité des anticorps utilisés. Les antisérums qui sont obtenus par injection à un animal (le plus souvent un lapin, mais aussi un mouton, une chèvre, une souris,...) d'une préparation antigénique contiennent généralement des populations d'anticorps qui réagissent contre un large éventail de déterminants antigéniques. Les anticorps présents sont

susceptibles de se lier à des antigènes identiques à ceux présents dans la préparation antigénique (et dans ce cas éventuellement à des antigènes mineurs contaminants cette préparation), mais aussi à des antigènes n'existant pas dans cette préparation, mais ayant des déterminants communs avec les antigènes immunogènes.

(KNOX & Coll. 1980 - KNOX 1982)

Ainsi HOWLETT et CLARKE (1981 (2)), utilisant des anticorps marqués à l'I¹²⁵ avec la technique des radio-immuno-essais sur plaque-microtitre de polyvinylchloride, ont mis en évidence une réactivité croisée importante entre différentes glycoprotéines végétales. L'antisérum de la glycoprotéine 2 isolée du pollen de Lolium perenne se lie à diverses glycoprotéines végétales, dont d'autres glycoprotéines de pollen comme la glycoprotéine 1. Les auteurs ont montré que les déterminants antigéniques mis en jeu dans cette réactivité croisée étaient probablement des séquences de saccharides incluant arabinose et galactose. Ils considèrent que cette réactivité croisée entre les glycoprotéines végétales peut être un phénomène très général qui impose des restrictions à l'interprétation des résultats obtenus en immunochimie et immunocytochimie.

C'est pourquoi, d'une manière générale, la spécificité des anticorps doit être testée pour essayer de déterminer au mieux les propriétés immunologiques du matériel employé.

Les récents perfectionnements apportés aux techniques d'analyses des interactions antigènes-anticorps présentées ci-dessus permettent aujourd'hui d'évaluer qualitativement et quantitativement ces interactions avec un haut niveau de précision, les techniques disponibles étant modifiées et adaptées pour répondre aux besoins particuliers.

Un grand espoir face aux problèmes de spécificité est apporté par le développement récent d'une nouvelle technique de production des anticorps, offrant la possibilité d'obtenir des anticorps, d'un seul type ou anticorps monoclonaux. Cette technique récemment développée en biologie animale devrait, dans les prochaines années, trouver des applications en immunologie végétale et permettre de surmonter certaines difficultés.

II - LOCALISATION DES ANTIGENES VEGETAUX -

Introduction -

Les techniques immunologiques offrent des possibilités de détection des macromolécules des organes, tissus et cellules, plus spécifiques que les méthodes cytochimiques conventionnelles (KNOX 1982)

S'il a fallu attendre les années 70 pour voir les premières investigations immunocytochimiques chez les plantes, aujourd'hui l'immunocytochimie est bien établie comme un outil hautement spécifique pour la localisation des protéines, glycoprotéines et polysaccharides des tissus végétaux aussi bien à la surface cellulaire que dans les cellules. (KNOX & Coll. 1980).

Les auteurs se sont efforcés d'adapter les méthodes développées en biologie animale pour leur application chez les végétaux, en essayant de résoudre les problèmes spécifiques posés par le matériel végétal.

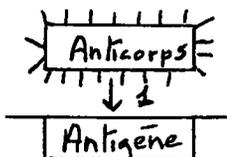
Le tableau de la page suivante présente une liste de quelques uns des travaux qui ont été menés concernant la localisation des antigènes végétaux extracellulaires.

1 - Principe de l'immunocytochimie -

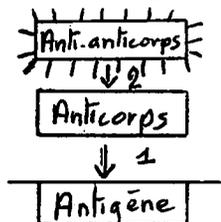
L'immunocytochimie utilise la spécificité de la liaison antigène-anticorps pour visualiser les antigènes "in situ", au sein des cellules et tissus végétaux. Les anticorps mis en incubation avec ces cellules ou tissus iront se fixer sur leurs récepteurs spécifiques si ceux-ci sont présents, un marqueur permettant de repérer le complexe ainsi formé.

- Trois méthodes différentes sont utilisées :

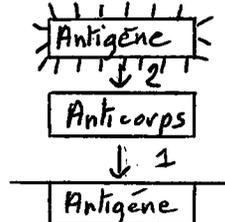
méthode directe
(1 étape)



méthode indirecte
(2 étapes)



méthode du "sandwich"
(2 étapes)



 molécule portant le marqueur

La méthode "du sandwich" offre une plus grande spécificité, mais

Table 2. Selected list of extracellular antigens of plants located by immunocytochemical methods. Abbreviations as Table 1.

<i>Organ, tissue or cell</i>	<i>Antigen</i>	<i>Fixation</i>	<i>Sectioning</i>	<i>Technique/ probe</i>	<i>Cellular site of antigen</i>	<i>Reference</i>
Pollen						
<i>Gladiolus</i> Ragweed, <i>Cosmos</i> , Poplar, <i>Phalaris</i> , <i>Malva viscus</i>	Diffusible antigens	None	Frozen or 'pollen prints' in agarose	I-RITC I-FITC	Wall sites; exine and intine	Knox <i>et al.</i> (1970) Knox (1971) Knox & Heslop-Harrison (1971a,b); Knox <i>et al.</i> (1972); Heslop-Harrison <i>et al.</i> (1973)
<i>Phalaris</i> , <i>Cosmos</i> , Ragweed, (pollinated stigmas)	Diffusible antigens	None	None	I-FITC	Pollen surface, pollen tube, and adjacent stigma surface	Knox & Heslop-Harrison (1971); Knox (1973)
Birch	Diffusible antigens	None	Whole grains	I-FITC	Pollen surface	Belin & Rowley (1971)
Ragweed	Antigen E	Freeze- substitution	Paraffin	I-FITC	Exine and intine	Howlett <i>et al.</i> (1973)
Ryegrass	Group I allergen, Antigen A	Methanol or freeze-dried	JB-4 plastic resin	D-FITC I-Ferr I-FITC	Exine Pollen wall and surface cytoplasm	This paper Knox <i>et al.</i> (1980) Howlett <i>et al.</i> (1981) Vithanage <i>et al.</i> (1980)
Stigma						
Kale	Diffusible antigens	None	None	I-FITC	Surface	Heslop-Harrison <i>et al.</i> (1975)
Stem						
Pea	Cellulose (Buffer- insoluble)	Form and glut	Razor blade sections	D-Ferr	Cell wall and periplasmic space	Bal <i>et al.</i> (1976)
Seed						
Jack bean	Urease	None	Freeze- sectioning	I-FITC	Intercellular space	Murray & Knox (1977)
Brown alga						
Fucus	Alginic acid	None	GMA plastic resin	I-FITC	Cell walls	Vreeland (1972)
Slime mould						
<i>Dictyostelium</i>	Discoidin	Glut	None	I-Ferr	Cell surface	Chang <i>et al.</i> (1975)

Fixation – formaldehyde (Form); glutaraldehyde (Glut). Technique – direct (D) or indirect (I) with fluorescent markers: Fluorescein isothiocyanate (FITC); Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC); Lissamine Rhodamine B (LRB); or electron-dense markers for transmission electron microscopy [ferritin (Ferr)].

des quantités importantes d'antigènes purifiés doivent être disponibles.

La méthode indirecte permet une meilleure résolution : la fluorescence est amplifiée, plusieurs anti-immunoglobulines pouvant se fixer sur une molécule anticorps. De plus, les anti-anticorps sont disponibles commercialement, et le même réactif une fois marqué peut être employé pour plusieurs réactions, alors que la méthode directe demande à ce que l'anticorps spécifique de chaque antigène étudié soit conjugué individuellement avec le marqueur, ce qui alourdit la procédure. (KNOX & Coll. 1980).

D'une façon générale, la méthode indirecte est la plus fréquemment retenue (cf. tableau).

. Les marqueurs -

Les différents marqueurs classiquement employés en immunocytochimie végétale sont passés en revue par KNOX (1982), qui présente aussi quelques innovations récemment développées.

Peuvent être utilisés :

- des fluorochromes :
 - la fluorescéine isothiocyanate (FITC)
 - la tétraméthyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)
 - la lissamine rhodamine B (LRB)
 - le stilbène isothiocyanate (SITC)
- des enzymes :
 - la peroxidase,
 - la phosphatase.
- des produits denses aux électrons :
 - la ferritine,
 - l'or colloïdal.

Les fluorochromes sont les plus fréquemment utilisés (cf. tableau). Ils ont l'avantage de permettre la meilleure résolution en microscopie optique. Mais il faut faire face au problème de l'autofluorescence de certains composants des tissus végétaux, (en particulier la fluorescence des polyphénols est importante aux longueurs d'onde d'excitation de la FITC).

L'autofluorescence peut être minimisée en jouant sur les longueurs d'onde d'excitation, mais en tout état de cause, des contrôles devront être faits parallèlement aux essais proprement dits pour différencier la fluorescence spécifique de l'autofluorescence.

Enfin, il est nécessaire, après conjugaison du réactif avec le marqueur, de vérifier que la capacité de liaison avec le récepteur spécifique n'est pas altérée.

2 - Problèmes particuliers -

Deux points particuliers sont à souligner concernant les méthodes immunocytochimiques :

- Ces méthodes étant basées sur la reconnaissance spécifique antigène-anticorps, il est important de s'assurer de la "qualité" de cette spécificité, qui conditionne leur fiabilité;
- Le problème majeur reste probablement celui de la préparation des tissus pour permettre l'accès des anticorps vers leurs sites récepteurs tout en préservant la structure fine des cellules.

1°) Spécificité des anticorps -

Nous avons vu (cf. p¹⁵) que les antisérums obtenus par la méthode conventionnelle d'immunisation d'un animal pouvaient présenter une spécificité plus ou moins large (antigène contaminant dans la préparation antigénique purifiée, réactions croisées,...). L'existence des réactions croisées impose des restrictions sur l'interprétation des études immunocytochimiques.

Il est nécessaire d'évaluer la spécificité des antisérums avant utilisation en immunocytochimie dans le but de réduire au maximum les liaisons non spécifiques. Les techniques d'analyses disponibles permettent actuellement d'évaluer la spécificité avec un relativement haut niveau de précision.

Différentes méthodes sont disponibles pour accroître la spécificité de l'antisérum :

- + Immunoabsorption : L'antisérum peut être adsorbé avec un extrait tissulaire apparenté pour éliminer les anticorps communs. Ainsi FERRARI & Coll (1981), pour isoler l'antigène S spécifique du génotype S2S2 des stigmates de Brassicae oleracea, adsorbent l'antisérum avec des extraits de stigmates de génotype S1S1 afin d'éliminer les anticorps communs et de ne garder que les anticorps spécifiques du génotype S2S2.
- + Purification totale ou partielle de la fraction Ig G de l'antisérum :
 - précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie par échange d'ions (chromatographie-DEAE)
 - chromatographie d'affinité pour la protéine A de Staphylocoque suivant la méthode de HELM & Coll.(1972)

+ obtention des anticorps monospécifiques par chromatographie d'affinité pour l'antigène.

2°) Préparation des tissus -

Le succès des méthodes immunocytochimiques dépend de l'intégrité des déterminants antigéniques qui lient les anticorps. Les méthodes employées pour la préparation des tissus doivent donc éviter d'altérer cette intégrité.

Deux types de procédure sont utilisés :

- Dans un cas les cellules ou les coupes tissulaires sont exposées directement aux anticorps spécifiques (avec ou sans procédure de fixation) = "pre-embedding staining method".

- Dans l'autre cas, les tissus ou cellules sont fixés, puis inclus dans une masse plastique et des coupes fines sont effectuées, qui sont mises à incuber en présence des molécules anticorps--"post embedding staining method".

- La première méthode, techniquement moins lourde, reste peu employée pour la localisation des antigènes végétaux, car on est alors confronté au problème de la pénétration des anticorps dans les cellules non coupées : la paroi cellulaire des cellules végétales apparait comme un obstacle gênant cette pénétration, d'où des résultats falsifiés. Cependant les progrès développés récemment et qui trouvent leur expression dans la méthode de WICK & Coll. utilisée pour la localisation de tubuline dans des cellules racinaires de l'oignon, ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cette méthode dans la localisation des antigènes intracellulaires (KNOX 1982).

- La deuxième technique a été largement utilisée dans la mesure où elle permet l'accès direct des anticorps aux sites antigéniques. Elle est utilisable aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique.

Les étapes mises en jeu et les problèmes qui peuvent se poser lors de l'utilisation de cette méthode sont résumés dans le schéma de la page suivante, et sont discutés dans les articles de KNOX.

(KNOX & Coll.1980 , KNOX 1982)

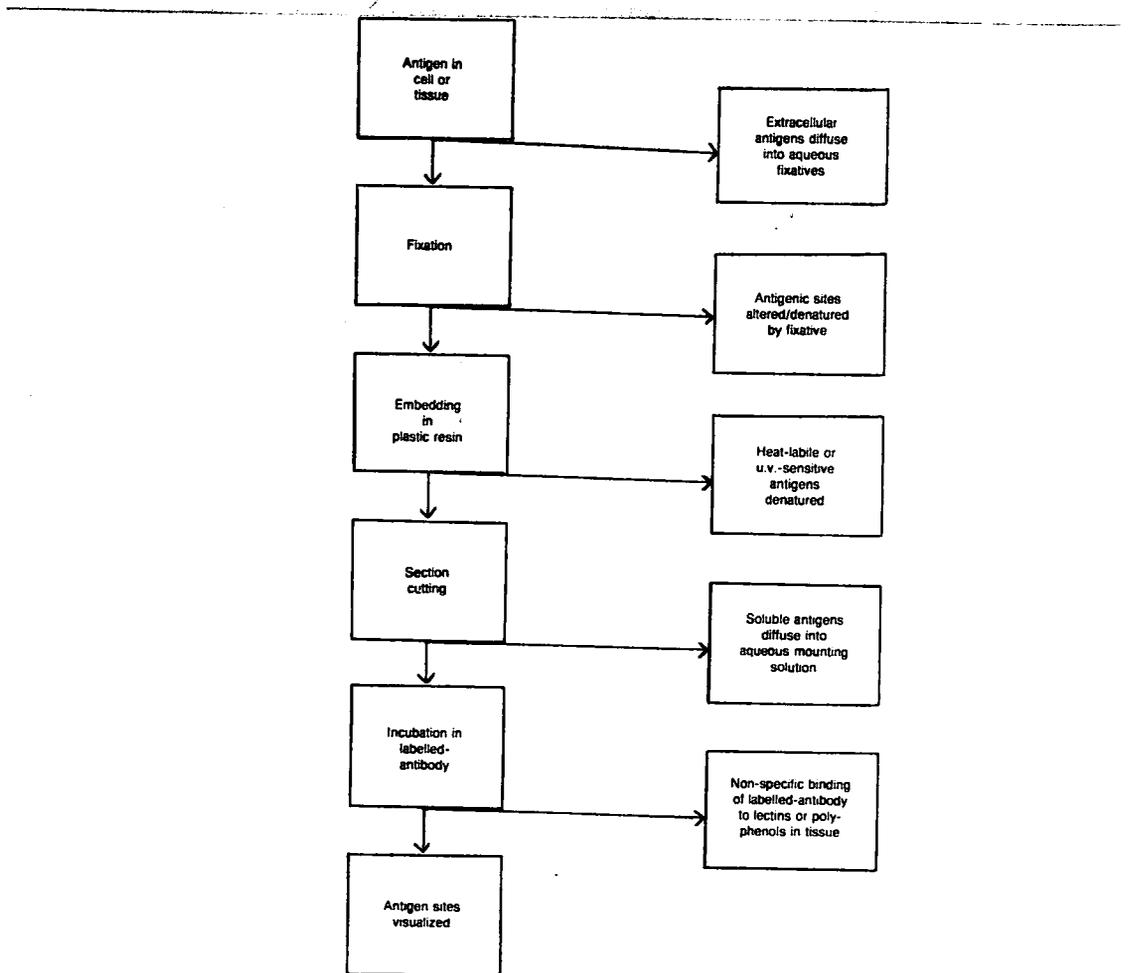


Fig. 2. Scheme showing the post-embedding staining procedure for immunofluorescence, and some of the artifacts that may occur at the various stages of processing with plant tissues.

KNOX & Coll. 1980

• Les effets des différents traitements de fixation sur les interactions antigènes-anticorps restent encore largement à être explorés. Les études menées jusqu'à maintenant restent ponctuelles et la situation observée in vitro n'est pas forcément représentative de ce qui se passe in situ.

Il apparait que l'effet des fixateurs aldéhyques sur les antigènes végétaux varie selon les systèmes étudiés.

HOWLETT et CLARKE (1981) ont étudié les effets de différents traitements fixateurs sur la liaison antigène-anticorps de deux glycoprotéines en utilisant une modification de la technique des radio-immunoessais sur plaque-microtitre en polyvinylchloride. Seul le glutaraldéhyde se révèle avoir un effet inhibiteur significatif, mais l'inhibition se limite à 15%.

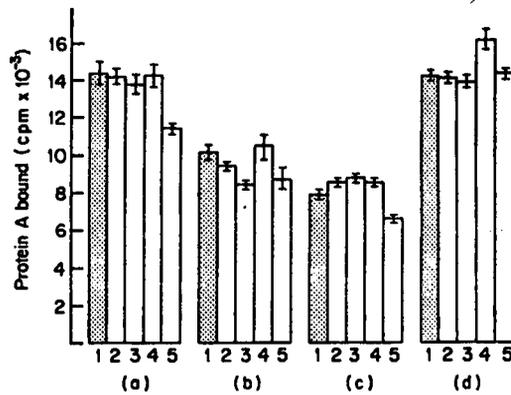


FIG. 5. Effects of various fixation treatments on antibody binding of Group 1 allergen and Antigen A of ryegrass pollen as detected by radioimmunoassay. Microtitre tray wells were coated with *L. perenne* pollen extract, Group 1 allergen or Antigen A and then fixation treatments performed in the antigen coated wells. Treatments: (1) untreated antigen; (2) antigens freeze dried for 16 h; (3) anhydrous methanol for 1 h at 4°C; (4) 4% paraformaldehyde for 1 h at 4°C; (5) 2.5% glutaraldehyde for 1 h at 4°C. After each treatment homologous IgG was added and binding was detected by [¹²⁵I]-Protein A (20 × 10³ c.p.m. per well). (a-d) refer to the antigen-antibody system: (a) Group 1 allergen—anti Group 1 IgG; (b) *L. perenne* pollen extract—anti Group 1 IgG; (c) Antigen A—anti Antigen A IgG; (d) *L. perenne* pollen extract—anti Antigen A IgG. The histogram shows counts of [¹²⁵I]-Protein A bound and markers indicate standard error of mean of at least four replicates. For (a) and (c) treatment (5) was significantly different from the other treatments ($p = 0.01$) using a one-way analysis of variance (from Howlett *et al.*, 1981).

D'autres auteurs ont constaté une inhibition beaucoup plus forte à de faibles concentrations et pour des temps d'exposition courts.

- Les problèmes posés par la dénaturation des antigènes lors de la phase d'inclusions ont été partiellement résolus par l'utilisation de résines ne nécessitant pas de traitement à la chaleur ou aux ultra-violetts pour leur polymérisation (comme la résine JB4).
- Un autre problème est posé par la diffusion des antigènes solubles lors de la préparation des tissus. C'est pour prévenir cette diffusion que HOWLETT & Coll. ont développé une méthode où la fixation par congélation, suivie rapidement de l'inclusion à basse température des tissus en résine JB4, dans un environnement non aqueux, a permis la localisation des glycoprotéines hydrosolubles du pollen de *Lolium perenne*. La méthode a été appliquée avec succès à la localisation par immunofluorescence (HOWLETT & Coll. 1981), mais elle a aussi été adaptée aux observations en microscopie électronique avec marquage à la Ferritine (VITHANAGE & Coll. 1980). Le succès de l'application de cette méthode ouvre la voie pour son adaptation à d'autres systèmes végétaux.

III - ROLE DES ANTIGENES DE SURFACE DANS LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE -

L'implication des antigènes de surface dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire chez les végétaux a été révélée par un certain nombre d'observations. CLARKE et KNOX (1978) ont dressé un bilan de l'état des connaissances concernant la reconnaissance cellulaire chez les plantes à fleurs, où ils passent en revue un certain nombre de situations dans lesquelles des mécanismes de reconnaissance sont impliqués (reconnaissance greffon-sujet, plante-pathogène, plante-parasite, plante-symbionte, pollen-stigmate). Ils discutent en particulier les bases moléculaires de la reconnaissance cellulaire et présentent alors différentes observations montrant que les antigènes sont des médiateurs probables de la reconnaissance cellulaire:

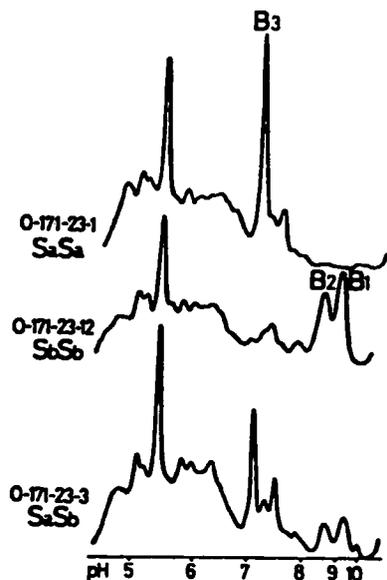
" Les preuves les plus convaincantes de la nature antigénique des molécules de reconnaissance ont été apportées par les études immunologiques des pollens et stigmates dans les systèmes "d'incompatibilité" (CLARKE et KNOX 1978).

Nous avons vu que la présence d'antigènes dans les extraits polliniques et les extraits stigmatiques a pu être montrée chez de nombreuses espèces, et que ces antigènes ont dans certains cas pu être localisés. Nous allons montrer sur quelques exemples comment certains travaux ont permis d'établir la corrélation entre ces molécules antigéniques et les problèmes de reconnaissance pollen-stigmate.

• Corrélation antigène-allèle S -

Des études génétiques ont révélées que l'auto-incompatibilité chez les crucifères est caractérisée par un contrôle sporophytique (inhibition de la pénétration du tube pollinique dans le stigmate) des allèles multiples du locus S. La surface stigmatique est considérée comme le site de reconnaissance entre pollen et pistil. HINATA et NISHIO (1978) ont mis en évidence les corrélations entre les allèles S et des protéines stigmatiques chez les différentes familles de Brassicaceae oleracea et Brassicaceae campestris en utilisant des individus de géotypes S différents. Les protéines stigmatiques des différents individus ont été analysées par focalisation isoélectrique et les géotypes S ont été déterminés par l'étude de la pénétration des tubes polliniques dans les stigmates.

Pollen Stigma	$S_a S_a$							$S_b S_b$		$S_a S_b$											bands				
	1	6	10	11	13	16	17	9	12	2	3	4	8	14	15	19	20	5	7	18	P	B ₁	B ₂	B ₃	
1	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
6	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
10	-	±	-	-	+	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
11	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
13	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
16	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
17	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.	.	†
9	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
12	++	++	+	+	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
5	-	±	-	-	-	-	-	+++*	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
7	-	-	-	-	-	-	-	±*	±*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
18	-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	†	†	†



HINATA et NISHIO
1978

FIG. 1.—Data of the diallel pollinations in family, O-171-23 (fig. 1a, left) and the presence (†) or absence (.) of differential bands in each plant (fig. 1a, right), and the densitometries of the stained gels of representative plants (fig. 1b). Score ++, abundant pollen tubes penetrating; +, many pollen tubes penetrating but some failed; ±, <20 pollen tubes penetrating; -, <5 or no pollen tubes penetrating. S-genotypes ($S_a S_a$, $S_b S_b$, etc.) were assigned to the plants of each mating group assuming a 1-locus sporophytic system with co-dominance. * are exceptional cases where S_a is dominant to S_b in stigmas only. P denotes the parent plant vegetatively propagated.

Ainsi, dans la famille O-171-23, ils ont ou montrer que tous les homozygotes $S_a S_a$ présentaient la bande protéique B₃, les homozygotes $S_b S_b$ les deux bandes B₁ et B₂, et les hétérozygotes $S_a S_b$ les trois bandes. Ils ont ainsi démontré que parmi ces glycoprotéines (les trois bandes sont PAS-positives), la glycoprotéine B₃ est associée à l'allèle S_a et les glycoprotéines B₁ et B₂ à l'allèle S_b . Ils ont aussi constaté qu'en moyenne, pour chaque bande, la teneur en protéines est significativement plus élevée pour les homozygotes que pour les hétérozygotes. Treize allèles ont été analysées et une corrélation allèle S-protéine a été trouvée pour sept de ces allèles, suggérant que ces glycoprotéines pourraient être les produits des allèles S et auraient donc un rôle dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire.

NISHIO et HINATA (1980) confirment ces résultats dans des travaux ultérieurs, où ils montrent que ces glycoprotéines S spécifiques ont la capacité de se lier à la Concanavaline A, ce qui suggère la présence de manose ou de glucose parmi les composants polysaccharidiques de ces glycoprotéines. Ils proposent d'ailleurs d'utiliser la réaction de liaison avec la Con A marquée au fluorochrome FITC pour la détection rapide des bandes glycoprotéiques. Dans la mesure où il y a corrélation entre bande glycoprotéique et allèle S, on dispose ici d'un moyen simple et rapide pour la détermination du génotype.

L'étude immunologique (méthode de double diffusion d'Ouchterlony) des extraits stigmatiques de différents génotypes homozygotes de Brassicae oleracea a été menée par NASRALLAH (1979) afin de définir les relations immunologiques entre les différents antigènes S spécifiques. Les résultats confirment une corrélation antigène-allèle S et montrent curieusement qu'aucune réactivité croisée n'est observée entre les différents antigènes stigmatiques et qu'aucun antigène S n'est détectable chez le pollen. Ces résultats l'amènent à formuler une nouvelle hypothèse sur les mécanismes d'incompatibilité qu'il se propose de tester dans des travaux ultérieurs. Il souligne l'intérêt qu'il y aurait à identifier et caractériser les antigènes concernés.

• Action biologique des antigènes S spécifiques -

- Action des antigènes stigmatiques :

FERRARI & Coll. (1981) ont isolé et caractérisé une glycoprotéine (antigène S2) des stigmates de Brassicae oleracea de génotype S2S2 et ont mis en évidence son rôle dans le contrôle de la reconnaissance cellulaire en testant son activité biologique. Des pollens de quatre génotypes différents, prétraités avec l'antigène S2 ont été appliqués in situ à des stigmates de génotypes S différents et la pénétration des tubes polliniques a été étudiée. (voir tableau page suivante).

Les pollens S2S2 traités avec l'antigène S2 deviennent incompatibles pour les stigmates avec lesquels ils sont normalement compatibles. Par contre, les autres pollens ne sont pas affectés par le traitement à l'antigène S2. L'induction de l'incompatibilité par l'antigène S2 est spécifique du pollen contenant l'allèle S2.

Table II. Effect of Purified S₂ Antigen on (In)Compatibility Relationships of Pollen

Pollen was treated in the dry state with purified S₂ antigen and then applied to stigmas of the indicated S-allele genotypes. Twenty to 24 h later, pistils were collected and pollen tube penetration through the stigma was determined. Incompatible pollinations did not have more than three tubes present in stilar tissues; compatible pollinations resulted in more than 50 tubes.

Pollen Genotype	± S ₂ Antigen	(In)Compatibility Relationship with Stigma Genotype ^a					
		S ₂ S ₂	S ₂ S ₃	S ₂ S ₅	S ₂ S ₆	S ₂ S ₄ ^b	S ₂ S ₂ (bud) ^c
S ₂ S ₂	-	I	C	-	C	C	C
	+	I	I	-	I	I	I
S ₂ S ₃	-	C	I	C	C	-	C
	+	C	I	C	C	-	C
S ₂ S ₅	-	C	-	-	I	-	-
	+	C	-	-	I	-	-
S ₂ S ₄	-	I	-	-	-	I	-
	+	I	-	-	-	I	-

^a -, pollination not performed; C, compatible pollination; I, incompatible pollination.

^b S₄ is dominant over S₂ only in the stigma of this genotype, i.e. activity of the S₂ allele is not expressed (recessive) in the stigma. S₂ and S₄ are both expressed (codominant) in the pollen.

^c Immature flower buds are self-compatible. The stigma was exposed for pollination by surgically removing sepals, petals, and immature anthers. Stigmas not from buds were from mature flowers with strong self-incompatibility.

FERRARI J. coll 1981

Pour essayer d'éclairer ses mécanismes d'action, ils ont testé les effets de l'antigène S₂ sur la synthèse protéique des grains de pollen, mais ont montré que l'inhibition de la synthèse protéique observée avec les extraits stigmatiques bruts était probablement due à des substances autres que l'antigène S₂.

- Action des antigènes polliniques :

Dans les travaux de VITHANAGE et HESLOP-HARRISON (1979), des stigmates frais non pollinisés de Secale cereale sont immergés pendant des temps variables dans une solution de protéines polliniques marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine. Après 10 minutes de contact des protéines fluorescentes sont détectées à la surface stigmatique, puis après 3 heures l'extrémité de la papille est fortement fluorescente. Après 24 heures, le cytoplasme des cellules de la papille est fluorescent. Les protéines polliniques peuvent donc pénétrer à l'intérieur des cellules du stigmate, fait important dans la compréhension des réponses de ces cellules stigmatiques à la pollinisation.

- Action des antigènes stylaires :

Chez Prunus avium, l'auto-incompatibilité est caractérisée par un contrôle gamétophytique du gène S multiallélique, c'est à dire que les grains de pollen incompatibles s'hydratent, germent et pénètrent dans le stigmate, mais la croissance du tube pollini-

que est stoppée au niveau du style.

WILLIAMS & Coll. (1982) ont testé l'action inhibitrice sur la croissance du tube pollinique de différents composants qui avaient été isolés des styles de Prunus avium (génotype S3S4) et caractérisés lors de travaux antérieurs (MAU & Coll. 1982)

(cf. Fig. p4)

Table 1. Effect of components of *P. avium* cv. Napoleon (S₃S₄) styles and other macromolecules on in vitro growth of Napoleon pollen tubes

Treatment	Pollen-tube growth ^a (cyc-piece units ± SD)	Actual pollen-tube length (mm)	Inhibition (%)	Characteristics of test molecules			
				Classification	MW	pI	Reference
Control (water)	57 ± 2	0.72					
<i>Style components</i>							
Antigen S (20 µg/ml)	20 ± 1	0.25	65	Glycoprotein(s)?	32,000	10.6	Mau et al. 1982
Antigen P (20 µg/ml)	54 ± 2	0.68	5	Glycoprotein	37,000	4.5	Mau et al. 1982
"High MW glycoprotein" (100 µg/ml)	56 ± 2	0.60	2	Glycoprotein(s)?	>90,000	?	Mau et al. 1982
"Uronic-acid-containing fraction" (100 µg/ml)	52 ± 1	0.66	8	Contains uronic acid, incompletely characterized	<15,000	?	Mau et al. 1982
<i>Macromolecules from other sources</i>							
Arabinogalactan protein (1 mg/ml)	58 ± 1	0	-1	Proteoglycan	~150,000	?	Gleeson and Clarke 1979
Calf thymus histone (20 µg/ml)	53 ± 1	0.67	7	"Arginine-rich" protein	~10,000	8.5	Mauritzen et al. 1967
Bovine serum albumin (20 µg/ml)	56 ± 1	0.71	2	Protein	68,000	4.9	^a ^b
Cytochrome C (20 µg/ml)	61 ± 1	0.77	-7	Protein	13,370	10.5	^b
Ovalbumin (20 µg/ml)	63 ± 1	0.79	-10	Glycoprotein	45,000	4.6	^b
Thyroglobulin (20 µg/ml)	53 ± 1	0.67	7	Glycoprotein	650,000	4.6	^b

^a Forty pollen tubes were counted in each test. Tests were repeated on four separate occasions using different batches of spored pollen, with closely similar results to those quoted

^b Data from CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd edn., Fasman G.D., ed., CRC Press, Cleveland 1975, and The proteins: chemistry, biological activity and methods, Neurath, H., Bailey, K., eds. Academic Press, New York 1953

Parmi toutes les substances testées, seule la préparation antigène S a un effet inhibiteur marqué, le taux d'inhibition étant fonction de la concentration en antigènes S. Cette action inhibitrice suggère l'idée que l'antigène S pourrait être un produit du gène S. Une telle hypothèse doit être confirmée par des études complémentaires (spécificité de l'inhibition; séparation des deux composants présents dans la préparation antigénique S -(seraient-ils les deux produits des allèles S3 et S4?)-...)

CONCLUSION -

Nous avons vu comment est abordée l'étude des molécules antigéniques qui interviennent dans les mécanismes de reconnaissance cellulaire.

Aux méthodes conventionnelles d'analyses physico-chimiques et cytologiques se sont relativement récemment ajoutées des techniques immunologiques.

L'application aux végétaux de ces méthodes initialement développées chez les animaux a nécessité d'adapter les techniques au matériel végétal et à ses caractéristiques spécifiques. En particulier l'immunocytochimie a du faire face à différents problèmes : (autofluorescence, paroi pectino-cellulosique, liaisons non-spécifiques, grande mobilité des antigènes solubles,...) et de nouveaux protocoles ont été développés pour limiter les résultats falsifiés.

Des problèmes subsistent, en particulier celui de la spécificité des liaisons antigènes-anticorps. Face à ce problème, un grand espoir est apporté par la technique des anticorps monoclonaux qui devrait ouvrir de nouvelles perspectives. Le perfectionnement des méthodes devrait permettre d'atteindre dans l'avenir encore plus de précision, à la fois aux niveaux qualitatif et quantitatif.

Néanmoins, les méthodes d'investigation disponibles ont permis aux chercheurs d'isoler un bon nombre de molécules antigéniques qui ont pu être caractérisées et dans certains cas localisées. On notera que les travaux à ce niveau se sont surtout développés pour les antigènes polliniques, qui intéressent la biologie végétale dans le but d'obtenir une meilleure maîtrise de la reproduction (amélioration des plantes), mais aussi la recherche médicale, puisque de nombreux antigènes polliniques sont des allergènes.

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence l'implication des antigènes dans les processus de reconnaissance cellulaire, mais les observations restent ponctuelles, et il s'agit plutôt d'une accumulation d'indices que de preuves explicatives. Néanmoins des hypothèses sont soulevées, et les études ultérieures devraient permettre de proposer des réponses éclairant les mécanismes mis en jeu.

B I B L I O G R A P H I E

- BERGER P.H., TOLER R.W. (1983) - Quantitative immunoelectrophoresis of Panicum Mosaic Virus and Strains of S^t. Augustine decline
Phytopathol. 73 (3) : 185-189
- CLARKE A.E., KNOX R.B. (1978) - Cell recognition in flowering plants.
Quart.Rev. Biol. 53 : 3-28
- EKRAMODDOULLAH A.K.M., KISIL F.T., SEHON A.M. (1983) - Immunochemical characterization of a high molecular weight basic allergen (HMBA) of rye-grass (Lolium perenne) pollen.
Molecular Immunol. 20 (4) : 465-473
- FERRARI T.E., BRUNS D., WALLACE D.H. (1981) - Isolation of a plant glycoprotein involved with control of intercellular recognition
Plant Physiol. 67 : 270-277
- HESLOP-HARRISON J. (1978) - Recognition and response in the pollen-stigma interaction
In : SEB symposium XXXII : cell-cell recognition - Ed. Curtis A.S.G., Cambridge University Press.
- HINATA K., NISHIO T. (1978) - S-allele specificity of stigma proteins in Brassica oleracea and B. campestris
Heredity 41 (1) : 93-100
- HOWLETT B.J., CLARKE A.E. (1981) - Isolation and partial characterization of two antigenic glycoproteins from rye-grass (Lolium perenne) pollen
Biochem. J. 197 : 695-706
- HOWLETT B.J., CLARKE A.E. (1981) - Role of carbohydrate as an antigenic determinant of a glycoprotein from rye-grass (Lolium perenne) pollen
Biochem. J. 197 : 707-714
- HOWLETT B.J., VITHANAGE H.I.M.V., KNOX R.B. (1981) - Immunofluorescent localization of two water-soluble glycoproteins including the major allergen from the pollen of rye-grass (Lolium perenne)
Histochem. J. 13 : 461-480
- HUSSAIN R., NORMAN P.S., MARSH D.G. (1981) - Rapidly released allergens from short ragweed pollen : II Identification and partial purification
J. Allergy Clin. Immunol. 67 (3) : 217-222

- KARLSTAM B., NILSSON B. (1982) - Characterization of grass pollen allergens by affinity chromatography on Concanavalin A-Sepharose
J. Immunol. Methods 54 : 119-128
- KNOX R.B. (1982) - Methods for locating and identifying antigens in plant tissues
in : "Immunocytochemistry" Ed. Bullock G. et Petrusz P., Academic Press, London - Vol. 1 : 205-238
- KNOX R.B., VITHANAGE H.I.M.V., HOWLETT B.J. (1980) - Botanical immunocytochemistry : a review with special reference to pollen antigens and allergens
Histochem. J. 12 : 247-272
- LEE Y.S., DICKINSON D.B. (1979) - Characterization of pollen antigens from Ambrosia l. (compositae) and related taxa by immunoelectrophoresis and radial immunodiffusion
Amer. J. Bot. 66(3) : 245-252
- LOWENSTEIN H., MARSH D.G. (1981) - Antigens of Ambrosia elatior (short ragweed) pollen : I Crossed immunoelectrophoretic analyses
J. Immunol. 126 (3) : 943-948
- LOWENSTEIN H., KING T.P., GOODFRIEND L., HUSSAIN R., ROEBBER M., MARSH D.G. (1981) - Antigens of Ambrosia elatior (short ragweed) pollen : II Immunochemical identification of known antigens by quantitative electrophoresis
J. Immunol. 127 (2) : 637-642
- MAU S.L., RAFF J., CLARKE A.E. (1982) - Isolation and partial characterization of components of Prunus avium L. styles, including an antigenic glycoprotein associated with a self-incompatibility genotype
Planta 156 : 505-516
- NASRALLAH M.E. (1979) - Self-incompatibility antigens and S gene expression in Brassica
Heredity 43 (2) : 259-263
- NISHIO T., HINATA K. (1980) - Rapid detection of S-glycoproteins of self-incompatible crucifers using Con-A reaction.
Euphytica 29 : 217-221
- VIANDER M., FRAKI J., DJUPSUND B.M., LAINE S. (1979) - Antigens and Allergens in birch pollen extract
Allergy 34 : 289-302

- VIK H., ELSAYED S., APOLD J. (1983) - Comparative studies on tree pollen allergens V : Immunochemical mapping of the antigens and allergens of birch pollen extract (Betula verrucosa)
Int. Archs Allergy appl. Immun. 71 : 40-46
- VITHANAGE H.I.M.V., HESLOP-HARRISON J. (1979) - The pollen-stigma interaction : Fate of fluorescent labelled pollen wall proteins on the stigma surface in rye (secale cereale) - Short communication
Ann. Bot. 43 : 113-114
- VITHANAGE H.I.M.V., HOWLETT B.J., KNOX R.B. (1980) - Localization of grass pollen allergen by immunocytochemistry
Micron 11 : 411-412
- YASUEDA H., YUI Y., SHIMIZU T., SHIDA T. (1983) - Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (Cryptomeria japonica) pollen
J. Allergy Clin. Immunol. 71 (1) : 77-86

