

Zeitschrift: Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société
Band: 34 (1981)

Artikel: Agglutination des protoplastes d'épinard et de tabac : par les sérums de différentes espèces de vertébrés
Autor: Bernardini, Nicola / Greppin, Hubert
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-740062>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 07.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Séance du 30 avril 1981

AGGLUTINATION DES PROTOPLASTES
D'ÉPINARD ET DE TABAC
PAR LES SÉRUMS DE DIFFÉRENTES ESPÈCES
DE VERTÉBRÉS

PAR

Nicola BERNARDINI¹ et Hubert GREPPIN¹

ABSTRACT

Normal sera of different species of vertebrates, including man, a bird and an amphibian, can cause the agglutination of spinach and tobacco leaf protoplasts. Sera from different donors show an intraspecific and possibly an interspecific variation in their capacity to agglutinate both types of protoplasts, tobacco protoplasts being always agglutinated to a higher degree than spinach protoplasts. Agglutinating factors already exist in foetal calf serum; they are found in all blood groups of the human ABO system and their level is independent of the sexe of the donor. The immunization of rabbits by the injection of an aqueous spinach leaf extract results in a shift towards higher values of the agglutinating titre of the sera for either spinach or tobacco protoplasts. Compared to the normal serum from the same animal, the immune serum agglutinates both types of protoplasts to a higher degree at most of the dilutions, except the first ($\frac{1}{4}$) and sometimes the second one ($\frac{1}{8}$). In these two cases the degree of protoplast agglutination observed is lower than that caused by the normal serum, possibly as a consequence of an inhibition of the agglutination resulting from an excess of the serum agglutinating factors, including the newly formed antibodies.

Au cours de ces dernières années des informations contradictoires sont parues au sujet des réactions d'agglutination, provoquées par les sérums et les immun-sérums de lapin, sur les protoplastes de certaines plantes.

Une interaction entre un ou plusieurs constituants du sérum de lapin non-immunisé et les membranes végétales a été constatée par Billecoq et coll. [1]; ces auteurs ont observé que, avant toute immunisation, le sérum de lapin agglutine les chloroplastes d'épinard par l'action d'« anticorps naturels » contre des « antigènes », situés dans la membrane limitante de ces organites.

Selon un rapport subséquent de Hartmann et coll. [2], le sérum de lapin non-immunisé ne provoque pas l'agglutination des protoplastes de différentes espèces végétales et apparemment ne présente pas, envers le plasmalemme des protoplastes,

¹ Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Genève. 3, place de l'Université. CH-1211 GENÈVE 4.

le même comportement qu'envers la membrane externe chloroplastidiale. Par contre, selon ces auteurs, l'immunisation des lapins par l'injection de protoplastes de l'une ou l'autre de ces plantes provoque l'apparition dans les sérums d'anticorps qui agglutinent les protoplastes de ces différentes espèces par des réactions homologues et hétérologues dont l'intensité n'indique pas une spécificité particulière.

Les résultats présentés par Strobel et Hess [3] semblent aussi démontrer qu'il est possible d'utiliser le sérum de lapin pour des réactions d'agglutination d'origine immunitaire. Ces auteurs utilisent la fraction des globulines de sérums et d'immunsérums précipitée par $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à 50% de saturation. Ils décrivent l'agglutination des protoplastes de canne à sucre par une solution de cette fraction sérique, pour autant que le lapin ait été immunisé par l'injection d'une protéine spécifique.

Larkin [4] obtient des résultats qui contredisent aussi bien ceux de Hartmann et coll. que ceux de Strobel et Hess. Il soutient que, d'après ses observations, le sérum de lapin ainsi que celui d'autres mammifères, aussi bien euthériens que métabathériens, possède, avant toute immunisation, un ou plusieurs composants non identifiés provoquant (parfois de façon irrégulière) l'agglutination des protoplastes de différentes espèces végétales. D'autre part, ce ou ces facteurs d'agglutination sont précipités avec d'autres globulines, à partir du sérum de chat non-immunisé, au moyen de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à 45% de saturation. En outre cet auteur affirme que l'immunisation du lapin par les protoplastes de tabac, effectuée soit par voie intraveineuse, selon la technique de Hartmann et coll. [2], soit par voie intrapéritonéale (avec adjuvant complet de Freund) et sous-cutanée ou intra-musculaire, n'influence pas ou influence de manière négative le pouvoir d'agglutination du sérum envers les protoplastes de tabac.

Dans le présent travail nous avons comparé, par la méthode des dilutions sériées, le pouvoir d'agglutination des sérums non-immunisés de plusieurs espèces de vertébrés sur les protoplastes d'épinard (*Spinacia oleracea*) et de tabac (*Nicotiana tabacum*). Pour certaines de ces espèces les essais ont porté sur les sérums de plusieurs donneurs, afin d'étudier la variation de la teneur en facteur(s) d'agglutination à l'intérieur d'une même espèce. Nous avons également réexaminé l'effet de l'immunisation sur le pouvoir d'agglutination du sérum de lapin vis-à-vis des protoplastes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolation des protoplastes des feuilles d'épinard et de tabac

Les plantes ont été cultivées et les protoplastes ont été isolés comme précédemment décrit [5]. Les protoplastes prêts à l'utilisation ont été mis en suspension à une concentration d'environ $5 \times 10^5/\text{ml}$ dans une solution de pH 7,2 composée de Tris-HCl 50 mM, MgSO_4 40 mM et respectivement NaCl 335 mM pour l'épinard et

310 mM pour le tabac. Aux osmolarités de ces solutions les protoplastes sont stables; ils ont au microscope optique un contour net et tendu et supportent sans éclater une agitation modérée.

Préparation des sérums

Les sérums frais ont été préparés en laissant coaguler le sang entre 4 et 5 heures à température ambiante. Après élimination du caillot ils sont centrifugés pendant 10 min. à $3000 \times g$ pour éliminer les hématies résiduelles puis chauffés 30 min. à $56^\circ C$ pour inactiver le complément [2]; ils sont conservés à $-25^\circ C$ jusqu'à utilisation.

Après chauffage quelques échantillons ont été lyophilisés et ensuite reconstitués avec de l'eau distillée. Plusieurs essais nous ont montré que les sérums reconstitués ont le même pouvoir d'agglutination que leurs contreparties congelées. Les sérums lyophilisés obtenus commercialement de Nordic Immunology (Londres) ont été reconstitués avec de l'eau distillée, chauffés 30 min. à $56^\circ C$ et utilisés immédiatement ou après congélation.

L'osmolarité de tous les sérums, frais ou reconstitués, a été considérée égale à celle d'une solution de NaCl 150 mM. En conséquence, dans la majorité des cas, l'osmolarité des sérums a été ajustée à celle des suspensions de protoplastes en ajoutant aux sérums un volume égal d'une solution d'ajustage de pH 7,2 composée de Tris-HCl 100 mM, de $MgSO_4$ 80 mM et de NaCl, 520 mM pour les sérums utilisés pour l'épinard et 470 mM pour ceux utilisés pour le tabac. L'ajustage de l'osmolarité par cette méthode s'obtient par une dilution du sérum de $\frac{1}{2}$; il s'ensuit que la plus faible dilution de sérum utilisée après mélange v/v avec la suspension de protoplastes est de $\frac{1}{4}$. Des dilutions finales de $\frac{1}{2}$ ont été parfois utilisées en ajoutant au sérum lyophilisé un volume égal à celui de départ d'une solution d'ajustage d'une concentration appropriée en sels. La lyophilisation permet d'obtenir aussi des concentrations finales du sérum supérieures à celles du sérum non dilué.

Une fois l'osmolarité d'un sérum ajustée, toutes les autres dilutions sériées v/v ont été effectuées avec les mêmes solutions que celles utilisées pour les suspensions de protoplastes.

Préparation de l'extrait antigénique

L'extrait antigénique de feuille d'épinard a été préparé et concentré, selon la méthode précédemment décrite [6], à partir de feuilles de plantes cultivées dans les mêmes conditions que pour l'obtention des protoplastes. Pendant sa préparation cet extrait a été débarrassé des débris cellulaires et d'un grand nombre de chloroplastes, gardés intacts grâce à l'osmolarité élevée du milieu d'extraction, par centrifugation pendant 10 min à $10\,000 \times g$. Vu le temps relativement court et la faible vitesse de centrifugation, cet extrait, outre les protéines cytoplasmiques solubles, doit contenir différentes fractions membranaires.

Préparation des sérums et des immunsérums de lapin

Nous avons utilisé quatre lapins dont les sérums, testés contre l'extrait antigénique d'épinard par la méthode d'Ouchterlony [7] appliquée comme précédemment décrit [6], ne montraient pas d'arcs d'immunoprécipitation.

Deux animaux numérotés 1 et 3 ont été soumis à l'immunisation par l'extrait antigénique d'épinard tandis que les deux autres numérotés 2 et 4 n'ont subi aucun traitement. Le sang de ces animaux a été prélevé à plusieurs reprises de la veine externe de l'oreille et les sérums ont été préparés comme déjà décrit.

Tous les animaux ont été saignés 30 jours avant le début du programme d'immunisation et encore une fois le jour même de son commencement. Les sérums non-immunisés, ainsi obtenus, sont désignés par les sigles $SN_x(I)$ et $SN_x(II)$, les numéros romains indiquant l'ordre chronologique des prélèvements et la lettre x représentant le numéro du donneur. Les lapins 2 et 4 ont été saignés une troisième et dernière fois 30 jours après le début de la procédure d'immunisation, les sérums non-immunisés récoltés étant désignés respectivement $SN_2(III)$ et $SN_4(III)$.

Au deuxième prélèvement de sang l'immunisation des animaux 1 et 3 a débuté selon le programme suivant:

- au 1^{er} jour, une injection intramusculaire de 2 ml d'extrait antigénique d'épinard contenant 20 mg/ml de protéines solubles émulsionné avec 2 ml d'adjuvant complet de Freund;
- au 30^e jour, une injection par voie sous-cutanée d'1 ml du même extrait émulsionné avec 1 ml d'adjuvant incomplet de Freund;
- au 40^e jour, une injection par voie sous-cutanée d'1 ml du même extrait sans adjuvant.

Des échantillons de sang ont été prélevés au moment de la 2^e et de la 3^e injection, ainsi que 7 jours après cette dernière et les sérums obtenus au cours de l'immunisation ont été désignés respectivement: $SI_1(III)$, $SI_1(IV)$ et $SI_1(V)$ pour l'animal 1 et $SI_3(III)$, $SI_3(IV)$ et $SI_3(V)$ pour l'animal 3.

Techniques immunologiques

L'apparition d'anticorps contre les antigènes solubles de l'extrait de feuille d'épinard a été détectée par la technique d'immunoélectrophorèse, appliquée selon des modalités précédemment décrites [6].

Tests d'agglutination

Les tests d'agglutination ont été effectués en chambre humide, à température ambiante, dans des puits découpés dans des gels d'agar 2% isoosmolaires avec la suspension de protoplastes [5]. Pour chaque dilution de sérum testé, 4 gouttes ont

été mélangées dans un puits avec 4 gouttes de la suspension de protoplastes. Pour chaque sérum 7 dilutions sériées v/v, allant de $\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{256}$ ont été testées. Le degré d'agglutination a été déterminé à l'œil nu et au microscope (grossissement 40 fois), après 60 min. à température ambiante et agitation toutes les 15 min.

Le degré d'agglutination a été évalué selon une échelle subjective allant de 1 à 5 établie d'après le double critère de la proportion de protoplastes liés en agrégats et du volume et du nombre de ceux-ci [5]. Les numéros 4 et 5 correspondent à une agglutination de 90% ou plus des protoplastes en gros agrégats, mais pour le numéro 5 la grande taille de ceux-ci en réduit le nombre à 20 ou moins par puits. Les signes + et - sont utilisés pour indiquer les degrés intermédiaires entre les valeurs entières de l'échelle.

Chaque expérience d'agglutination a été répétée trois fois en effectuant la totalité des essais indiqués de façon à tester tous les sérums en même temps sur un même lot de protoplastes fraîchement préparés.

Le titre d'agglutination d'un sérum est défini comme le dénominateur de la fraction de un qui représente la plus forte dilution v/v à laquelle l'agglutination des protoplastes est encore facilement détectable (degré d'agglutination ≥ 1). Nous avons choisi d'exprimer le titre par le nombre de dilutions sériées v/v nécessaires pour obtenir cette dilution. Ce chiffre correspond au logarithme en base 2 du titre du sérum qui peut donc être obtenu en élevant 2 à une puissance égale à ce chiffre.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. Comparaison interspécifique et intraspécifique du pouvoir d'agglutination des sérums de différents vertébrés

Les résultats de cette expérience sont résumés dans la table 1. Il apparaît que les sérums d'un relativement grand nombre d'espèces de vertébrés contiennent, à la dilution finale de $\frac{1}{4}$, une quantité suffisante d'un ou peut-être plusieurs facteurs capables d'agglutiner les protoplastes de tabac et assez souvent aussi ceux d'épinard; mais à cette dilution les sérums de certains individus donnent des résultats négatifs tant avec le tabac qu'avec l'épinard. Cependant une réaction négative n'implique pas nécessairement qu'il y ait absence dans un sérum du ou des facteurs d'agglutination, mais simplement qu'à la dilution utilisée leur concentration est trop faible pour la provoquer. Chez toutes les espèces dont on a testé le sérum de plusieurs individus on remarque une variabilité intraspécifique de la teneur sérique en facteurs d'agglutination. Elle peut parfois, comme chez le poulet, être très importante. Il faut néanmoins remarquer que dans ce cas, les animaux utilisés, dont le sérum avait un fort pouvoir d'agglutination, provenaient d'un même élevage, alors

Table 1

AGGLUTINATION DES PROTOPLASTES D'EPINARD ET DE TABAC
PAR LES SERUMS DE DIFFERENTES ESPECES ANIMALES

ESPECE	DONNEUR	DEGRE D'AGGL. EPINARD Formule †	DEGRE D'AGGL. TABAC Formule †	TITRE++ ANTI-EPINARD	TITRE++ ANTI-TABAC
SINGE (L*)	1	2 ⁺ ,0	4,3,2,1,0	2	5
BREBIS (L)	1	3 ⁺ ,3,2,1,0	5,5,5,4,3,1,0	5	7
	2	3,3,2,1,0	3,3,3,2,2,1,0	5	7
RAT (L)	1	0	0	-	-
	2	0	3,3,2,1,0	-	5
RAT (F*)	1	0	1 ⁺ ,0	-	2
	2	0	3 ⁺ ,2,1,0	-	4
	3	0	2 ⁺ ,0	-	2
	4	0	1,1,0	-	3
	5	0	1 ⁺ ,0	-	2
COBAYE (L)	1	0	0	-	-
BOEUF (L)	1	3,3,1,0	3,3,2 ⁺ ,2 ⁺ ,2,1,0	4	7
FOETUS DE VEAU (L)	1	2,2,0	3,3,2,1 ⁺ ,1,0	3	6
POULET (L)	1	0	0	-	-
POULET (F)	1	5,3 ⁺ ,1,0	5,5,4,1 ⁺ ,0	4	5
	2	5,4,2,0	5,5,3 ⁺ ,1,0	4	5
	3	5,4 ⁺ ,2,0	5,5,3,0	4	4
	4	5,5,4 ⁺ ,1 ⁺ ,0	5,5,5,3,1,0	5	6
CRAPAUD (F) (<i>Xénopus laevis</i>)	1	0	0	-	-
	2	1,1,0	2,1,0	3	3
	3	0	0	-	-
	4	0	2,1,0	-	3
	5	1 ⁺ ,1 ⁺ ,1,0	2,2,0	4	3

TABLE 1

† Les chiffres correspondent aux différents degrés d'agglutination déterminés selon l'échelle subjective d'estimation décrite dans « Matériel et méthodes ». Les signes + et - indiquent les degrés intermédiaires entre les valeurs entières de l'échelle. Le premier chiffre donne le degré d'agglutination observé pour une dilution finale du sérum de 1/4. Les autres chiffres représentent dans l'ordre les valeurs obtenues pour les dilutions sériées v/v successives.

†† Le titre d'agglutination est exprimé ici par le nombre de dilutions sériées v/v effectuées pour obtenir la plus forte dilution à laquelle l'agglutination des protoplastes est encore détectable. Le titre du sérum est obtenu en élevant 2 à une puissance égale à ce chiffre.

* L = sérum commercial lyophilisé reconstitué; F = sérum frais congelé.

que le sérum lyophilisé à pouvoir d'agglutination nul avait été obtenu commercialement. Quant à la variabilité interspécifique elle semble aussi exister, mais le nombre relativement restreint d'individus testés ne permet pas de l'affirmer avec certitude.

En règle générale, tous les sérums qu'agglutinent les protoplastes d'épinard agglutinent à un plus fort degré et/ou jusqu'à un titre plus élevé ceux du tabac (voir aussi table 2 et 3). D'autre part, beaucoup de sérums donnant des résultats négatifs avec l'épinard réagissent à un plus ou moins faible degré avec le tabac tandis que

Table 2
AGGLUTINATION DES PROTOPLASTES D'EPINARD ET DE TABAC PAR LES SERUMS HUMAINS

GROUPE SANGUIN	DONNEUR	SEXE	AGE (ANNEES)	DEGRE D'AGGL. EPINARD Formule*	DEGRE D'AGGL. TABAC Formule*	TITRE** ANTI-EPINARD	TITRE** ANTI-TABAC
A	1	f [†]	43	1,0	3,1,0	2	3
	2	m	46	1,0	3,1 [†] 0	2	3
	3	f	39	2 [†] 1,0	3 [†] 2 [†] 1,0	3	4
	4	m	47	3,2,1,0	--	4	-
	5	f	44	2,0	--	2	-
	6	--	--	1,0	--	2	-
	7	m	53	1,0	--	2	-
B	1	--	--	0	2 [†] 1 [†] 0	-	3
	2	m	44	0	2,1,0	-	3
	3	m	39	1,0	3,2,1,0	2	4
	4	f	30	1,0	--	2	-
	5	m	40	1,0	--	2	-
	6	f	66	0	--	-	-
O	1	--	--	2,1 [†] 0	3,2 [†] 2,1,0	3	5
	2	f	46	1,0	3,2 [†] 1,0	2	4
	3	m	39	3 [†] 2 [†] 1,0	4,4,2 [†] 1 [†] 1,0	4	6
	4	m	43	0	2,1,0	-	3
	5	f	26	2 [†] 1 [†] 0	--	3	-
	6	m	52	1,1 [†] 0	--	3	-
AB	1	--	--	1,0	2 [†] 2,0	2	3
	2	f	26	2 [†] 1,0	3 [†] 3,1 [†] 0	3	4
	3	f	24	2,1,0	4,3 [†] 2 [†] 0	3	4
	4	m	33	1 [†] 1 [†] 0	--	3	-

TABLE 2

* Les chiffres correspondent aux différents degrés d'agglutination déterminés selon l'échelle subjective d'estimation décrite dans « Matériel et méthodes ». Les signes + et - indiquent les degrés intermédiaires entre les valeurs entières de l'échelle. Le premier chiffre donne le degré d'agglutination observé pour une dilution finale du sérum de 1/4. Les autres chiffres représentent dans l'ordre les valeurs obtenues pour les dilutions sériées v/v successives.

** Le titre d'agglutination est exprimé ici par le nombre de dilutions sériées v/v effectuées pour obtenir la plus forte dilution à laquelle l'agglutination des protoplastes est encore détectable.

† f = femelle; m = mâle

l'inverse n'est jamais vrai. Nous ne pouvons pas donner une explication de ce phénomène, mais il faut remarquer que les protoplastes de tabac sont de taille sensiblement inférieure à ceux d'épinard et montrent une tendance à se prendre spontanément en agrégats, facilement dissociables par simple agitation.

Enfin on observe un assez fort pouvoir d'agglutination dans le sérum de fœtus de veau; ceci montre que des facteurs responsables de l'agglutination des protoplastes peuvent déjà exister avant la naissance.

Dans nos conditions d'expérience, pour un même sérum testé sur différents lots de protoplastes en bon état et suffisamment nombreux, nous avons le plus souvent obtenu la même formule d'agglutination. Les plus forts écarts enregistrés, par rapport à l'estimation la plus fréquente, ont été d'une unité, aussi bien pour les degrés d'agglutination que pour le titre. Aucune des combinaisons sérum/protoplastes des différentes espèces animales et végétales testées n'a donné, au cours de la répétition des essais, les résultats parfois positifs et parfois négatifs rapportés par Larkin [4] dans certains cas. D'autre part, celui-ci affirme que le pouvoir d'agglutination du sérum non-immunisé de lapin sur les protoplastes de tabac peut, selon les expériences, être supérieur ou inférieur à celui exercé sur les protoplastes d'autres espèces (blé ou avoine). Or, comme nous l'avons précédemment remarqué, nous avons constamment observé une plus forte agglutination des protoplastes de tabac par rapport à ceux d'épinard avec tous les sérums donnant une réaction positive, ceci étant vrai aussi pour les sérums d'homme et de lapin (tables 2 et 3). La différence des techniques utilisées et la non-identité des combinaisons testées ne suffisent peut-être pas à justifier les divergences entre nos résultats et ceux de Larkin. Une comparaison plus poussée n'est pas possible puisque, dans ce cas, cet auteur ne présente malheureusement pas des données expérimentales suffisamment explicites et complètes.

B. *Agglutination des protoplastes par les sérums humains*

Les conclusions que l'on peut tirer de cette expérience (table 2), effectuée sur un assez grand nombre d'individus d'une même espèce, coïncident avec celles déjà mentionnées pour les autres espèces testées.

Pour l'homme aucun des sérums essayé sur le tabac n'a donné des résultats négatifs, mais à la dilution de $\frac{1}{4}$ les sérums de quatre donneurs (B1, B2, B6, O4) n'ont pas agglutiné les protoplastes d'épinard. Nous avons lyophilisé deux de ces sérums, le B1 et le B6, et nous les avons reconstitués de manière à obtenir une dilution finale de $\frac{1}{2}$ au lieu de $\frac{1}{4}$. Dans ces deux cas nous avons alors observé une agglutination des protoplastes d'épinard, dont le degré était de 2 pour le sérum B1 et de 1 pour le sérum B6. Ceci montre qu'une réaction négative n'implique pas nécessairement une absence totale du ou des facteurs d'agglutination.

Les chiffres de la table 2 indiquent aussi qu'il n'existe aucune corrélation entre le sexe du donneur et le taux sérique du ou des facteurs d'agglutination, mais à

cause de l'éventail restreint des âges de la majorité des donneurs, il n'a pas été possible d'étudier l'évolution éventuelle de la concentration de ces facteurs en fonction de l'âge.

L'examen du pouvoir d'agglutination des sérums en fonction du groupe sanguin des donneurs montre que les facteurs d'agglutination sont présents chez les individus de tous les groupes sanguins du type ABO; vu le nombre relativement faible des échantillons testés, il n'est pas possible de tirer d'autres conclusions.

C. Effet de l'immunisation anti-épinard sur le pouvoir d'agglutination des sérums de lapin

L'immunisation du lapin, par les extraits de feuille d'épinard, provoque une nette augmentation du titre d'agglutination du sérum envers les protoplastes d'épinard et de tabac (table 3). Cette augmentation est corrélée à la progression de l'immunisation et à l'augmentation du taux d'anticorps anti-épinard dans le sérum du lapin (fig. 1).

Dans les sérums prélevés 10 jours après le premier rappel antigénique ($SI_1(IV)$ et $Si_3(IV)$), on constate une augmentation d'au moins deux unités dans le titre pour l'épinard et d'au moins deux unités dans le titre pour le tabac par rapport aux sérums non-immunisés. Du fait que les sérums n'ont été testés que sur sept dilutions sériées, allant de $1/4$ à $1/256$, on n'a pas pu, dans certains cas, mettre en évidence des changements de titre qui dépassaient peut-être deux unités.

La valeur des titres ne se modifie pas après le deuxième rappel antigénique dans les sérums du cinquième prélèvement, mais pour le lapin 3 on observe, par rapport au sérum de la prise précédente, une augmentation d'environ une unité dans le degré d'agglutination de toutes les dilutions employées, ce qui semble indiquer que le taux d'anticorps est encore en train de croître.

Par rapport aux sérums non-immunisés, l'immunisation provoque l'augmentation du degré d'agglutination des protoplastes de toutes les différentes dilutions, à l'exception de la première ($1/4$) et parfois de la deuxième dont les degrés d'agglutination restent inchangés ou diminuent. Ceci provoque le déplacement des maximums d'agglutination vers des plus fortes dilutions. A la première et parfois à la deuxième dilution, l'agglutination est apparemment inhibée par un excès des agents agglutinants, conformément au phénomène de zone pouvant dans ce cas être expliqué d'après la théorie dite du « réseau » de Marrack. Cette inhibition s'observe chez le tabac, qui est généralement plus réactif, seulement à partir du 4^e prélèvement, donc après le premier rappel antigénique, tandis que chez l'épinard elle est déjà observable dès le troisième prélèvement.

Nos résultats sont en complète contradiction avec ceux avancés par Larkin [4] qui n'observe jamais, après immunisation et indépendamment de la technique utilisée, une augmentation du titre des sérums ou de leur degré d'agglutination aux

Table 3

AGGLUTINATION DES PROTOPLASTES D'EPINARD ET DE TABAC PAR LES SERUMS DE LAPINS
NON IMMUNISES ET EN COURS D'IMMUNISATION ANTI-EPINARD

SERUM	DESCRIPTION	DEGRE D'AGGL. EPINARD Formule†	DEGRE D'AGGL. TABAC Formule†	DILUTIONS v/v†† CORRESPONDANT AU MAX.D'AGGL.	TITRE ANTI-EPINARD ET ANTI-TABAC
<u>LAPIN 1</u>					
SN ₁ (I)	1er prélèvement	3 ⁺ ,2,0		e* 2	e 3
	Non immunisé		5,4 ⁺ ,3,2,1,0	t* 2	t 6
SN ₁ (II)	2ème prélèvement 30 jours après 1er Non immunisé	3,2 ⁺ ,1,0	5,4 ⁺ ,3,2,1,0	e 2 t 2	e 4 t 6
	3ème prélèvement 30 jours après 2ème Immunisation en cours	3,3,2,1,0	5,5,4,2 ⁺ ,2,1,0	e 2 et 3 t 2 et 3	e 5 t 7
SI ₁ (IV)	4ème prélèvement 10 jours après 3ème Immunisation en cours	3,3 ⁺ ,3 ⁺ ,3 ⁺ ,2 ⁺ ,1	4,4 ⁺ ,4,3 ⁺ ,2 ⁺ ,2	e 3,4,5 et 6 t 3	e ≥ 8 t ≥ 8
	5ème prélèvement 7 jours après 4ème Immunisation en cours	3,3 ⁺ ,3 ⁺ ,3 ⁺ ,2 ⁺ ,1	4,4 ⁺ ,4,3 ⁺ ,2 ⁺ ,2	e 3,4,5 et 6 t 3	e ≥ 8 t ≥ 8
<u>LAPIN 2</u>					
SN ₂ (I)	1er prélèvement	3,2,1,0		e 2	e 4
	Non immunisé		5,4,3,1 ⁺ ,0	t 2	t 5
SN ₂ (II)	2ème prélèvement 30 jours après 1er Non immunisé	3,2 ⁺ ,1,0	5,4 ⁺ ,3,2,1,0	e 2 t 2	e 4 t 6
	3ème prélèvement 30 jours après 2ème Non immunisé	3,2,1,0	5,4,3,1 ⁺ ,0	e 2 t 2	e 4 t 6
<u>LAPIN 3</u>					
SN ₃ (I)	1er prélèvement	4,4,2 ⁺ ,0		e 2 et 3	e 4
	Non immunisé		5,4 ⁺ ,3,2 ⁺ ,1,0	t 2	t 6
SN ₃ (II)	2ème prélèvement 30 jours après 1er Non immunisé	4,4 ⁺ ,2 ⁺ ,0	5,5,4,3 ⁺ ,1,0	e 2 et 3 t 2 et 3	e 4 t 6
	3ème prélèvement 30 jours après 2ème Immunisation en cours	3,3 ⁺ ,2 ⁺ ,1,0	5,5,4,3 ⁺ ,2 ⁺ ,1,0	e 3 t 2 et 3	e 5 t 7
SI ₃ (IV)	4ème prélèvement 10 jours après 3ème Immunisation en cours	2,3,3 ⁺ ,3,1,1,0	3,3 ⁺ ,4,4,3 ⁺ ,2 ⁺ ,1	e 4 t 4 et 5	e 7 t ≥ 8
	5ème prélèvement 7 jours après 4ème Immunisation en cours	3,4,4 ⁺ ,4 ⁺ ,1 ⁺ ,0	4,4 ⁺ ,4 ⁺ ,4 ⁺ ,3,2	e 4 et 5 t 3,4 et 5	e 7 t ≥ 8
<u>LAPIN 4</u>					
SN ₄ (I)	1er prélèvement	2 ⁺ ,2,0		e 2	e 3
	Non immunisé		5,4,2 ⁺ ,1,0	t 2	t 5
SN ₄ (II)	2ème prélèvement 30 jours après 1er Non immunisé	2 ⁺ ,2,0	5,4,3,1 ⁺ ,0	e 2 t 2	e 3 t 5
	3ème prélèvement 30 jours après 2ème Non immunisé	2 ⁺ ,2,0	5,4,3,1 ⁺ ,0	e 2 t 2	e 3 t 5

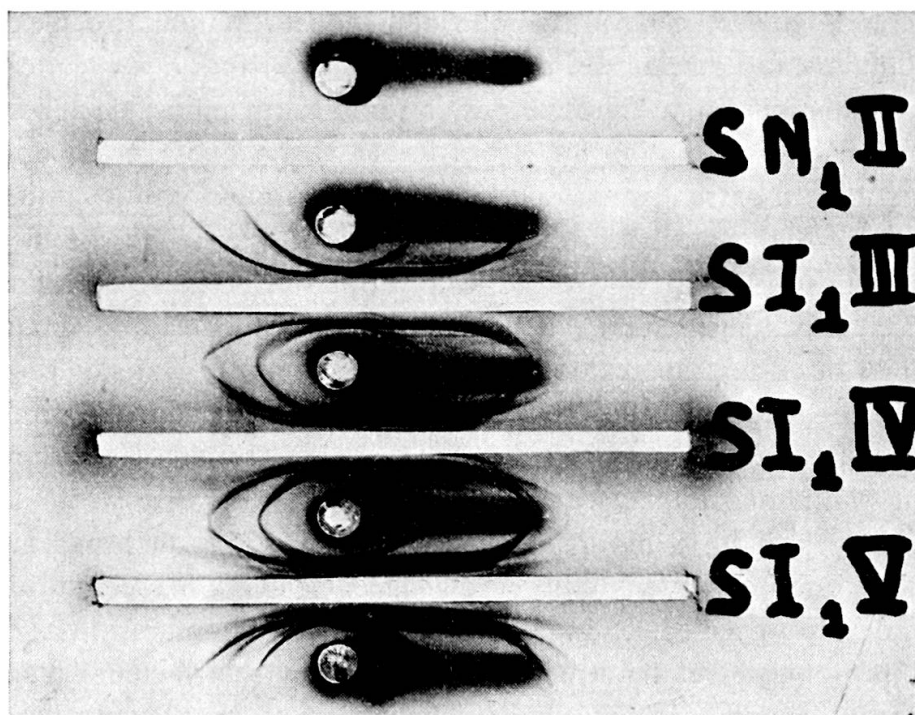


FIG. 1. — Immunoélectrophorèse de l'extrait antigénique de feuille d'épinard révélé par les sérums du lapin 1 non-immunisé et en cours d'immunisation. Les sigles en marge des rigoles indiquent le sérum utilisé: $SN_1 II$, sérum non-immunisé, immunoprécipitation nulle; $SI_1 III$, sérum à 30 jours du début de l'immunisation, réactions d'immunoprécipitation positives, mais relativement faibles (réaction primaire); $SI_1 IV$ et $SI_1 V$, sérums immunisés après rappels antigéniques, réactions d'immunoprécipitation positives indiquant un taux élevé d'anticorps (hyperimmunisation en cours). Des résultats semblables ont été obtenus pour le lapin 3.

plus faibles dilutions. Cet auteur soutient avoir parfois même remarqué une baisse dans le titre du sérum, suite à l'immunisation. Pour expliquer ces résultats on pourrait envisager un éventuel manque de réponse immunitaire de la part des animaux employés, vu que cet auteur n'a pas testé leur état d'immunisation par des tech-

←

TABLE 3

† Les chiffres correspondent aux différents degrés d'agglutination déterminés selon l'échelle subjective d'estimation décrite dans « Matériel et méthodes ». Les signes + et - indiquent les degrés intermédiaires entre les valeurs entières de l'échelle. Le premier chiffre donne le degré d'agglutination observé pour une dilution finale du sérum de $\frac{1}{4}$. Les autres chiffres représentent dans l'ordre les valeurs obtenues pour les dilutions sériées v/v successives.

†† Les chiffres représentent le nombre de dilutions sériées v/v effectuées. La dilution correspondante du sérum est obtenue en élevant $\frac{1}{2}$ à des puissances égales à ces chiffres.

† * Le titre d'agglutination est exprimé ici par le nombre de dilutions sériées v/v effectuées pour obtenir la plus forte dilution à laquelle l'agglutination des protoplastes est encore détectable.

* e = épinard; t = tabac.

niques immunologiques, mais le manque de réponse immunitaire n'explique toujours pas l'importante diminution des titres qu'il a parfois observée, car chez nos lapins non-immunisés on ne retrouve pas, au cours du temps, de telles variations dans le pouvoir d'agglutination du sérum (table 3). La question est donc ouverte.

Nos résultats montrent aussi que les effets de l'immunisation anti-épinard sur le titre et le degré d'agglutination des sérums ne sont pas d'une spécificité particulière, car ils sont tout aussi évidents sur les protoplastes de tabac que sur ceux d'épinard. Ceci n'est pas surprenant, vu le large nombre de sites antigéniques que les plasmalemmes des deux espèces doivent avoir en commun. Dans ce cas nos observations semblent recouper celles de Hartmann et coll. [2] pour les protoplastes de *Vicia* et de soja. Toutefois, au lieu d'utiliser comme témoins les sérums des donneurs avant l'immunisation, ces auteurs ont employé un sérum commercial dont le pouvoir d'agglutination nul peut éventuellement s'expliquer par la variabilité intraspécifique que nous avons mise en évidence. Ce choix inadéquat du témoin ne permet pas de distinguer entre, d'une part les effets de l'immunisation sur l'agglutination des protoplastes et d'autre part les effets dus aux facteurs d'agglutination préexistants. Vu la non-spécificité de l'augmentation du titre suite à l'immunisation anti-épinard, on ne peut pas exclure une éventuelle participation au phénomène d'anticorps produits contre l'adjuvant complet de Freund utilisé autant par nous que par Larkin. En effet l'adjuvant complet de Freund contient des mycobactéries tuées pouvant peut-être provoquer une réponse immunitaire envers des antigènes qu'elles auraient en commun avec la membrane plasmique des protoplastes. Des essais sont actuellement en cours pour tester cette éventualité.

La nature des facteurs responsables de l'agglutination des protoplastes par les sérums non-immunisés artificiellement n'a pas encore été déterminée. La faible évidence qui existe actuellement semble indiquer qu'il s'agit de macromolécules multivalentes appartenant probablement aux globulines sériques [4]. Ces macromolécules pourraient agglutiner les protoplastes soit par des réactions du type lectine-hydrate de carbone, soit par des réactions du type antigène-anticorps, ou encore par d'autres interactions d'un type inconnu.

Dans le premier cas, il faut admettre la présence de lectines [8] soit dans le sérum soit dans le plasmalemme de la cellule végétale. Les lectines du sérum auraient une affinité pour des ligands glycosidiques qui seraient exposés à la surface des protoplastes mais absents ou cachés dans les cellules du donneur. Par contre, les lectines du plasmalemme seraient typiques des cellules végétales et réagiraient avec des glycoprotéines multivalentes du sérum, ces lectines pouvant être, comme proposé par Larkin [4], des β -lectines [9].

Dans le deuxième cas, les facteurs responsables de l'agglutination des protoplastes seraient des anticorps provenant d'une immunisation naturelle contre certains antigènes présents, peut-être en quantité variable, à la surface du plasmalemme d'un grand nombre de cellules végétales.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M^{me} G. SILVESTRE pour sa collaboration technique précieuse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BILLECOCQ, A., R. DOUCE et M. FAVRE (1972). Structure des membranes biologiques. Localisation des galactosyldiglycérides dans les chloroplastes au moyen des anticorps spécifiques. *C.R. Acad. Sc. Paris* 275, série D, 1135-1137.
- [2] HARTMANN, J. X., K. N. KAO, O. L. GAMBORG and R. A. MILLER (1973). Immunological methods for the agglutination of protoplasts from cell suspension cultures of different genera. *Planta* 112, 45-56.
- [3] STROBEL, G. A. and W. M. HESS (1974). Evidence for the presence of the toxin-binding protein on the plasma membrane of sugarcane cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1413-1417.
- [4] LARKIN, P. J. (1977). Plant protoplast agglutination and membrane bound β -lectins. *J. Cell Sci.* 26, 31-46.
- [5] BERNARDINI, N. et H. GREPPIN (1979). Agglutination des protoplastes de tabac et d'épinard par différentes lectines. *Saussurea* 10, 49-59.
- [6] BALET-BURON, A. et H. GREPPIN (1976). Etude immuno-chimique de l'induction photopériodique chez *Spinacia oleracea*. *Saussurea* 7, 65-72.
- [7] OUCHTERLONY, Ö. (1962). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progress allergy* 6, 30-154.
- [8] NICOLSON, G. L. (1974). The interaction of lectines with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 39, 89-190.
- [9] JERMYN, M. A. and Y. M. YEOW (1975). A class of lectins present in the tissues of seed plants. *Aust. J. Pl. Physiol.* 2, 501-531.

