



Marquage cytochimique de grains d'amidon par la concanavaline A couplée à l'or colloïdal

Brigitte Bouchet, L. Rey, D.J. Gallant

► To cite this version:

Brigitte Bouchet, L. Rey, D.J. Gallant. Marquage cytochimique de grains d'amidon par la concanavaline A couplée à l'or colloïdal. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1984, 299 (19), pp.813-818. hal-02722124

HAL Id: hal-02722124

<https://hal.inrae.fr/hal-02722124>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CYTOLOGIE VÉGÉTALE. — Marquage cytochimique de grains d'amidon par la Concanavaline A couplée à l'or colloïdal.

Note de **Brigitte Bouchet, Lucien Rey et Daniel J. Gallant**, présentée par Roger Buvat.

Remise le 17 juillet 1984, acceptée le 22 octobre 1984.

La technique de couplage de la Concanavaline A par l'or colloïdal selon Horisberger et Rosset a été appliquée à des amidons de trois variétés de Maïs (amylomaïs, Maïs normal et Maïs waxy) ayant des teneurs en amylopectine respectivement de 30, 76 et 99%. Le marquage de l'amidon n'a pu être réalisé qu'en traitant préalablement les échantillons par hydrolyse enzymatique (α -amylase) ou par oxydation périodique. L'amidon de Maïs à 30% d'amylopectine est peu réactif vis-à-vis de la Concanavaline A alors que les amidons à 76 et 99% réagissent fortement en surface. Tous ces résultats sont confirmés par des couplages analogues avec la Concanavaline A fluorescente.

PLANT CYTOLOGY. — Use of Colloidal gold Labelled Concanavalin A as a Marker for the Starch Granule.

The use of colloidal gold labelled Concanavalin A according to Horisberger and Rosset has been used as a marker for the maize starch granules. Three varieties have been studied (amylomaize, normal and waxy maizes) the amylopectin contents of the starch granules being 30, 76 and 99%, respectively. Coupling of the colloidal gold labelled Concanavalin A on the starch was only possible when the starch granules were previously treated using either α -amylase or periodic acid; the amylomaize was only slightly reactive while the surfaces of the normal and the waxy maize reacted very strongly with the labelled Concanavalin A. All the results were confirmed using the fluorescent labelled Concanavalin A.

INTRODUCTION. — Depuis une vingtaine d'années, l'organisation ultrastructurale du grain d'amidon, α -D-polyanhydroglucopyranoside, a été abordée par l'emploi de méthodes cytochimiques nécessitant des dégradations enzymatiques et des réactions chimiques, soit sur grains entiers, soit sur coupes ultrafines ([1] à [7]). Il a été démontré que chaque type d'amidon présentait une structure spécifique basée sur une association de macromolécules en « blocklets » disposés alternativement en couches fortement et faiblement cristallines ([4] et [8]), Il n'a cependant pas été possible de relier cette périodicité structurale (que l'on assimile couramment aux stries d'accroissement des grains d'amidon) aux deux entités macromoléculaires caractérisées biochimiquement, l'une en chaînes linéaires (l'amylose), l'autre en chaînes ramifiées (l'amylopectine) faute d'un réactif cytochimique spécifique des liaisons glucidiques en α -D-(1 $\rightarrow$ 6). Il existe pourtant en biochimie une technique de séparation des constituants de l'amidon ([9] et [10]) basée sur la propriété de l'amylopectine d'interagir spécifiquement avec la Concanavaline A (Con A) pour former un complexe insoluble ([11] et [12]). La Con A, lectine extraite de *Canavalia ensiformis*, interagit avec les résidus glycosyls terminaux non réducteurs des α -D-glucanes, α -D-mannanes et β -D-fructosanes ramifiés. Cette fixation s'établit sur le cycle glucidique par des liaisons non covalentes, principalement par ponts hydrogène avec la séquence de radicaux hydroxyles non substitués en C 3, C 4 et C 6. A l'inverse, les α -D-glucanes et les α -D-mannanes linéaires ne donnent pas de précipité avec la Con A [12].

Le but du présent travail a été la mise au point d'une technique cytochimique utilisant cette propriété de la Con A pour localiser l'amylopectine de grains d'amidon. Afin de visualiser les lieux de couplage en microscopie électronique, nous avons employé un complexe Con A-or colloïdal préparé selon la méthode d'Horisberger et Rosset [13]; l'or colloïdal est en effet un marqueur d'une excellente résolution spatiale [14]. L'amidon de Maïs a été choisi en raison des nombreuses variétés qui présentent un éventail très étendu dans les rapports macromoléculaires amylose-amylopectine.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — Cette étude a porté sur trois types d'amidon de Maïs industriels (Ets Roquette Frères) contenant des teneurs en amylopectine nettement différentes : un Maïs dit riche en amylose (Eurylon)

ou amylomais à 30% d'amylopectine (A 30), un Maïs normal à 76% d'amylopectine (A 76) et un Maïs cireux (waxy) à 99% d'amylopectine (A 99). Les expériences de couplage ont été réalisées sur des grains d'amidon entiers. C'est en effet en faisant agir les réactifs dans ces conditions qu'il est le plus facile de mettre en évidence les différentes zones structurales [4].

Prétraitement des amidons. — Les grains d'amidon industriels présentent une très faible porosité [4]. Afin de les rendre plus perméables aux réactifs, l'un des traitements suivants a dû leur être appliqué : 1° incubation de 24 h à 37°C dans une solution d' α -amylase (*Bacillus subtilis*) à 1 mg/10 ml dans le tampon phosphate salin (PBS 0,01 M à pH 7,2); après rinçage, les amidons sont stockés à 4°C en présence de NaN_3 dans le tampon PBS contenant des ions Ca^{2+} et Mn^{2+} (1 mM) indispensables par la suite à la stabilisation du couplage [9]; 2° les amidons sont oxydés 10 mn par l'acide periodique (44 mM) dans l'eau distillée, ils sont ensuite lavés et stockés comme dans le cas précédent.

Étude en microscopie photonique à fluorescence. — Les échantillons prétraités sont mis en contact 30 mn à température ambiante avec la Con A marquée par la di-chlorotriazinyl-amino-fluorescéine (Con A-Flu) dans le tampon PBS (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le témoin est réalisé en mélangeant une solution de glucose 0,1 M à la suspension d'amidon avant d'ajouter la solution de Con A-Flu. Finalement un frottis de chaque suspension d'amidon est monté entre lame et lamelle dans une huile à immersion non fluorescente et observé en lumière bleue (filtre d'excitation 400 nm, filtre d'arrêt 530 nm).

Étude en microscopie électronique à transmission (MET). — La préparation de l'or colloïdal est effectuée selon la technique décrite par Horisberger [15], qui permet d'obtenir des particules d'or de 12 ± 4 nm. Le complexe Concanavaline A-or colloïdal (Con A-Au) est préparé après avoir déterminé la concentration minimale en protéine assurant la stabilité du colloïde vis-à-vis d'un électrolyte tel que le NaCl [16]. Les échantillons sont traités par la Con A-Au selon le protocole décrit pour l'étude en fluorescence. L'inclusion classique est effectuée dans le glycol méthacrylate (GMA). Les coupes ultrafines sont observées par MET sans postcoloration.

RÉSULTATS. — Les clichés de la planche I illustrent les résultats du marquage de l'amidon de Maïs waxy (A 99) traité par l'acide periodique en présence ou en absence de glucose 0,1 M. Dans toutes les préparations « témoins » où les sites réceptifs de la Con A ont été bloqués par le glucose, on n'observe pratiquement aucun marquage, que ce soit par la Con A-Flu (fig. 1 a) ou par la Con A-Au (fig. 1 b et c). Au contraire les échantillons

EXPLICATIONS DES PLANCHES

Planche I

Marquages cytochimiques par la Con A-Fluorescéine et par la Con A-Or colloïdal de l'amidon de Maïs waxy à 99% d'amylopectine (A 99) prétraité par l'acide periodique.

Fluorescein and colloidal gold labelled Concanavalin A on waxy maize (99% amylopectin, A 99) starch granules previously oxidized with periodic acid.

Fig. 1 a, b et c. — Échantillons « témoins » pour lesquels le couplage a été inhibé par addition de glucose. Fig. 1 a, couplage amidon/Con A-Flu. Fig. 1 b et c, couplage amidon/Con A-Au. On n'observe ni fluorescence ni fixation d'or colloïdal sur les grains d'amidon.

Fig. 1 a, b and c. — Check samples: starch granules of which coupling was inhibited with the addition of glucose. Fig. 1 a, coupling starch/Con A-Flu. Fig. 1 b and c, coupling starch/Con A-Au. No fluorescence nor colloidal gold particles were present on starch granules.

Fig. 1 a ($G \times 320$); Fig. 1 b ($G \times 6000$); Fig. 1 c ($G \times 60000$).

Fig. 1 a ($M \times 320$); Fig. 1 b ($M \times 6,000$); Fig. 1 c ($M \times 60,000$).

Fig. 1 d, e et f. — Échantillons « essais ». Fig. 1 d, couplage amidon/Con A-Flu. Fig. 1 e et f, couplage amidon/Con A-Au. A la surface des grains d'amidon l'intensité de la fluorescence et la densité des particules d'or sont importantes.

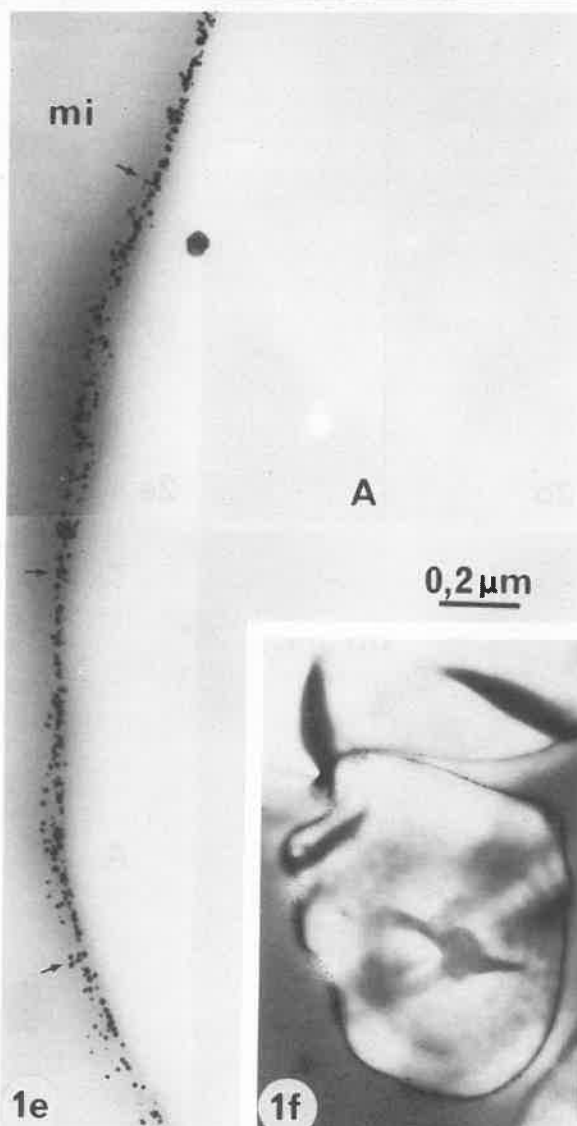
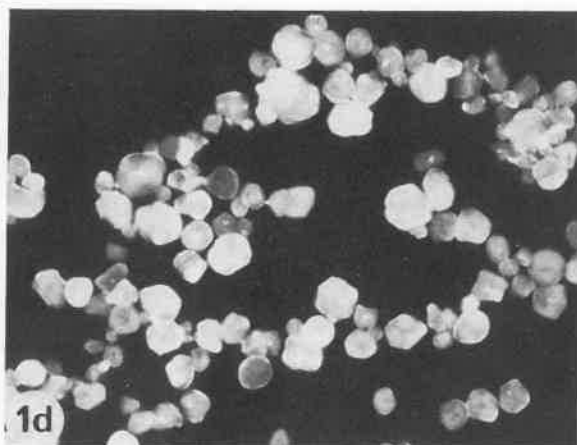
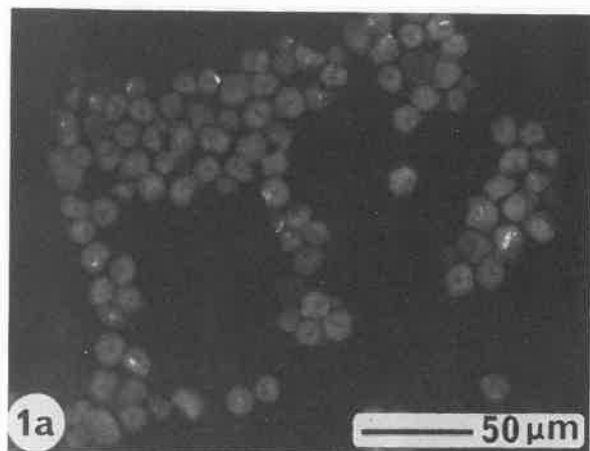
Fig. 1 d, e and f. — Testing samples. Fig. 1 d, coupling starch/Con A-Flu. Fig. 1 e and f, coupling starch/Con A-Au. Very strong fluorescence and intensive colloidal gold particles fixation were seen on the periphery of the starch granules.

Fig. 1 d ($G \times 320$); Fig. 1 e ($G \times 60000$); Fig. 1 f ($G \times 6000$).

Fig. 1 d ($M \times 320$); Fig. 1 e ($M \times 60,000$); Fig. 1 f ($M \times 6,000$).

Abréviations. — A : amidon; mi : milieu d'inclusion; les flèches soulignent l'emplacement des particules d'or.

Abbreviations. — A: starch; mi: embedding medium; arrows show the gold particles.



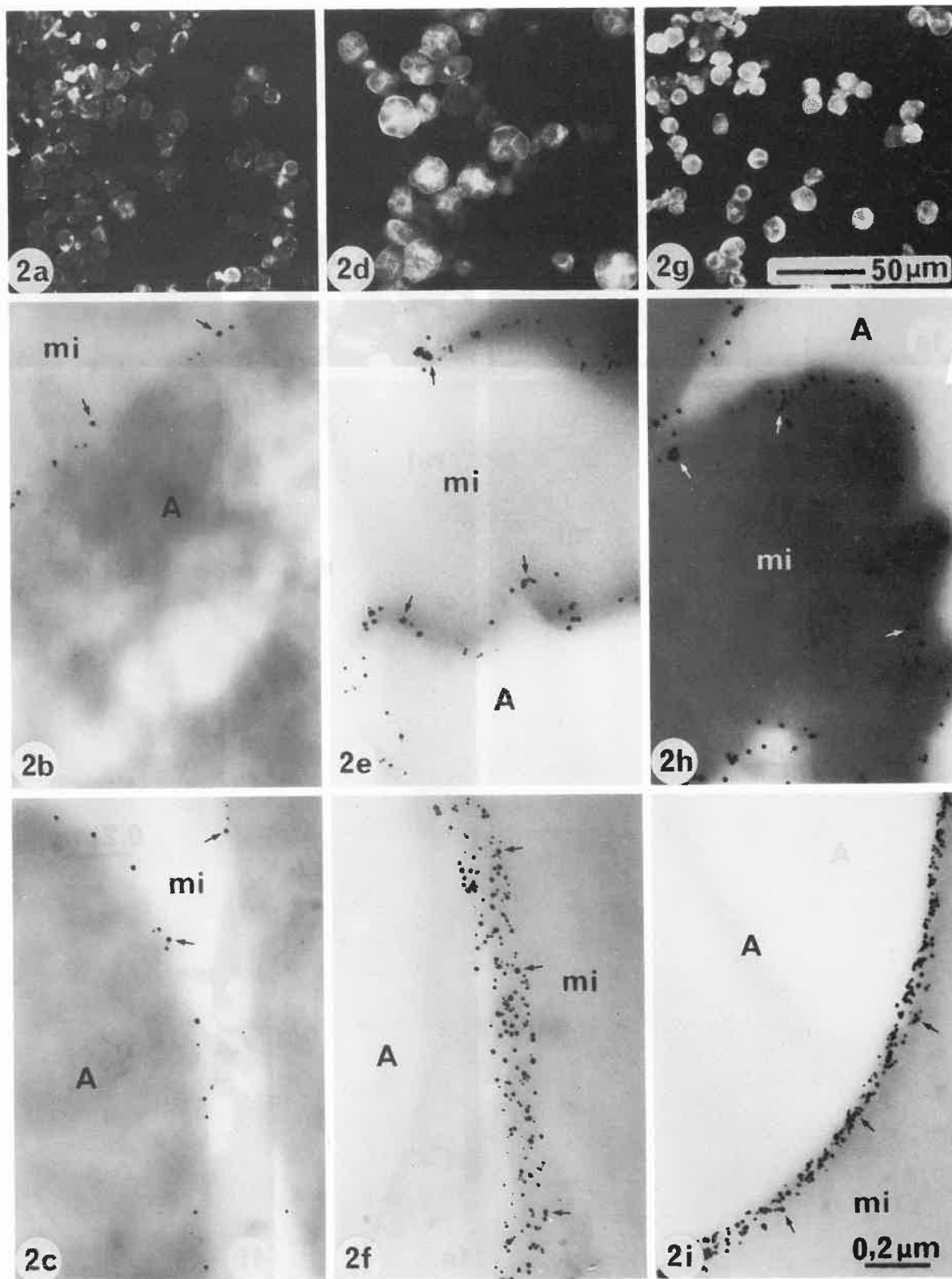


Planche II

Réaction comparée de trois variétés d'amidon de Maïs aux marquages par la Con A-Fluorescéine et par la Con A-or colloïdal.

Comparative coupling of different maize starch granules with fluorescein and colloidal gold labelled Concanavalin A.

Fig. 2 a, b et c. — Amidon d'amylomais à 30 % d'amylopectine (A 30). Fig. 2 a : prétraitement par l' α -amylase, couplage amidon/Con A-Flu ($G \times 320$). Fig. 2 b : même prétraitement, couplage amidon/Con A-Au ($G \times 60\,000$). Fig. 2 c : oxydation périodique, couplage amidon/Con A-Au ($G \times 60\,000$).

Fig. 2 a, b and c. — Amylomaïs starch granules A 30 (30% amylopectin). Fig. 2 a: coupling Con A-Flu on α -amylase treated A 30 starch granules ($M \times 320$). Fig. 2 b: coupling Con A-Au on same samples as 2 a ($M \times 60,000$). Fig. 2 c: coupling Con A-Au on periodic acid oxidized A 30 starch granules ($M \times 60,000$).

Fig. 2 d, e et f. — Amidon de Maïs normal à 76 % d'amylopectine (A 76). Mêmes conditions de prétraitements et de couplages que pour la série 2 a, b et c.

Fig. 2 d, e and f. — Normal maize starch granules A 76 (76% amylopectin). Same treatments as series 2 a, b and c.

Fig. 2 d ($G \times 320$); Fig. 2 e et f ($G \times 60\,000$).

Fig. 2 d ($M \times 320$); Fig. 2 e and f ($M \times 60,000$).

Fig. 2 g, h et i. — Amidon de Maïs waxy à 99 % d'amylopectine (A 99). Mêmes conditions de prétraitements et de couplages que pour la série 2 a, b et c.

Fig. 2 g, h and i. — Waxy maize starch granules A 99 (99% amylopectin). Same treatments as series 2 a, b and c.

Fig. 2 g ($G \times 320$); Fig. 2 h et i ($G \times 60\,000$).

Fig. 2 g ($M \times 320$); Fig. 2 h and i ($M \times 60,000$).

Le marquage est d'autant plus important que les grains d'amidon sont plus riches en amylopectine. Il varie également en fonction du prétraitement subi et apparaît plus intense après oxydation périodique qu'après α -amylolyse. Noter les dents de corrosion à l'intérieur des grains A 76 (fig. 2 e) et A 99 (fig. 2 h) après prétraitement par l' α -amylase.

Labelling increased from A 30 to A 99 in function of amylopectin content. It depends also on the chemical pretreatment of the starch granules, being more intensive after periodic oxidation than α -amylolysis. Note the teeth of corrosion which appeared into the starch granules A 76 (fig. 2 e) and A 99 (fig. 2 h) during α -amylolysis.

Les abréviations utilisées sont celles de la planche I.

Same abbreviations as in Plate I.

« essais » de Maïs waxy montrent un taux de fluorescence élevé (fig. 1 d) ainsi qu'une densité importante de particules d'or en MET (fig. 1 e et f).

Les clichés de la planche II permettent de comparer les résultats obtenus pour les amidons de Maïs A 30 (fig. 2 a, b et c), A 76 (fig. 2 d, e et f) et A 99 (fig. 2 g, h et i). En surface des grains prétraités par l' α -amylase, le marquage est nettement plus important pour les amidons de Maïs A 76 (fig. 2 d et e) et A 99 (fig. 2 g et h) que pour l'amidon A 30 (fig. 2 a et b). Sur les figures 2 e et h, le marquage est discontinu et montre parfois une accumulation plus importante de particules d'or au niveau des crêtes. Le phénomène est encore plus accentué après prétraitement par l'acide périodique (fig. 2 c, f et i) : l'or colloïdal apparaît alors fixé sur les amidons A 76 (fig. 2 f) et A 99 (fig. 2 i) en un revêtement épais et continu, plus ou moins dense.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — 1. La technique de marquage de lectines par l'or colloïdal selon Horisberger et Rosset [13] peut être utilisée pour révéler les sites de fixation de la Con A sur les grains d'amidon.

2. S'il est possible de séparer en solution (empois) l'amylose de l'amylopectine par la Con A ([9], [10], [12] et [17]), la fixation de cette lectine ne peut être réalisée sur des grains d'amidon en suspension que s'ils sont préalablement traités.

3. Sur les coupes ultrafines, non post colorées, (fig. 2 b, c, e, f, h et i) l'amidon A 30 apparaît plus contrasté que les amidons A 76 et A 99. Cette différence a déjà été remarquée ([4] et [18]) et s'explique par la structure plus compacte de cet amidon particulier dont une partie des grains résistent à l'autoclavage à 115°C.

4. Les faibles marquages, constatés sur l'échantillon A 30 après prétraitements par l' α -amylase ou par l'acide periodique, s'expliquent par le fait que cet amidon est surtout riche en chaînes linéaires. Les conditions nécessaires au couplage de la ConA ([11] et [12]) sont dans ce cas faiblement remplies; par contre, elles le sont beaucoup mieux dans les amidons de Maïs A 76 et A 99 où les nombreuses liaisons $\alpha(1 \rightarrow 6)$ multiplient le nombre de groupements glycosyls terminaux pouvant réagir.

5. Le fait que sur les amidons prétraités par l'acide periodique, la fixation de ConA se limite à la surface des grains appelle plusieurs réflexions : tout d'abord, le marquage du grain A 30, même s'il est faible, confirme que la coque limitante de cet amidon est bien de nature glucidique. Par ailleurs, bien que l'oxydation ait été effectuée sur grains entiers dans les conditions permettant le marquage sélectif des structures par le PATAg, signe de l'acquisition d'une certaine porosité granulaire ([3] à [6], [8] et [18]) la fixation d'or reste superficielle. Cette porosité acquise n'est donc pas suffisante pour que le complexe ConA-Au puisse pénétrer à l'intérieur des grains d'amidon. Cependant, on peut penser que l'acide periodique agit à la surface des grains par un processus de dé cristallisation en libérant les chaînes latérales des macromolécules ramifiées [4].

6. Pratiquement, l'efficacité du marquage paraît fortement liée au démasquage des macromolécules d'amylopectine qui dans le grain natif semblent peu accessibles. Les effets d'autres prétraitements comme l'hydrolyse acide et les empesages limités de grains d'amidon ainsi que des essais de couplage sur coupes seront prochainement éprouvés.

M. Joseph Schrével, Professeur de Biologie à l'U.E.R. Sciences de l'Université de Poitiers nous a initié aux techniques de marquage par fluorescence et nous a judicieusement conseillé lors de la rédaction de cette Note.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. S. BUTTROSE, *J. Ultrastr. Research*, 4, 1960, p. 231-257.
- [2] M. INNAMORATI, *Caryologia*, 16, 1963, p. 159-190.
- [3] D. J. GALLANT et A. GUILBOT, *Die Stärke*, 21, 1969, p. 156-163.
- [4] D. J. GALLANT, Contribution à l'étude de la structure et de l'ultrastructure du grain d'amidon, *Thèse Doctorat d'État*, Université de Paris, C.N.R.S. n° AO 10823, 1974.
- [5] P. KASSENBECK, *Die Stärke*, 27, 1975, p. 217-252.
- [6] P. KASSENBECK, *Die Stärke*, 30, 1978, p. 40-46.
- [7] M. YAMAGUCHI, K. KAINUMA et D. FRENCH, *J. Ultrastr. Research*, 69, 1979, p. 249-261.
- [8] F. DUPRAT, D. J. GALLANT, A. GUILBOT, C. MERCIER et J. P. ROBIN, *L'amidon*, in : B. MONTIES, *Les polymères végétaux*, Gauthier-Villars, Paris, 1980, p. 177-231.
- [9] J. F. KENNEDY et A. ROSEVEAR, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 13, 1973, p. 2041-2046.
- [10] C. W. CHANG, *Plant Physiol.*, 64, 1979, p. 833-836.
- [11] I. J. GOLDSTEIN, *Use of Concanavalin A for Structural Studies*, in : R. L. WHISTLER et J. N. BEMILLER, *Methods in Carbohydrate Chemistry. VI General Carbohydrate Methods*, Academic Press, New York, London, 1972, p. 106-119.
- [12] I. J. GOLDSTEIN, *Carbohydrate Binding Specificity of Concanavalin A*, in : H. BITTIGER et H. P. SCHNEBLI, *Concanavalin A as a Tool*. John Wiley and Sons, London, New York, Sydney, Toronto, 1976, p. 55-65.
- [13] M. HORISBERGER et J. ROSSET, *J. Histochem. and Cytochem.*, 25, 1977, p. 295-305.
- [14] J. SCHREVEL, D. GROS et M. MONSIGNY, *Progr. Histochem. Cytochem.*, 14, 1981, p. 1-269.
- [15] M. HORISBERGER, *Biol. Cellulaire*, 36, 1979, p. 252-258.
- [16] W. P. FAULK et G. M. TAYLOR, *Immunocytochemistry*, 8, 1971, p. 1081-1083.
- [17] V. BITON, Interactions entre la Concanavaline A et les alpha-glucanes. Applications à la chromatographie d'affinité, *Thèse Doctorat 3^e cycle*, Université de Nantes, 1984.
- [18] D. J. GALLANT, A. DERRIEN, A. AUMAITRE et A. GUILBOT, *Die Stärke*, 25, 1973, p. 56-64.

B. B. et D. J. G. : Laboratoire de Technologie des Aliments des Animaux,
Microscopie, I.N.R.A., Centre de Recherches agroalimentaires, 44072 Nantes Cedex;

L. R. : Laboratoire de Cytopathologie végétale,
U.E.R. Sciences de la Nature, 2, rue de la Houssinière, 44072 Nantes Cedex.