

# Protéines glycosylées de cals *in vitro* d'*Acacia senegal*. Evolution en fonction de différentes conditions de culture et au cours de stress hydriques

Isabelle Hippolyte,  
Biotechnologue

## Introduction

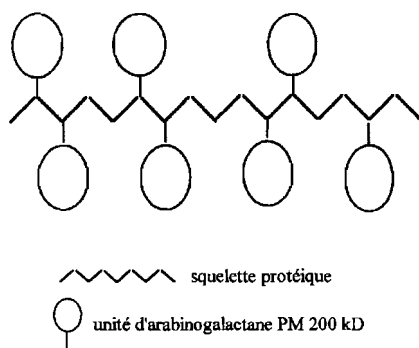
L'*Acacia senegal* exsude de la gomme arabique lorsqu'il est blessé. Cette gomme est une ArabinoGalactoProtéine (AGP\*) qui présente des caractéristiques assez stables quels que soient les individus et les provenances. La partie glycosylée présente un taux élevé de galactose, mais ne contient pas de glucose. La partie protéique est caractérisée par une forte teneur en hydroxyproline et, dans une moindre mesure, en sérine. Toutefois, les pourcentages de ces constituants peuvent varier sensiblement d'un échantillon à l'autre (Anderson et Weiping, 1990).

La gomme brute contient plusieurs fractions (Anderson et *al.*, 1966). Cette observation, ainsi que d'autres études, ont conduit à définir la

---

\* Voir liste des abréviations en fin d'article

gomme comme un hétéropolymère, correspondant à une chaîne protéique sur laquelle un nombre variable d'unités glucidiques sont greffées (Connolly *et al.*, 1987; 1988)(fig. 1). L'unité glucidique aurait un poids moléculaire (PM) d'environ 200 kDa. Les polysaccharides peuvent exister sous forme libre dans la gomme (Vandeveldt et Fenyo, 1985).



**Figure 1**  
 Structure de  
 la gomme arabique  
 (d'après Connolly  
*et al.*, 1987).

Enfin, la gomme contient une fraction de PM inférieur à l'unité basale, qui ne peut correspondre à ce modèle.

Un autre modèle présente la gomme comme un squelette protéique, constitué d'un motif de 10 à 12 acides aminés répétés. Des chaînes d'une trentaine de glucides s'attacheraient sur le squelette au niveau de l'hydroxyproline (Qi *et al.*, 1991) (fig. 2).

Si le rôle physiologique des AGPs est mal connu, leur localisation est également difficile à établir du fait de leur grande solubilité (Showalter, 1993). Il semblerait que nombre d'entre elles soient extracellulaires ou pariétales, d'autres soient membranaires. Sur des plants de tabac, on a pu mettre en évidence des AGPs vacuolaires (Hermann et Lamb, 1992).

Il est difficile d'étudier les mécanismes de production de gomme arabique sur la plante entière. En effet, la production de ce métabolite de stress semble être sous la dépendance de différents facteurs : pluviosité, situation dans la plantation, production de l'année précédente (Vassal, 1985). Au moins deux mécanismes, qui ne sont pas nécessairement liés, sont impliqués : d'une part, la synthèse de la molécule ou des molécules et, d'autre part, l'excrétion.

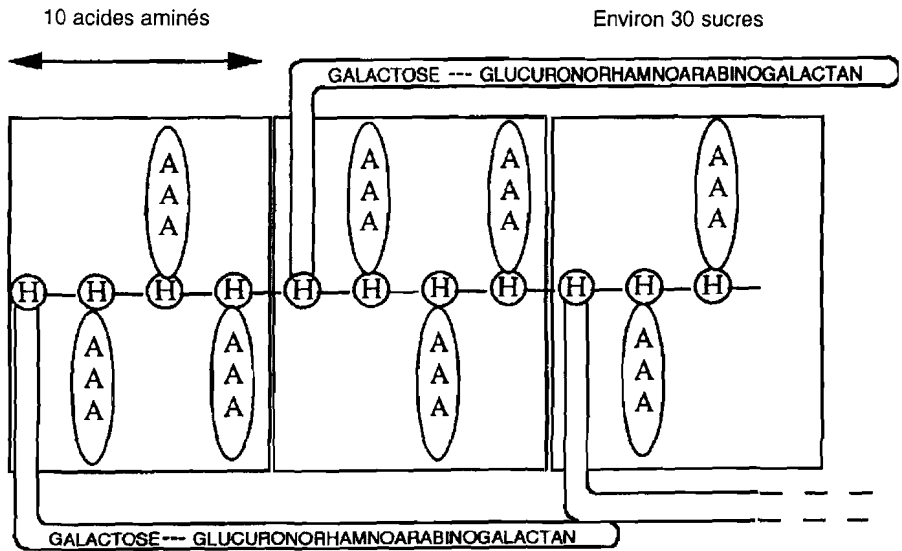


Figure 2

Modèle de la glycoprotéine de la gomme arabique (d'après Qi *et al.*, 1991).

H : hydroxyproline ; A : arabinose. Chaque bloc (7 kDa) contient 10 acides aminés (1 kDa), 30 sucres (4,4 kDa) et 1 tri-arabinose branché sur 1 hydroxyproline (1,32 kDa).

Cette dernière est liée sur la plante entière à la mise en place de canaux par lyse cellulaire (Gosh et Purkayastha, 1962).

Des essais de cultures cellulaires *in vitro* ont montré que les suspensions cellulaires d'*A. senegal* sécrétaient, dans le milieu de culture, une AGP (Mollard et Joseleau, 1994) caractérisée par une absence d'hydroxyproline et la présence de glucose, ce qui la différencie très notablement de la composition de la gomme arabique. En revanche, elle est très semblable à une AGP excrétée par des suspensions cellulaires de carotte (Baldwin *et al.*, 1993). Ainsi, les suspensions cellulaires ne paraissent pas adaptées à l'étude du métabolisme de la gomme. La différenciation morphologique et/ou biochimique n'y est pas suffisante pour l'expression des mécanismes de synthèse et d'excrétion.

Ces difficultés nous ont conduits à envisager l'étude de ce métabolisme sur des cultures tissulaires d'*A. senegal in vitro*, en portant une attention particulière aux protéines glycosylées. Nous avons

comparé nos résultats à ceux obtenus sur une gomme du commerce par les mêmes techniques analytiques. Par la suite, nous avons cultivé une de ces souches en conditions stressantes par addition de polyéthylène glycol 8000 au milieu de culture.

## Matériels et méthodes

### *Cultures de tissus in vitro*

Des cals d'*Acacia senegal* ont été initiés *in vitro* à partir de pieds mères d'une parcelle de la station ISRA-ORSTOM de Bel-air (Dakar). Les cals sont entretenus sur des milieux MS (Murashige et Skoog, 1962), additionnés des vitamines de Nitsch et *al.* (1968) et de saccharose à 30 g. l<sup>-1</sup>. Ces milieux sont solidifiés par de l'agar 9 g. l<sup>-1</sup>, le pH est ajusté à 5,6 avant autoclavage et diffèrent par leur composition hormonale (ANA/BAP, 2,4-D/Kin, BAP).

Les repiquages sont effectués toutes les 4 semaines.

### *Cultures en conditions stressantes*

Nous avons ajouté au milieu initial, contenant de l'ANA 5,4 µm et la BAP 4,4 µm, différentes concentrations en PEG 8000, respectivement 0, 15 et 30 % (p/v). Nous avons également modifié les conditions de culture en raison de la difficulté à obtenir une solidification de la gélose en présence de PEG. Les cals sont disposés sur du papier filtre dans des bocaux contenant de la vermiculite additionnée du milieu de culture liquide.

### *Extraction des protéines totales*

Les extraits sont réalisés à froid par broyage au mortier des échantillons lyophilisés dans un tampon Tris-HCl 250 mM, pH8 contenant EDTA (1 mM) et MgCl<sub>2</sub> (1 mM). L'extrait est séparé des débris cellulaires par centrifugation 15000x g à 4 °C pendant 20 min.

La précipitation de la partie protéique est obtenue par addition de l'extrait dans de l'acétone pur conservé à  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1/9 v/v) pendant 12 h puis par une centrifugation à froid à  $15000\times g$  pendant 20 min. Le culot est repris dans du tampon d'extraction, puis dilué au 1/2 par un tampon dénaturant : Tris-HCl 0,5 M pH6,8, glycérol 10 %, solution mère SDS 10 % (p/v) 20 %, 2 $\beta$ -mercaptoéthanol 5 %, bleu de Bromophénol 0,05 %. Les extraits sont conservés à  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### *Dosage des protéines totales*

Le dosage des protéines est effectué par utilisation du kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Richmond, C.A.). La courbe d'étalonnage est réalisée avec de l'albumine bovine.

### *Electrophorèses*

Les électrophorèses sont réalisées sur un système de minicuves BIORAD Mini-PROTEAN II selon la méthode de Laemmli (1970) sur des gels d'acrylamide 12 % avec un gel de concentration à 4 %. Les dépôts sont de 10  $\mu\text{g}$  pour les gels colorés au nitrate d'argent, de 15  $\mu\text{g}$  ou 20  $\mu\text{g}$  pour les gels colorés au réactif de Schiff. Un puits est réservé pour des standards de poids moléculaires connus. Pour les gels destinés à la coloration au réactif de Schiff, nous utilisons des standards pré-colorés.

Les gels sont soumis à un courant de 200 volts constants pendant 40 min.

### *Coloration des protéines*

La mise en évidence des protéines totales se fait par coloration au nitrate d'argent (kit de coloration Silver Stain Plus - Biorad). Les protéines glycosylées sont révélées par une coloration au réactif de Schiff précédée d'une oxydation à l'acide périodique selon la méthode de Zacharius *et al.* (1969).

## Résultats

Lorsque l'on analyse les extraits bruts par électrophorèse, les protéines totales, révélées par coloration au nitrate d'argent, montrent des profils variables d'un milieu à l'autre (fig. 3 a). On peut noter la présence systématique de bandes à 21,5kDa et 29kDa pour tous les milieux.

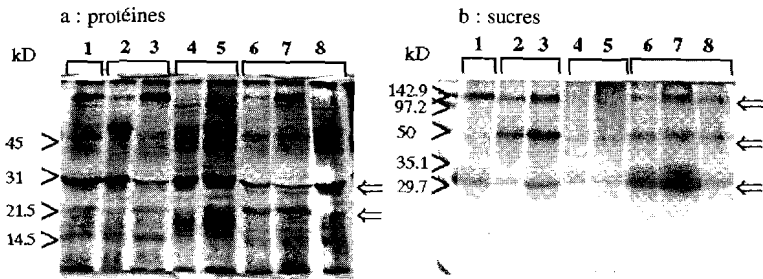


Figure 3

Glycoprotéines extraites de cals d'*A. senegal* cultivés sur milieu gélosé MS.

A gauche : gel SDS-PAGE 12 % coloré au nitrate d'argent. Chaque piste est chargée avec 10 µg de protéines totales.

A droite : coloration au réactif de Schiff, 15 µg de protéines par piste.

1 : pas de phytohormones - 2 : 2,4D 2,3 µM plus Kin 4,6 µM -

3 : 2,4-D 4,5 µM plus Kin 2,3 µM - 4 : ANA 2,7 µM plus

BAP 2,2 µM - 5 : ANA 5,4 µM plus BAP 4,4 µM - 6 : BAP 4,4 µM -

7 : BAP 8,9 µM - 8 : BAP 44,4 µM.

L'analyse de ces gels après coloration au réactif de Schiff, qui met en évidence les protéines glycosylées, permet de distinguer globalement 3 catégories de profils en fonction du milieu de culture (fig. 3 b) :

- Les milieux sans hormones ou contenant seulement de la BAP (puits 1-6-7-8) avec 2 bandes de forte intensité :  $\geq 100$ kDa et 29kDa, et 1 bande de plus faible intensité à 48kDa.
- Les milieux ANA / BAP sur lesquels la coloration est plus faible (puits 4-5) avec une bande à 29kDa et une à 48kDa. Cependant, sur ces milieux, lorsque l'on dépose 20 µg de protéines, on obtient un profil du même type que les précédents (non montré). Il est à noter par ailleurs qu'au cours du temps, sur ces milieux, les profils sont

extrêmement stables. Le milieu correspondant au puits 5 a été choisi pour les études de stress, car il permet en outre d'obtenir une excellente croissance des cals.

- Les milieux 2,4-D / kinétine (bandes 2-3) avec une très forte coloration à 100kDa et 48kDa, beaucoup plus faible à 29kDa.

Les profils protéiques des cals cultivés sur vermiculite sans addition de PEG sont assez stables dans le temps (non montré). En coloration au réactif de Schiff, les bandes de 29kDa et 48kDa sont visibles jusqu'à la fin de la culture. Des bandes apparaissent dans les faibles PM de l'ordre de 20kDa. Par ailleurs, dans les hauts PM, on voit apparaître une bande à la limite du gel de concentration qui augmente d'intensité tout au long de la culture, ainsi qu'une autre avant le gel de concentration.

Sur le milieu contenant du PEG à 30 %, on observe, en fonction du temps de culture, la disparition progressive de toutes les protéines glycosylées (fig. 4 a).

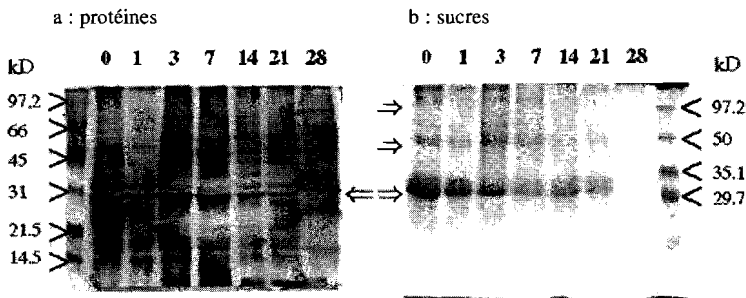


Figure 4

Glycoprotéines extraites de cals d'*Acacia senegal* cultivés sur vermiculite en présence de PEG à 30 %. Les nombres au dessus des pistes donnent les durées de culture en jours.

A gauche : gel SDS-PAGE 12 %, coloré au nitrate d'argent, avec 10 µg de protéines totales par piste.

A droite : coloration au réactif de Schiff, 15 µg de protéines totales par piste.

Sur le gel coloré au nitrate d'argent, le maintien de la bande à 29kDa indique que le polypeptide est toujours présent (fig. 4 a).

En l'absence d'une détermination analytique de ces polypeptides, il est difficile de conclure, mais il semble qu'il y ait une déglycosylation des protéines au cours de la période de stress hydrique.

Nous avons également séparé les différents constituants d'une gomme arabique du commerce (Sigma) par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. L'extrait brut migre difficilement, sans doute du fait de la quantité importante des sucres libres. Après précipitation et concentration de la fraction protéique totale à l'acétone, nous constatons que la partie de la gomme qui migre dans le gel comporte plusieurs polypeptides avec une bande à 21kDa, deux bandes vers 29/31kDa, une vers 48kDa et une autre vers 100kDa (fig. 5). On retrouve les mêmes polypeptides dans différentes fractions d'une gomme soudanienne, excepté la bande à 21 (Osman *et al.*, 1993).

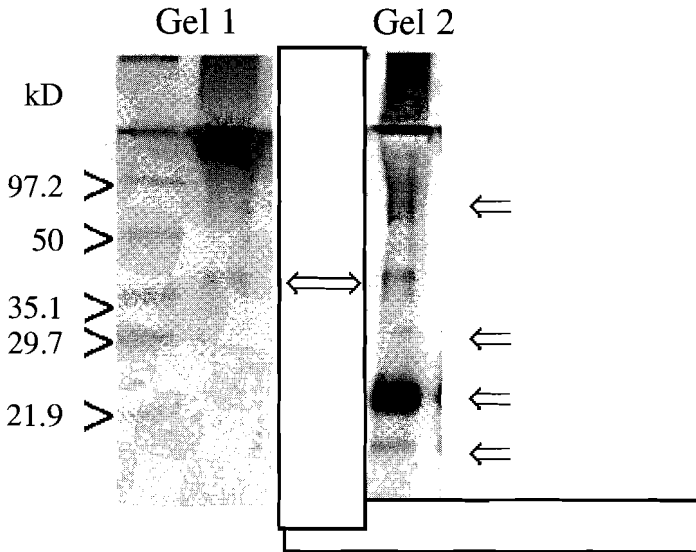


Figure 5  
Glycoprotéines d'une gomme arabique du commerce.  
A gauche : gel SDS-PAGE 12 %, coloration au réactif de Schiff.  
A droite : coloration au nitrate d'argent.  
La première piste à gauche correspond à des protéines étalon pré-colorées.

Si le modèle de Qi *et al.* (1991) n'est pas applicable à toutes les molécules de la gomme, il pourrait être valable pour cette fraction de la gomme constituée de petits polypeptides : on aurait alors des polymères d'unités identiques sucres-polypeptides d'environ 7kDa,



et la bande à 21kDa correspondrait à un trimère. L'analyse du même gel, après coloration au réactif de Schiff (fig. 5), montre que l'extrait contient une ou plusieurs protéines glycosylées de fort PM (supérieur ou très supérieur à 200kDa) qui ne pénètrent pas le gel. Une fraction est sans doute de PM supérieur et ne pénètre pas le gel de concentration. On aperçoit une bande légèrement colorée vers 48kDa correspondant à la bande 48kDa révélée par le nitrate d'argent. Le réactif de Schiff est peu sensible (Moller et Poulsen, 1996) : il est possible que la quantité de sucres présents sur les peptides de faibles PM ne soit pas suffisante et/ou que la quantité de ces polypeptides glycosylés soit inférieure au seuil de détection.

## Conclusions

Dans l'état actuel de nos travaux, nous pouvons dire que des cals d'*Acacia senegal in vitro* produisent des protéines glycosylées dont l'expression varie en fonction de la composition hormonale du milieu de culture. Une séparation par électrophorèse permet de mettre en évidence trois d'entre elles, de PM voisins de 29kDa, 48kDa et 100kDa. Lors de stress hydriques, ces protéines tendent à se déglycosyler d'autant plus rapidement que le stress est important. Sur le témoin sans PEG, on assiste au contraire, tout au long de la culture, à l'apparition de nouvelles protéines glycosylées de plus haut PM.

D'autre part, sans que l'on puisse déterminer l'équivalence entre les bandes glycosylées de nos cals et des polypeptides de la gomme arabique en l'absence d'une analyse de leur composition, le nitrate d'argent révèle deux bandes à 21kDa et 29kDa, présentes quelles que soient les conditions de culture.

La présence de polypeptides de hauts poids moléculaires a considérablement gêné l'obtention de profils protéiques exploitables. Ainsi, les prochains essais seront conduits après fractionnement des extraits, en particulier pour la gomme brute. Ce travail va évoluer vers la détermination des acides aminés et, si possible, des sucres de ces polypeptides, tant sur la gomme que dans nos extraits. Sur la gomme, il serait intéressant de vérifier si les échantillons de différentes pro-

venances se comportent de façon similaire pour les petits polypeptides en électrophorèse. Si les bandes mises en évidence sur nos gels se révèlent être identiques dans leur composition à celles de même poids moléculaire de la gomme, ceci indiquerait qu'au niveau cellulaire une partie du métabolisme de la gomme est assuré par des cellules sans différenciation particulière. Cependant, il resterait encore à déterminer si ces petites molécules sont les précurseurs des macromolécules majoritaires de la gomme ou si cette biosynthèse correspond à une voie métabolique différente qui se met en place suite au stress appliqué dans la plante entière lors des saignées effectuées sur les troncs.

## Abréviations

AGP : protéines à arabinogalactanes ;  
 ANA : acide naphthalène acétique ;  
 BAP : benzylaminopurine ;  
 2,4-D : acide 2,4 dichlorophénoxyacétique ;  
 Kin : kinétine ;  
 MS : milieu de culture Murashige et Skoog ;  
 PAGE : électrophorèse sur gel d'acrylamide ;  
 PEG : polyéthylène glycol ;  
 PM : poids moléculaire ;  
 SDS : dodécyl sulfate de sodium.

## Bibliographie

- ANDERSON (D. M. W.),  
 WANG WEIPING, 1990 -  
 Acacia gum exudates from Somalia  
 and Tanzania : the *Acacia senegal*  
 complex. *Bioch. Systematics and*  
*Ecol.*, 18 (6) : 413-418.
- ANDERSON (D. M. W.), Hirst (S. E.),  
 STODDART (J. F.), 1966 -  
 Studies on uronic acid materials. Part
- XVII. Some structural features of  
*Acacia senegal* gum (gum arabic).  
*J. Chem. Soc., (C)* : 1959-1966.
- BALDWIN (T. C.), MC CANN (M. C.),  
 ROBERTS (K.), 1993 -  
 A novel hydroxyproline-deficient  
 arabinogalactan protein secreted by  
 suspension cultured cells of *Daucus*  
*carota*. *Plant Physiol.*, 13 : 115-123.

- CONNOLLY (S.), FENYO (J. C.), VANDELDELDE (M. C.), 1988 - Effect of a protéinase on the macromolecular distribution of *Acacia senegal* gum. *Carbohydrate polymers*, 8 : 23-32.
- CONNOLLY (S.), FENYO (J. C.), VANDELDELDE (M. C.), 1987 - Heterogeneity and homogeneity of an arabinogalactanprotein : *Acacia senegal* gum. *Food Hydrocolloids*, 1 : 477-480.
- GOSH (S. S.), PURKAYASTHA (S. K.), 1962 - Anatomical studies of wood bark of *Acacia senegal* Willd. trees with special reference to gum exudation. *Indian Forester*, 88 : 92-99.
- HERMANN (E. M.), LAMB (C. J.), 1992 - Arabinogalactan rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies. *Plant Physiol.*, 98 : 264-272.
- LAEMMLI (U.) 1970 - Cleavage of situ structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685.
- MOLLARD (A.), JOSELEAU (J. P.), 1994 - *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline deficient arabinogalactan-protein. *Plant Physiol. Biochem.*, 32 (5) : 703-709.
- MOLLER (H. J.), POULSEN (J. H.), 1996 - "Staining of glycoproteins/ proteoglycans on SDS-gels." In *The Protein Protocols Handbook* (J. M.) Walker éd. Humana Press Inc. Totowa : 99-631.
- MURASHIGE (T.), SKOOG (F.), 1962 - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15 : 473-497.
- NITSCH (J. P.), NITSCH (C.), HAMON (S.), 1968 - Réalisation expérimentale de l'androgenèse chez divers *Nicotiana*. *CR Soc. Bio. Paris*, 162 : 369-372.
- OSMAN (M. E.), MENZIES (A. R.), WILLIAMS (P. A.), PHILLIPS (G. O.), BALDWIN (T.), 1993 - The molecular characterization of the polysaccharide gum from *Acacia senegal*. *Carbohydrate Research*, 246 : 303-318.
- QI (W.), FONG (C.), LAMPORT (D. T. A.), 1991 - Gum arabic is a twisty hairy rope. *Plant Physiol.*, 96 : 848-855.
- SHOWALTER (A. M.), 1993 - Structure and fonction of plant cell wall proteins. *Plant Cell*, 5 : 9-23.
- VANDELDELDE (M. C.), FENYO (J. C.), 1985 - Macromolecular distribution of *Acacia senegal* gum (gum arabic) by size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 5 : 251-273.
- VASSAL (J.), 1985 - Gummiiferous acacia and gum productivity. Some aspects of current research. *Bull. IGSM*, 13:30-37.
- ZACHARIUS (R. M.), ZELL (T. E.), 1969 - Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 30 : 148-152.