



**HAL**  
open science

# Les oléosines, de nouveaux émulsifiants d'origine végétale. Comparaison des globules lipidiques extraits de végétaux (*A. thaliana*) et de levures (*Y. lipolytica*)

Emeline Roux

## ► To cite this version:

Emeline Roux. Les oléosines, de nouveaux émulsifiants d'origine végétale. Comparaison des globules lipidiques extraits de végétaux (*A. thaliana*) et de levures (*Y. lipolytica*). Biologie végétale. Institut national agronomique paris-grignon - INA P-G, 2003. Français. NNT : . tel-00007548

**HAL Id: tel-00007548**

**<https://theses.hal.science/tel-00007548>**

Submitted on 29 Nov 2004

**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.



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON



École Doctorale ABIES

UMR de Chimie Biologique INRA / INA P-G

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Biochimie

présentée et soutenue publiquement par

Émeline Roux

Les oléosines, de nouveaux émulsifiants d'origine végétale.  
Comparaison des globules lipidiques extraits de végétaux (*A.  
thaliana*) et de levures (*Y. lipolytica*).

Oleosins, new emulsifiers from plants. Comparison between oil bodies  
from plants (*A. thaliana*) and from yeasts (*Y. lipolytica*).

le 13 octobre 2003, devant le jury ci-dessous :

M. Jean-Claude Meunier, professeur à l'INA P-G, Grignon	président
M. Marc Anton, ingénieur de recherche INRA, Nantes	rapporteur
M. Marc le Maire, professeur à l'Université Paris-Sud, Gif-sur-Yvette	rapporteur
M. Philippe Minard, professeur à l'Université Paris-Sud, Orsay	examineur
M. Thierry Chardot, directeur de recherche INRA, Grignon	directeur de thèse

## Remerciements

Je remercie Messieurs Marc le Maire, Professeur à l'université Paris-Sud, et Marc Anton, Ingénieur de recherche à l'INRA de Nantes, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Monsieur Jean-Claude Meunier, Professeur à l'INA P-G, de bien vouloir présider ce jury et M. Philippe Minard, Professeur à l'université Paris-Sud, d'accepter d'être examinateur.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Jean-Claude Meunier et Madame Catherine Lapierre pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire de recherche et à Monsieur Thierry Chardot pour ses conseils et son aide tout au long de ces trois années.

Un grand merci à Messieurs Philippe Minard et Gérard Leblon, de l'université Paris-Sud, pour le temps qu'ils ont consacré à mon comité de thèse et les bons conseils qu'ils ont su prodiguer.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel, permanents et stagiaires, du laboratoire de Chimie Biologique de Grignon pour leur présence et leur sympathie. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Je remercie également le personnel du laboratoire de microbiologie et génétique moléculaire des microorganismes de Grignon pour leur disponibilité.

J'adresse également tous mes remerciements au personnel de l'unité de physicochimie des macromolécules de l'INRA de Nantes, et plus particulièrement à Madame Monique Axelos et Monsieur Dominique Guibert pour leur accueil lors des manipulations sur la balance de Langmuir. Merci aussi à Stéphanie Dauphas du laboratoire d'étude des interactions des molécules alimentaires pour les discussions que nous avons pu avoir.

Je n'oublierai pas les deux mois que j'ai passés dans le laboratoire du Professeur Günther Daum à la Technische Universität de Graz, et surtout Karin Athenstaedt qui est devenue une véritable amie. Merci pour ton aide, ta présence au laboratoire et les balades dans la superbe

région de Graz. Je remercie aussi la FEBS (fédération européenne des sociétés de biochimie) qui m'a offert une bourse pour financer ce séjour.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de la chaire de biochimie agroindustrielle du CNAM avec qui j'avais fait mon DEA et que j'ai eu la chance de continuer à côtoyer lors de mes enseignements en tant que moniteur. Merci Sylvie pour les TP A du samedi et Catherine pour nos TP PPO et merci pour tout, Monsieur Nicolas.

Enfin, je n'oublierai pas de remercier ceux qui m'ont toujours soutenue : ma famille élargie (les vernonnais, les parisiens, les corbeil-cerfois, les aixois, les lillois et les vannetaises), mes amies Laurence et Iseult-Line et leurs amis et, enfin, surtout Yves.

## Résumé

Chez les espèces végétales soumises à dessiccation, les réserves lipidiques des graines sont stockées sous forme de globules, les oléosomes. Ces oléosomes sont composés d'un cœur de triglycérides (TGs), entouré d'une monocouche de phospholipides (PLs) dans laquelle s'insèrent de petites protéines, majoritairement des oléosines. Ces protéines sont constituées de trois domaines : N- et C-terminaux amphiphiles et un segment central hydrophobe de 72 acides aminés très conservé. Les oléosines sont certainement des protéines de structure et par leur présence, les oléosomes ne coalescent pas, même lors de la re-imbibition de la graine au moment de la germination. Bien que les levures présentent des organites de stockage similaires à ceux des végétaux, leur pool protéique est très différent. Nous avons cloné et exprimé deux isoformes d'oléosines d'*A. thaliana* dans *E. coli* et dans *Y. lipolytica*. Les oléosines exprimées chez la levure sont bien dirigées vers le corps lipidique. Par ailleurs, les oléosines exprimées chez la bactérie ont été purifiées à l'homogénéité en conditions dénaturantes. Par des études *in silico* et *in vitro* d'oléosine, nous postulons que le segment hydrophobe est organisé en hélices  $\alpha$ . Des études de tension de surface ont montré que les oléosines recombinantes purifiées pouvaient s'insérer à des interfaces eau / huile et qu'elles en abaissaient fortement la tension de surface (ceci mieux que des caséines  $\beta$ ). Elles peuvent aussi s'insérer dans des monocouches de PLs situées à l'interface eau / air. Les oléosines des végétaux présentent donc bien des caractéristiques d'émulsifiant huile dans eau.

Mots-clefs : oléosine, *Arabidopsis thaliana*, *Yarrowia lipolytica*, corps lipidique, émulsifiant.

## Abstract

Plants submitted to desiccation store lipids in bodies of spherical shapes: oleosoms. These are composed of a core of triacylglycerols surrounded by a single layer of phospholipids (PLs) in which are embedded proteins of low molecular weight, mostly oleosins. These proteins comprise three domains: amphiphilic N- and C- terminal and an hydrophobic central domain of 72 amino acids very well conserved. Oleosins have a structural role. Due to their presence, oleosoms do not coalesce even during seed re-imbibition upon germination. Although yeasts have storage organits similar to those of plants, the protein pattern is very different. We cloned and expressed two isoforms of *Arabidopsis thaliana* oleosins in *E. coli* and *Yarrowia lipolytica*. Oleosins expressed in yeasts are addressed to the oil bodies. Furthermore oleosins expressed in bacteria were purified under denaturing conditions. By experimental and model studies, we postulate an  $\alpha$ -helix organisation of the central domain. Surface tension studies showed that purified recombined oleosins were inserted at water / oil interfaces and decrease efficiently the interfacial tension (better than  $\beta$ -casein). They were also inserted in PLs monolayer on water / air interface. Therefore, plant oleosins have properties of an oil / water emulsifier.

Keywords: oleosin, *Arabidopsis thaliana*, *Yarrowia lipolytica*, oil body, emulsifier.

# Table des matières

Remerciements .....	2
Résumé .....	4
Résumé en anglais .....	5
Table des matières .....	6
Liste des tableaux .....	13
Liste des figures.....	14
Liste des annexes .....	19
Abréviations.....	20
Introduction .....	22
1.1. Avant-propos .....	23
1.2. Bioémulsifiants.....	24
1.2.1. Définition.....	24
1.2.2. Rôle physiologique.....	24
1.2.3. Caractéristiques d'émulsifiants.....	24
1.2.4. Grandes classes de bioémulsifiants d'origine microbienne.....	26
1.2.4.1. Émulsifiants glycolipidiques .....	26
1.2.4.2. Complexes lipides-polysaccharides.....	27
1.2.4.3. Bioémulsifiants lipides-acides aminés.....	27
1.2.4.4. Substances assimilées à des protéines .....	29
1.2.5. Applications.....	29
1.3. Globules lipidiques.....	30
1.3.1. Généralités.....	30
1.3.2. Animaux .....	30
1.3.2.1. Rôle physiologique.....	31
1.3.2.2. Protéines associées .....	31
1.3.3. Microorganismes .....	32
1.3.4. Graines des végétaux soumis à dessiccation .....	33

1.3.4.1.	Localisation des corps lipidiques de réserve de la graine.....	33
1.3.4.2.	Structure des organites de réserve .....	34
1.3.4.3.	Caractéristiques physico-chimiques .....	39
1.3.4.4.	Mobilisation des réserves .....	40
1.3.5.	Conclusion sur les globules lipidiques .....	41
1.4.	Oléosines .....	42
1.4.1.	Séquences des oléosines .....	42
1.4.1.1.	Nucléotidiques.....	42
1.4.1.2.	Protéiques.....	43
1.4.2.	Structure.....	44
1.4.2.1.	Extrémité N-terminale .....	44
1.4.2.2.	Extrémité C-terminale .....	45
1.4.2.3.	Segment central hydrophobe .....	45
1.4.3.	Adressage des oléosines dans l'oléosome de la graine.....	48
1.4.3.1.	Modèle de la biogénèse de l'oléosome.....	48
1.4.3.2.	Domaines de l'oléosine requis pour l'adressage .....	49
1.4.3.3.	Modèle consensuel .....	51
1.4.3.4.	Régulation de l'expression des oléosines .....	52
1.4.4.	Autres oléosines.....	53
1.4.4.1.	Oléosines du tapetum floral et du pollen .....	53
1.4.4.2.	Oléosines de la racine.....	55
1.4.4.3.	Oléosines de la drupe de l'olive .....	55
1.4.5.	Rôles physiologiques des oléosines.....	56
1.4.5.1.	Stabilisation des oléosomes.....	56
1.4.5.2.	Site de fixation pour la lipase .....	56
1.4.6.	Applications industrielles pour les oléosines.....	57
1.4.6.1.	Utilisation du promoteur des oléosines pour une expression ciblée vers la graine.....	57
1.4.6.2.	Expression et ciblage de protéines chimériques vers l'oléosome.....	58
1.4.6.3.	Agents émulsifiants .....	59
1.4.7.	Allergies.....	60
1.5.	Deux organismes modèles .....	60
1.5.1.	Plante : <i>A. thaliana</i> .....	60
1.5.2.	Levure : <i>Y. lipolytica</i> .....	61



1.5.2.1.	Physiologie de la cellule.....	61
1.5.2.2.	Métabolisme des lipides.....	62
1.5.2.3.	Expression de protéines hétérologues.....	63
1.6.	But du travail.....	64
Première partie : Les globules lipidiques .....		65
2.	Matériel et méthodes .....	66
2.1.	Stabilité d'émulsions huile /eau.....	66
2.1.1.	Composants .....	66
2.1.1.1.	PLs.....	66
2.1.1.2.	TGs .....	66
2.1.2.	Fabrication de l'émulsion.....	67
2.1.3.	Suivi de la stabilité de l'émulsion.....	67
2.1.3.1.	Spectrophotométrie.....	67
2.1.3.2.	Microscopie optique .....	67
2.1.3.3.	Diffusion dynamique de la lumière .....	68
2.2.	Globules lipidiques d' <i>A. thaliana</i> .....	69
2.2.1.	Isolement des corps lipidiques.....	69
2.2.2.	Analyse des protéines .....	70
2.2.2.1.	Électrophorèse en milieu dénaturant .....	70
2.2.2.2.	Immunochimie.....	71
2.3.	Isolement des globules lipidiques de levure.....	73
2.3.1.	Souche .....	73
2.3.2.	Culture .....	73
2.3.3.	Extraction des lipides totaux.....	74
2.3.4.	Dosage des phospholipides.....	75
2.3.4.1.	Dosage du phosphore.....	75
2.3.4.2.	Séparation des phospholipides.....	75
2.3.4.3.	Dosage des phospholipides.....	76
2.3.5.	Dosage des ergostérols et des esters d'ergostérols .....	77
2.3.6.	Dosage des triglycérides.....	78
2.3.7.	Dosage des acides gras .....	78
2.3.7.1.	Méthylation des acides gras.....	78

2.3.7.2.	CPG .....	78
2.3.8.	Isolement des corps lipidiques.....	79
2.3.8.1.	Analyse quantitative des protéines totales.....	80
2.3.8.2.	Pureté des corps lipidiques .....	80
2.4.	Méthodes d'étude de la tension interfaciale .....	81
3.	Résultats et discussion.....	83
3.1.	Propriétés interfaciales des lipides .....	83
3.1.1.	Comportement dans des émulsions .....	83
3.1.2.	Comportement sur une surface plane comprimée .....	84
3.2.	Comparaison des globules lipidiques de plante et de levure .....	85
3.2.1.	Oléosomes natifs d' <i>A. thaliana</i> .....	85
3.2.1.1.	Analyse de la taille et des protéines spécifiques des oléosomes .....	85
3.2.1.2.	Comportement des oléosomes en film.....	87
3.2.2.	Corps lipidiques de <i>Y. lipolytica</i> .....	91
3.2.2.1.	Isolement des corps lipidiques.....	91
3.2.2.2.	Dosage des lipides .....	92
3.2.2.3.	Comportement des particules lipidiques en film .....	96
	Deuxième partie : Les oléosines.....	98
4.	Matériel et méthodes .....	99
4.1.	Analyse des séquences d'oléosines .....	99
4.2.	Clonage des oléosines.....	99
4.2.1.	Multiplication de l'ADN .....	99
4.2.1.1.	Obtention de l'ADN codant les oléosines .....	99
4.2.1.2.	Amplification des séquences .....	99
4.2.2.	Insertion du gène dans des vecteurs de sous-clonage.....	102
4.2.2.1.	Digestions de l'ADN .....	104
4.2.2.2.	Purification de l'ADN .....	105
4.2.2.3.	Ligature.....	105
4.2.2.4.	Amplification de l'ADN plasmidique .....	105
4.3.	Expression des oléosines par <i>E. coli</i> .....	107
4.3.1.	Transformation d' <i>E. coli</i> en vue de l'expression des oléosines .....	107

4.3.2.	Criblage des bactéries.....	107
4.3.3.	Conservation des souches.....	107
4.3.4.	Production d'oléosines recombinantes.....	107
4.3.5.	Purification d'oléosines recombinantes.....	108
4.3.5.1.	Lyse.....	108
4.3.5.2.	Fixation et lavages.....	108
4.3.5.3.	Élution.....	109
4.3.6.	Méthodes de caractérisation des oléosines.....	111
4.3.6.1.	Quantitative par spectrophotométrie.....	111
4.3.6.2.	Qualitative par électrophorèse en milieu dénaturant et immunochimie.....	111
4.4.	Expression d'oléosines par <i>Y. lipolytica</i> .....	112
4.4.1.	Transformation des levures.....	112
4.4.1.1.	Préparation des cellules compétentes.....	112
4.4.1.2.	Transformation.....	112
4.4.1.3.	Conservation des souches.....	112
4.4.1.4.	Extraction de l'ADN génomique de levure.....	113
4.4.1.5.	Dosage de l'ADN.....	113
4.4.2.	Contrôle de l'expression des oléosines par la levure.....	114
4.4.2.1.	Culture des levures.....	114
4.4.2.2.	Lyse des cellules.....	114
4.4.2.3.	Analyse du contenu en protéines.....	114
4.5.	Solubilité des oléosines.....	115
4.5.1.	Précipitation des oléosines.....	115
4.5.1.1.	A l'acétone.....	115
4.5.1.2.	Au TCA.....	115
4.5.2.	Re-solubilisation des oléosines.....	115
4.5.2.1.	En milieu polaire.....	115
4.5.2.2.	En milieu apolaire.....	116
4.6.	Méthodes d'étude de structure.....	116
4.6.1.	Dichroïsme circulaire (DC).....	116
4.6.2.	Diffusion de la lumière.....	116
4.6.2.1.	Mesures de viscosité.....	116
4.6.2.2.	Mesure de l'indice de réfraction.....	118
4.6.2.3.	Mesure par diffusion de la lumière.....	118

4.7.	Méthodes d'étude des propriétés de surface aux interfaces .....	118
4.7.1.	Mesures de tension de surface dans un plan.....	118
4.7.2.	Mesures de tension de surface de goutte .....	118
5.	Résultats et discussion.....	121
5.1.	Étude <i>in silico</i> de séquences d'oléosines.....	121
5.1.1.	Structures primaires et caractéristiques hydrophobes .....	121
5.1.2.	Charges des oléosines.....	126
5.1.3.	Hydrolyses des oléosines par des protéases .....	127
5.1.3.1.	Effet de la trypsine.....	127
5.1.3.2.	Effet de la protéinase K .....	128
5.1.4.	Autres caractéristiques des oléosines .....	128
5.2.	Clonage dans <i>Y. lipolytica</i> .....	128
5.2.1.	Expression des oléosines par la levure .....	130
5.2.1.1.	Culture .....	130
5.2.1.2.	Caractérisation immunochimique.....	132
5.2.1.3.	Taille des globules lipidiques.....	133
5.2.1.4.	Conclusion.....	134
5.3.	Production d'oléosines par <i>E. coli</i> .....	134
5.3.1.	Clonage des oléosines dans <i>E. coli</i> .....	134
5.3.2.	Expression des oléosines .....	136
5.3.3.	Purification des oléosines exprimées dans <i>E. coli</i> .....	137
5.3.3.1.	Solubilisation des oléosines.....	137
5.3.3.2.	Établissement des liaisons Ni-His .....	138
5.3.3.3.	Purification des oléosines avec 3 cycles de fixation.....	139
5.3.3.4.	Purification en présence d'imidazole .....	141
5.3.3.5.	Conclusions sur la purification.....	141
5.3.3.6.	Immuno-reconnaissance des oléosines.....	142
5.4.	Étude du comportement des oléosines en solution.....	144
5.4.1.	Précipitation.....	144
5.4.2.	Solubilisation des oléosines.....	145
5.4.2.1.	En TFA / TFE.....	145
5.4.2.2.	Dans du chloroforme .....	146
5.4.2.3.	En urée.....	148

5.4.2.4.	Autres solvants .....	148
5.5.	Étude de la structure des oléosines en solution .....	150
5.5.1.	Dichroïsme circulaire (DC) .....	150
5.5.2.	Hypothèse de structure d'une oléosine dans un corps lipidique.....	151
5.5.3.	Diffusion de la lumière .....	153
5.5.3.1.	Paramètres de viscosité.....	153
5.5.3.2.	Indices de réfraction .....	154
5.5.3.3.	Résultats en diffusion de la lumière .....	154
5.6.	Étude des oléosines aux interfaces .....	155
5.6.1.	Étude du comportement des oléosines aux interfaces air / eau et huile / eau.	156
5.6.1.1.	Interface air / eau .....	156
5.6.1.2.	Interface huile / eau .....	159
5.6.2.	Insertion des oléosines dans des couches de phospholipides .....	162
5.6.2.1.	Oléosines à l'interface air / eau .....	162
5.6.2.2.	PLs à l'interface air / eau.....	164
5.6.2.3.	Oléosines sur une monocouche de PLs .....	166
Conclusion et perspectives .....		174
Bibliographie .....		177
Liste des communications.....		197
Annexes .....		199

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des propriétés interfaciales d'émulsifiant .....	26
Tableau 2 : Diamètres moyens et constituants chimiques de corps lipidique de graine . .....	35
Tableau 3: Composition en phospholipides de corps lipidique de graine. ....	35
Tableau 4 : Caractéristiques des globules lipidiques.....	42
Tableau 5 : Analyse des phospholipides de la levure <i>Y. lipolytica</i> .....	92
Tableau 6 : Dosage des lipides neutres de la levure <i>Y. lipolytica</i> .....	92
Tableau 7 : Analyse des acides gras de la levure <i>Y. lipolytica</i> .....	93
Tableau 8 : Analyse des phospholipides des particules lipidiques de <i>Y. lipolytica</i> .....	93
Tableau 9 : Dosage des lipides neutres des particules lipidiques de <i>Y. lipolytica</i> .....	94
Tableau 10 : Analyse des acides gras des corps lipidiques de <i>Y. lipolytica</i> .....	94
Tableau 11 : Amorces de PCR pour l'expression intracellulaire de S4 par <i>Y. lipolytica</i> .....	100
Tableau 12 : Amorces de PCR pour l'expression intracellulaire de S3 et S4 par <i>E. coli</i> .....	100
Tableau 13 : Amorces et matrices utilisées pour les PCR de S3 et S4.....	101
Tableau 14 : Programmes de PCR.....	101
Tableau 15 : Analyse de la composition d'oléosines en acides aminés et hydrophobie. ....	126
Tableau 16 : Coupures tryptiques par segment d'oléosine. ....	127
Tableau 17 : Viscosités des solvants des oléosines. ....	153
Tableau 18 : Indices de réfraction des solvants des oléosines.....	154
Tableau 19 : Diminution de l'IFT à l'interface air / eau en 2 h (%). ....	159
Tableau 20 : Composition en acides gras d'huiles végétales commerciales. ....	160
Tableau 21 : Diminution de l'IFT à l'interface eau / huile en 2 h (%). ....	161

## Liste des figures

Figure 1 : Structures de bioémulsifiants glycolipidiques. ....	27
Figure 2 : Structure de l'émulsane .....	27
Figure 3 : Structure primaire de la surfactine .....	28
Figure 4 : Structure de la lichenysine A .....	28
Figure 5 : Organisation du cotylédon et de l'albumen de graine de soja . ....	34
Figure 6 : Hypothèse de structure d'une stéroléosine de sésame .....	37
Figure 7 : Modèle d'un corps lipidique du maïs.....	38
Figure 8 : Diagramme d'un corps lipidique.....	39
Figure 9 : Modèle du domaine N-terminal d'une oléosine à la surface d'un corps lipidique de réserve.....	45
Figure 10 : Modèle d'orientation d'une oléosine de colza à la surface d'un corps lipidique de réserve.....	46
Figure 11 : Modèle d'une oléosine de 18 kDa à la surface du corps lipidique .....	46
Figure 12 : Modèle de conformation d'une oléosine de 18 kDa à la surface du corps lipidique .....	47
Figure 13 : Modélisation moléculaire du segment central hydrophobe d'une oléosine de tournesol. ....	48
Figure 14 : Modèle de synthèse de la biogénèse des oléosomes .....	52
Figure 15 : Système d'expression de protéines recombinantes <i>via</i> l'oléosome. ....	59
Figure 16 : Stabilité au cours du temps d'émulsions formées de TG, PL et oléosine.....	59
Figure 17 : <i>Arabidopsis thaliana</i> (photographie) .....	61
Figure 18 : Étapes de la $\beta$ -oxydation peroxysomiale. ....	62
Figure 19 : Transfert sur membrane d'un gel d'électrophorèse .....	72
Figure 20 : Plaque de silice permettant la séparation et la localisation des phospholipides ....	76
Figure 21 : Plaque de silice permettant la quantification des triglycérides, des ergostérols et esters d'ergostérols. ....	77
Figure 22 : Diagramme d'étude des lipides et des protéines de <i>Y. lipolytica</i> .....	81
Figure 23 : Balance de Langmuir NIMA 601.....	82

Figure 24 : Stabilité d'émulsion de TG (huile de tournesol ou mélange trioléine / trilinoléine) et de PL. Suivi par mesure de l' $A_{600nm}$ .	83
Figure 25 : Microscopie sur des émulsions huile de tournesol / PLs.	84
Figure 26 : Balance de Langmuir : isotherme de compression d'une couche d'huile de tournesol.	85
Figure 27 : Microscopie optique (fluorescence au rouge Nil) sur des oléosomes isolés de graine d' <i>A. thaliana</i> .	85
Figure 28 : Diffusion de la lumière sur des oléosomes extraits de graine d' <i>A. thaliana</i> .	86
Figure 29 : Électrophorèses sur des extraits totaux et des oléosomes d' <i>A. thaliana</i> isolés. Coloration au bleu de Coomassie et western blot.	87
Figure 30 : Balance de Langmuir et BAM : x $\mu$ g d'oléosomes natifs d' <i>A. thaliana</i> .	88
Figure 31 : Balance de Langmuir et BAM : 2x $\mu$ g d'oléosomes natifs d' <i>A. thaliana</i> .	89
Figure 32 : Superposition des isothermes des oléosomes natifs d' <i>A. thaliana</i> (x et 2x $\mu$ g).	90
Figure 33 : Croissance de W29 sur milieu minimum enrichi à 5 % d'acide oléique.	91
Figure 34 : Microscopie avec fluorescence au rouge Nil de levures après 20 h de croissance sur milieu minimum enrichi avec 5 % d'acide oléique.	91
Figure 35 : Western blot avec des anticorps anti-Aox sur des extraits de <i>Y. lipolytica</i> .	92
Figure 36 : Dosage des acides gras dans les extraits totaux et les particules lipidiques isolées de <i>Y. lipolytica</i> .	94
Figure 37 : Electrophorèse sur des extraits totaux et des particules lipidiques isolées de <i>Y. lipolytica</i> et <i>S. cerevisiae</i> .	95
Figure 38 : Western blot sur des extraits totaux et des corps lipidiques de <i>Y. lipolytica</i> et <i>S. cerevisiae</i> .	96
Figure 39 : Balance de Langmuir : corps lipidiques de <i>Y. lipolytica</i> .	96
Figure 40 : Plasmide d'expression pET20b ( <i>E. coli</i> ).	103
Figure 41 : Plasmide d'expression pYEG1 ( <i>Y. lipolytica</i> ).	104
Figure 42 : Interactions entre la queue poly-histidine et la résine Ni-NTA.	108
Figure 43 : Structures de l'imidazole et de l'histidine.	110
Figure 44 : Diagramme de purification en conditions dénaturantes (urée 8 M) par technologie Ni-NTA.	110
Figure 45 : Appareil à angle de contact DSA10 (Krüss).	119
Figure 46 : Profil d'hydrophobie des oléosines d'amande et d' <i>A. thaliana</i> S3 et S4.	122
Figure 47 : Alignement de séquences d'acides aminés de 38 isoformes d'oléosines de graine.	124



Figure 48 : Longueur des segments N- et C- terminaux et central hydrophobe en fonction de la taille de l'oléosine. ....	125
Figure 49 : pI d'oléosines par segment.....	127
Figure 50 : Plasmide d'expression par sécrétion de S4 d' <i>A. thaliana</i> dans <i>Y. lipolytica</i> . ....	129
Figure 51 : Produits de PCR sur la séquence codant S4 (en vu de l'expression par <i>Y. lipolytica</i> ).....	129
Figure 52 : Séquence codante de l'oléosine S4 après digestion du plasmide pYEG1-S4.....	130
Figure 53 : Contrôle de la souche d'expression de S4 dans la levure par PCR sur de l'ADN génomique extrait .....	130
Figure 54 : Cultures de <i>Y. lipolytica</i> sauvage et exprimant l'oléosine S4 en milieu YPD, YPD + 5 % d'acide oléique et milieu minimum + 5 % d'acide oléique. ....	131
Figure 55 : Microscopie optique sur des levures <i>Y. lipolytica</i> sauvages et recombinantes. ....	131
Figure 56 : Western blot sur des corps lipidiques isolés de souches PO1D et Y4. Révélation à l'aide des anticorps anti-rS4 .....	132
Figure 57 : Mesure des diamètres hydrodynamiques des globules lipidiques des souches Y4 et PO1D à 20 °C .....	133
Figure 58 : Plasmides d'expression (pET-20b) de rS3 et rS4 dans <i>E. coli</i> .....	134
Figure 59 : Digestion et dépôt sur gel d'agarose des plasmides pET20b transformés avec rS3 et rS4.....	135
Figure 60 : Séquences nucléotidiques et protéiques de rS3 et rS4 clonées dans <i>E. coli</i> . ....	136
Figure 61 : Suivi par mesure de l' $A_{600\text{ nm}}$ de l'expression des oléosines par <i>E. coli</i> . ....	136
Figure 62 : Suivi par électrophorèse (coloration au bleu de Coomassie) de la production de rS3 et rS4 par <i>E. coli</i> .....	137
Figure 63 : Influence de la température sur la solubilisation des oléosines en urée 8 M (suivi par électrophorèse). ....	138
Figure 64 : Lyse de bactéries recombinantes avec 1 % d' $\alpha$ -DDM (électrophorèse sur les culots et surnageants). ....	139
Figure 65 : Suivi par mesure de l' $A_{280\text{ nm}}$ de la purification de rS4 en condition dénaturante et par électrophorèse sur rS3 et rS4 (coloration au bleu de Coomassie) .....	140
Figure 66 : Suivi par mesure de l' $A_{280\text{ nm}}$ de la purification de rS3 en condition dénaturante et en gradient d'imidazole. ....	141
Figure 67 : Révélation immunochimique d'oléosines dans des graines d' <i>A. thaliana</i> et dans des bactéries recombinantes à l'aide d'anticorps anti-rS4 et d'amande. ....	143

Figure 68 : Révélation immunochimique d'oléosines recombinantes purifiées à l'aide d'anticorps anti-penta-histidine .....	144
Figure 69 : Précipitation à l'acétone de rS3 et de rS4 (électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie). .....	145
Figure 70 : Solubilisation des oléosines dans un mélange TFA / TFE après précipitation à l'acétone (électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie). .....	146
Figure 71 : Solubilisation d'oléosines dans du chloroforme / méthanol (électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie).....	147
Figure 72 : Photographie d'oléosine en solution dans du chloroforme. ....	147
Figure 73 : Dilution d'oléosines purifiées en urée 8 M avec de l'eau ou des alcools (électrophorèse et coloration au bleu de Coomassie) .....	149
Figure 74 : Spectre de DC de rS4 en solution dans du TFA / TFE .....	151
Figure 75 : Première hypothèse de structure de l'oléosine S4 au sein de l'oléosome.....	152
Figure 76 : Deuxième hypothèse de structure secondaire de l'oléosine S4 au sein de l'oléosome. ....	152
Figure 77 : Évolution des viscosités des solvants des oléosines avec la température .....	154
Figure 78 : Diamètres hydrodynamiques d'oléosines solubilisées en TFA / TFE. ....	155
Figure 79 : Relation schématique de l'IFT avec la couverture de l'interface par les molécules .....	157
Figure 80 : Gouttes pendantes à l'interface avec l'air de protéines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5 à 0,05 g.L <sup>-1</sup> . Mesure de l'IFT pendant 2 h.....	158
Figure 81 : Gouttes pendantes à l'interface avec de l'huile de tournesol de protéines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5 à 0,05 g.L <sup>-1</sup> . Mesure de l'IFT pendant 2 h. ....	160
Figure 82 : Gouttes pendantes à l'interface avec de l'huile de tournesol de protéines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5. L'IFT à l'équilibre (après 2 h) est donnée en fonction de la concentration protéique . ....	161
Figure 83 : Balance de Langmuir et BAM : rS3 en solution dans l'urée sur un film d'eau ..	162
Figure 84 : Balance de Langmuir (BAM) : gouttes d'eau sur un film de rS3 en solution dans l'urée.....	163
Figure 85 : Balance de Langmuir et BAM : rS3 en solution dans du chloroforme sur un film d'eau. ....	164
Figure 86 : Représentation schématique d'une balance de Langmuir et de l'isotherme de compression d'une monocouche . ....	165
Figure 87 : Balance de Langmuir : chloroforme / méthanol sur un film de PC. ....	165

Figure 88 : Balance de Langmuir : Pi sur un film d'eau. ....	166
Figure 89 : Balance de Langmuir et BAM : 50 $\mu\text{g}$ de rS3 en chloroforme / méthanol sur un film de PC comprimé à 0, 5 ou 20 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	168
Figure 90 : Balance de Langmuir : 100 $\mu\text{g}$ de rS3 sur un film de PC à 5 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	168
Figure 91 : Balance de Langmuir et BAM : PC et rS3 préincubés dans du chloroforme sur un film d'eau .....	169
Figure 92 : Balance de Langmuir : rS3 et rS4 sur un film de PC à 5 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	170
Figure 93 : Balance de Langmuir : rS3 sur un film de PLs (PC ou Pi) à 5 $\text{mN.m}^{-1}$ .....	171
Figure 94 : Formules chimiques des PLs : PC, PE, Pi et PS à pH neutre.....	172
Figure 95 : Balance de Langmuir : relaxation du film de Pi à 5 $\text{mN.m}^{-1}$ et relaxation du film rS3 + Pi. ....	173
Figure 96 : Balance de Langmuir : hypothèse de l'organisation d'une monocouche de PLs et rS3 sur un film d'eau. ....	173

## Liste des annexes

Annexe 1 : Viscosités de l'eau de 10 à 50 °C.....	199
---	-----

## Abréviations

A : absorbance (U.A.)  
aa : acide aminé  
AGL : acide gras libre  
Amp : ampicilline  
AoxP : acyl-coA oxydase  
*A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*  
BET : bromure d'éthidium  
BMM : basse masse moléculaire  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CLHP : chromatographie liquide haute performance  
CMC : concentration micellaire critique  
CPG : chromatographie en phase gazeuse  
D : densité  
DC : dichroïsme circulaire  
DG : diglycéride  
dNTP : déoxynucléotide tri-phosphate  
EC : ester de cholestérol  
*E. coli* : *Escherichia coli*  
HDL : lipoprotéine de haute densité  
HLB : *hydrophilic lipophilic balance*  
HMM : haute masse moléculaire  
IFT : tension de surface ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ )  
IPTG : isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
Kana : kanamycine  
LB : Luria Bertani  
LDL : lipoprotéine de basse densité  
Leu : leucine  
n : indice de réfraction  
NBT / BCIP : *Nitrotetrazolium Blue chloride / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*  
ol : acide oléique  
p : poids

PC : phosphatidylcholine ou lécithine  
PCR : réaction de polymérisation en chaîne  
PE : phosphatidyléthanolamine  
PEG : polyéthylène glycol  
pI : point isoélectrique  
Pi : phosphatidylinositol  
PL : phospholipide  
PS : phosphatidylsérine  
RE : réticulum endoplasmique  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
rS3 : S3 d'*Arabidopsis thaliana* (18,5 kDa) recombinante avec une queue 6-histidine C-terminale  
rS4 : S4 d'*Arabidopsis thaliana* (21 kDa) recombinante avec une queue 6-histidine C-terminale  
SAB : sérum albumine bovine  
SDS-PAGE : électrophorèse de gel polyacrylamide en milieu dénaturant (*Sodium Dodécyl Sulfate*)  
SIR : spectroscopie infrarouge  
T : turbidité  
TBS : *Tris Buffer Sodium*  
TE : tampon Tris-HCl, EDTA  
TFA : acide trifluoro-acétique  
TFE : trifluoro-éthanol  
TG : triglycéride  
Ura : uracile  
v : volume  
VLDL : lipoprotéine de très basse densité  
*Y. lipolytica* : *Yarrowia lipolytica*  
YNB : *Yeast Nitrogen Base*  
YPD : *Yeast Peptone Dextrose*  
 $\beta$ -ME :  $\beta$ -mercaptoéthanol  
 $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire ( $L \cdot mole^{-1} \cdot cm^{-1}$ )  
 $\eta$  : viscosité (Pa.s)

# **Introduction**

## 1.1. Avant-propos

Les industriels sont toujours à la recherche de nouvelles protéines fonctionnelles, notamment de bioémulsifiants. Ces composés produits généralement par des microorganismes présentent une alternative aux produits dérivés du pétrole. Les plantes oléagineuses, cultivées dans nos régions, constituent un réservoir de protéines fonctionnelles abondantes. Nous avons donc choisi de nous intéresser à une protéine interfaciale d'origine végétale, l'oléosine. Cette protéine se trouve en quantité abondante à la surface des globules lipidiques de réserve des graines. Nos recherches ont été effectuées sur *Arabidopsis thaliana*, plante modèle de la biologie moléculaire. Par ailleurs, nous avons voulu savoir si une levure riche en huile et en corps lipidiques, *Yarrowia lipolytica* possédait de telles protéines autour de son corps lipidique. Nous décrivons, dans une première partie de cette introduction bibliographique, les bioémulsifiants. Puis dans une seconde partie, nous présentons les globules lipidiques des animaux, des levures et des plantes. Une troisième partie est consacrée aux oléosines. Enfin, nous justifions dans une dernière partie le choix d'*A. thaliana* et de *Y. lipolytica* pour notre étude.



## **1.2. Bioémulsifiants**

Malgré des coûts de production encore élevés, les émulsifiants dérivés de sources naturelles présentent des avantages sur les agents émulsifiants synthétisés chimiquement à partir de pétrole. Les bioémulsifiants sont en effet biodégradables et non toxiques (Banat, 2000). Du fait de la demande croissante de produits naturels par les consommateurs, les bioémulsifiants pourraient donc trouver des applications variées.

### **1.2.1. Définition**

Les bioémulsifiants sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes. Les émulsifiants s'accumulent aux interfaces et réduisent la tension de surface (Fiechter, 1992).

### **1.2.2. Rôle physiologique**

Le rôle physiologique des bioémulsifiants est de permettre aux microorganismes qui les produisent de se développer sur des substrats non miscibles à l'eau. En effet, les bioémulsifiants permettent l'émulsification de la source de carbone et ainsi l'augmentation de la surface des substrats hydrophobes insolubles dans l'eau. Ils augmentent aussi la biodisponibilité de ces substrats en augmentant leur solubilité apparente ou en les désorbant des surfaces. Ils régulent l'adhésion et le détachement des cellules aux surfaces. Certains ont la capacité de se lier aux métaux lourds, d'autres sont associés à la synthèse de produits pathogènes par les microorganismes et enfin, nombre de bioémulsifiants ont des propriétés antibiotiques qui jouent un rôle lors de la sporulation (Rosenberg et Ron, 1999 ; Ron et Rosenberg, 2001).

### **1.2.3. Caractéristiques d'émulsifiants**

Les émulsifiants sont caractérisés selon leur capacité à abaisser la tension interfaciale (IFT) et leur concentration micellaire critique (CMC). L'IFT de référence de l'eau pure avec de l'air est d'environ  $73 \text{ mN.m}^{-1}$  à  $20 \text{ °C}$ . La CMC est la concentration à partir de laquelle l'émulsifiant en solution dans l'eau se rassemble sous la forme de micelles. Lorsque la concentration d'un émulsifiant est supérieure à sa CMC, il tend à s'auto-agréger (Gupta et Muralidhara, 2001). Une brutale variation de l'IFT est associée à ce phénomène.

L'HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*) permet de caractériser un émulsifiant, généralement de basse masse moléculaire (BMM). L'HLB est notée sur 20 (Stauffer, 1999 ; De Gennes *et*

*al.*, 2002). Plus le nombre de sites hydrophiles est important dans la molécule par rapport au nombre de sites hydrophobes, plus l'HLB sera élevée et plus l'émulsifiant sera soluble dans l'eau. Un émulsifiant est généralement soluble dans la phase continue de l'émulsion ; ainsi des émulsifiants ayant des HLB comprises entre 3 et 6 favoriseront des émulsions eau dans huile et des valeurs de 8 à 18 des émulsions huile dans eau (Meylheuc *et al.*, 2001).

On peut ici opposer deux types d'émulsifiants : ceux de BMM et ceux de haute masse moléculaire (HMM). Les bioémulsifiants de BMM sont les glycolipides et les lipopeptides. Ceux de HMM sont généralement des polysaccharides amphiphiles, des protéines, des lipopolysaccharides, des lipoprotéines ou des mélanges de ces biopolymères. En effet, les protéines ont des activités de surface permettant la diminution de la tension interfaciale de fluides. Les bioémulsifiants de BMM abaissent les tensions de surface et interfaciale plus fortement que les protéines mais les bioémulsifiants de HMM sont plus efficaces dans la stabilisation d'émulsions huile dans eau. Les émulsions et les mousses formées par des protéines sont plus résistantes à la coalescence (Rosenberg et Ron, 1999). Les phénomènes d'adsorption et de désorption des protéines sont beaucoup plus lents que ceux mis en jeu par les émulsifiants de BMM. Le Tableau 1 donne les caractéristiques générales des émulsifiants de BMM et des protéines. Le classement des émulsifiants de BMM est basé soit sur la charge de leur tête, soit sur leur capacité à se dissoudre dans une phase aqueuse ou huileuse, selon leur HLB. En fait, dans de nombreux systèmes alimentaires, les émulsifiants de BMM, tels que les phospholipides (PLs), sont utilisés en association avec des protéines (Bos et Van Vliet, 2001).

**Tableau 1 : Caractéristiques générales des propriétés interfaciales des émulsifiants de BMM et des protéines (à saturation à l'interface) (d'après Bos et Van Vliet, 2001).**

<b>propriétés interfaciales</b>	<b>émulsifiants de BMM</b>	<b>protéines</b>
nombre de molécules ( $\text{mol.m}^{-2}$ )	$10^{-5}$	$10^{-7}$
taux adsorbé ( $\text{mg.m}^{-2}$ )	1,0-2,0	2,0-3,0
adsorption	réversible	pratiquement irréversible
affinité pour l'interface	plutôt faible	plutôt forte
forme et taille des molécules	cylindrique (1x1x2 nm)	souvent globulaire (4-5 nm)
changements de conformation à l'adsorption	non	oui
épaisseur du film à l'équilibre air / eau / air (nm)	40 nm ou moins	4 nm
IFT ( $\text{mN.m}^{-1}$ ) à l'interface air / eau	42-22	57-47
diminution de l'IFT à l'adsorption air / eau	30-50	15-25
bulles dans les mousses	grosses	petites

#### **1.2.4. Grandes classes de bioémulsifiants d'origine microbienne**

Les bioémulsifiants étudiés sont essentiellement d'origine microbienne. Ils ont été répartis en quatre classes selon leur nature chimique.

##### **1.2.4.1. Émulsifiants glycolipidiques**

Des espèces telles que *Torulopsis*, *Pseudomonas* ou *Arthrobacter* ont la capacité de synthétiser des sophorose-, rhamnose-, tréhalose- (Figure 1), saccharose- et fructose-lipides, les espèces *Candida* et *Shizonella* des lipides mannosyl érythritol et *Usilago zae* des lipides cellobiose (Fiechter, 1992).

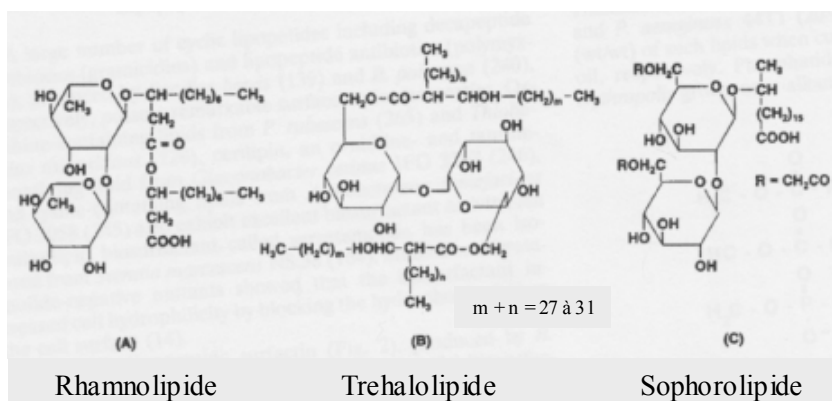


Figure 1 : Structures de quelques bioémulsifiants glycolipidiques. (A) rhamnolipide de type I produit par *Pseudomonas aeruginosa*. (B) trehalose dimycolate par *Rhodococcus erythropolis*. (C) sophorolipide par *Torulopsis bombicola* (d'après Fiechter, 1992).

#### 1.2.4.2. Complexes lipides-polysaccharides

Un exemple représentatif de ce groupe est l'émulsane, produit par *Acinetobacter calcoaceticus*. C'est un lipopolysaccharide polyanionique extracellulaire (Figure 2).

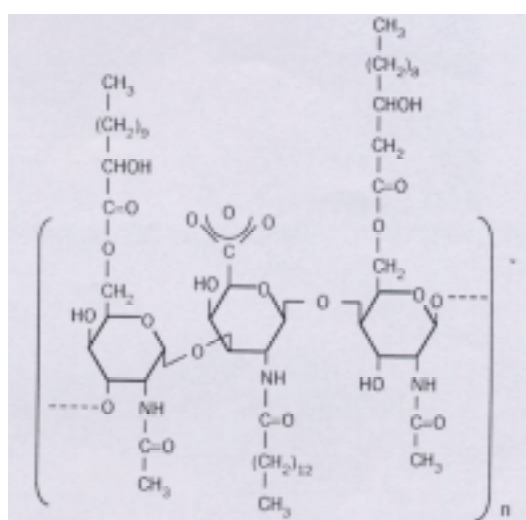


Figure 2 : Structure de l'émulsane produit par *Acinetobacter calcoaceticus*, lié à un acide gras (d'après Desai et Banat, 1997 ; Meylheuc *et al.*, 2001).

#### 1.2.4.3. Bioémulsifiants lipides-acides aminés

- La surfactine, produite par *Bacillus subtilis*, est à ce jour l'un des bioémulsifiants les plus efficaces. Elle est composée d'un anneau de sept résidus d'acides aminés (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) couplé à une molécule de 3-hydroxy-13-acide méthyltétradécanoïque (Figure 3). Elle a une importante activité de surface et des propriétés biologiques (activités antivirale, antibactérienne, hémolytique), qui proviennent de sa capacité à interagir avec des biomembranes (Deleu *et al.*, 1999 ; Grau *et al.*, 1999).

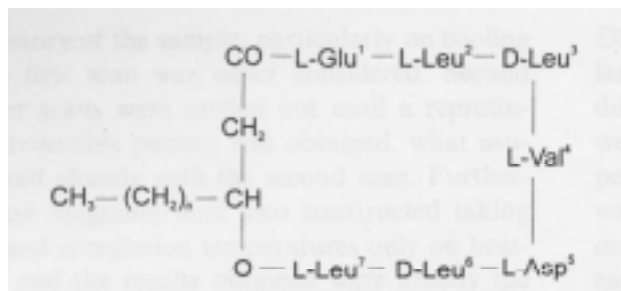


Figure 3 : Structure primaire de la surfactine (n= 9 à 11) (Grau *et al.*, 1999).

La densité et la stabilité des mousses formées en présence de surfactine dépendent des caractéristiques d'hydrophobie de la chaîne alkyl et des propriétés moléculaires intrinsèques à la protéine. Ainsi les mousses les plus stables et la meilleure capacité à former des mousses ont été obtenus avec des chaînes de quatorze atomes de carbone (Razafindralambo *et al.*, 1998). Lorsque les acides aminés sont modifiés par de l'acide sulfonique aminométhane, l'activité de surface de la surfactine est très affaiblie, certainement du fait de répulsions de charges et de distorsions structurales inhibant la formation de micelles. L'activité est meilleure à pH alcalin qu'acide (Morikawa *et al.*, 1999).

- D'autres lipopeptides ont été mis en évidence, tels que la subtiline produite par *Bacillus subtilis* (Shepherd *et al.*, 1995) ou la lichenysine A. La lichenysine A produite par *Bacillus licheniformis* est un lipopeptide cyclique dont la structure est donnée dans la Figure 4. Sa séquence peptidique est proche de la surfactine, mais son pouvoir surfactant est supérieur et il est un très bon agent chélatant des cations. Il possède en outre une CMC très basse (Grangemard *et al.*, 2001).

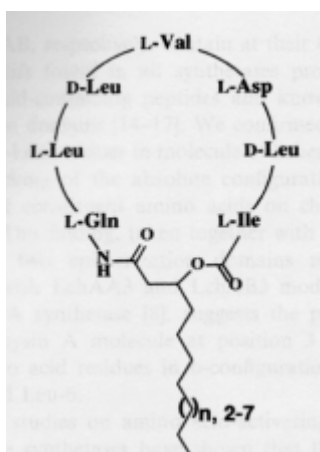


Figure 4 : Structure générale de la lichenysine A (Yakimov *et al.*, 1999).

#### 1.2.4.4. Substances assimilées à des protéines

- Cirigliano et Carman (1984) ont mis en évidence la synthèse d'un émulsifiant par la levure *Yarrowia lipolytica* uniquement lorsqu'elle est cultivée sur des substrats carbonés non miscibles à l'eau. Le liposan produit possède un pouvoir émulsifiant pour des pH acides ou neutres. Il est stable entre 30 et 90 °C et son activité n'est pas dépendante d'ions métalliques. Il est soluble dans l'eau. Après purification, il peut servir à stabiliser un grand nombre d'émulsions huile dans eau. En 1985, Cirigliano et Carman ont déterminé que le liposan était constitué à 83 % de sucres (hétéropolysaccharide de glucose, galactose, galactosamine et acide galacturonique) et à 17 % de protéines. Si son pouvoir émulsifiant et stabilisateur est inférieur aux Triton (80, 20 et X-100), il a un meilleur pouvoir émulsifiant que les caséines, les alginates, le dextran et il est meilleur stabilisateur que les caséines, les pectines et le dextran.
- L'alsane produite par *Acinetobacter radioresistens* KA53 est constituée d'un polysaccharide et de trois protéines. Sa composante protéique fait 35,77 kDa et comporte quatre régions hydrophobes. Ces quatre régions constituent des sites de liaisons hydrophobes qui permettent à la protéine d'avoir une conformation correcte à la surface des gouttelettes lipidiques et préviennent ainsi la coalescence (Toren *et al.*, 2002).
- Un bioémulsifiant est produit par une souche de *Bacillus* lorsqu'elle est cultivée en présence de pesticides organophosphorés (Patel et Gopinathan, 1986). Il permet l'émulsion des substrats non miscibles. Ce glycopeptide a une haute masse moléculaire, il est thermostable. Un tel bioémulsifiant pourrait avoir des applications dans la formulation de pesticides ou dans leur retraitement.
- Cameron et ses collaborateurs (1988) ont montré qu'une mannoprotéine, composante majoritaire de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*, était un bioémulsifiant efficace : les émulsions stabilisées sont résistantes au cours de cycles de congélation / décongélation. Torabizadeh *et al.* en 1996 ont purifié ce bioémulsifiant : sa masse moléculaire est de 14 à 15,8 kDa et à partir de 1 kg de cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, 100 g de mannoprotéine peuvent être récupérés.

#### 1.2.5. Applications

Les applications potentielles des molécules surfactantes microbiennes sont l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité.

Ainsi, les déchets de type huiles de friture constituent un très bon substrat pour le développement d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* et la production d'un bioémulsifiant de type rhamnolipide (Haba *et al.*, 2000).

Les applications potentielles de la surfactine sont les suivantes : la biodégradation de déchets d'hydrocarbures (Moran *et al.*, 2000), l'enlèvement des métaux lourds de sédiments (Mulligan *et al.*, 2001). Elle possède de plus une forte activité destabilisatrice de membranes et un pouvoir antibiotique (Heerklotz et Seelig, 2001).

Certaines molécules émulsifiantes se placent à la surface de globules lipidiques et les stabilisent.

### **1.3. Globules lipidiques**

#### **1.3.1. Généralités**

Les lipides sont des constituants primordiaux des cellules : ils ont un rôle structural et ce sont des intermédiaires métaboliques, des messagers inter- et intra- cellulaires, des sites de reconnaissance à la surface des cellules et des produits de stockage. Les corps lipidiques de réserve sont souvent constitués de triglycérides (TGs), lipides non chargés. Ces corps lipidiques ne jouent pas de rôle dans l'organisation des membranes ou dans la signalisation. En plus du stockage de lipides, les animaux sont capables de transporter les lipides, insolubles dans leur système circulatoire, sous la forme de lipoprotéines. Ces corps lipidiques de transport animaux sont très proches morphologiquement des corps lipidiques de réserve végétaux, microbiens et animaux. Ils consistent tous en un cœur de lipides neutres entouré d'une monocouche de PLs dans laquelle s'insèrent des protéines spécifiques (Murphy, 1990). Dans ce chapitre, nous avons choisi de développer quelques exemples de corps lipidiques significatifs pour notre étude.

#### **1.3.2. Animaux**

En 1972, Christiansen et Jensen étudient les particules lipidiques du muscle cardiaque bovin. Ils en déduisent l'organisation tripartite : un cœur de triglycérides (TGs), entouré d'une couche de PLs et de protéines. Il existe deux sortes de globules lipidiques animaux : ceux de transport et ceux de réserve.

### **1.3.2.1. Rôle physiologique**

- *De transport*

Les TGs, PLs, cholestérol et esters de cholestérols sont transportés dans le plasma humain en association avec des protéines sous forme de lipoprotéines. Les lipoprotéines sont classées selon leur densité : les HDL (lipoprotéines de haute densité : 1,063 à 1,210), LDL (lipoprotéines de basse densité : 1,019 à 1,063), VLDL (lipoprotéines de très basse densité : 0,95 à 1,006) et les chylomicrons (particules de très basse densité : 0,9 à 0,95) (Davis et Vance, 1996).

Le rôle des VLDL est de transporter les TGs du foie aux tissus périphériques. Celui des LDL est de transporter le cholestérol dans la circulation vers les cellules. Les LDL sont les principaux accepteurs d'esters de cholestérol dans le plasma. Les chylomicrons sont des gouttelettes hydrosolubles. Leur rôle est d'assurer le transport des TGs du tube digestif vers la lymphe puis vers le sang. Les TGs sont ensuite hydrolysés dans la circulation sanguine par la lipoprotéine lipase.

- *De réserve*

Les adipocytes sont les cellules stockant les lipides dans les tissus adipeux des mammifères, des oiseaux, des reptiles et des amphibiens. Le tissu adipeux blanc, réserve d'énergie, est la forme la plus répandue. Le tissu adipeux brun est richement vascularisé et est principalement trouvé chez les fœtus où il a un rôle thermogénique. Les adipocytes du tissu adipeux blanc ont des diamètres de 25 à 200 µm (respectivement 2 à 30 µm dans le tissu brun).

### **1.3.2.2. Protéines associées**

La composition principale des différents globules est décrite dans le chapitre 1.3.5 (Tableau 4, Rawn, 1989).

- *Activités enzymatiques*

Sivaram et ses collaborateurs (1994) ont montré que la lipoprotéine lipase, principale enzyme responsable de l'hydrolyse des TGs des lipoprotéines circulantes dans le plasma, s'associait avec l'extrémité N-terminale de l'apolipoprotéine (apo) B humaine.

- *Protéines de structure*

L'apo B humaine est une glycoprotéine existant sous deux formes : B-100 (549 kDa) et B-48 (264 kDa). Elle comporte un domaine C-terminal d'association aux lipides. L'extrémité N-terminale de l'apo B humaine est relativement hydrophile et riche en ponts disulfures. Elle est



composée de cinq parties comportant deux feuillets  $\beta$  et trois hélices  $\alpha$  (Sivaram *et al.*, 1994). C'est la protéine majoritaire des LDL du plasma sanguin et, ainsi que l'apo E, un constituant des VLDL. Le motif structural commun des apolipoprotéines A, C et E associées aux lipides est l'hélice  $\alpha$  amphiphile. Les hélices  $\alpha$  agissent comme des détergents protéiques qui stabilisent la taille et la structure des particules lipoprotéiques (Segrest *et al.*, 2000).

Peu de protéines associées aux adipocytes ont été identifiées. Il s'agit majoritairement d'adipophilines (50 kDa) dans les cellules en différenciation, puis de périlipines (périlipines A B et C, 56, 46 et 42 kDa) dans les étapes plus tardives de maturation des globules. Les périlipines joueraient un rôle important dans la fusion des corps lipidiques pour la formation des adipocytes ainsi que dans la régulation de l'activité lipasique (Greenberg *et al.*, 1991 et 1993 ; Murphy, 2001).

### **1.3.3. Microorganismes**

Les données disponibles actuellement sur les globules lipidiques microbiens concernent essentiellement la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ses globules lipidiques ont un diamètre moyen de 0,3-0,4  $\mu\text{m}$ , mais il existe aussi des particules de diamètre compris entre 1,2 et 1,6  $\mu\text{m}$ . Ils sont entourés d'une membrane de 4 à 5 nm d'épaisseur, ce qui pourrait correspondre à une monocouche de PLs (Zinser et Daum, 1995).

- *Composition du cœur des globules*

Clausen et ses collaborateurs (1974) ont déterminé la composition des globules lipidiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Ils sont constitués à 90-95 % de TGs et d'esters de stérols (en quantités égales). Ces données ont été affinées par Leber *et al.* en 1994 : les esters stéryliques représentent 44,4 % du globule, les TGs 51,2 %, les stérols moins de 0,3 % et les squalènes 0,5 %. Les esters de stérols comportent essentiellement des acides gras insaturés ce qui suggère un rôle des globules lipidiques non seulement dans le stockage d'énergie, mais aussi dans la synthèse des membranes.

- *Composition en PLs*

Les phospholipides représentent 1,3 % en masse du corps lipidique. Il s'agit à 36,4 % de phosphatidylcholine (PC), 31,6 % de phosphatidylinositol (PI), 20 % de phosphatidyléthanolamine (PE), 5,4 % de phosphatidylsérine (PS), 3,9 % de diméthyl-PE et 2,7 % d'acide phosphatidique (Leber *et al.*, 1994). La PC est toujours le PL majoritaire des membranes des globules lipidiques. Mais celles de la levure sont aussi particulièrement riches en PLs chargés (Pi et PS).

- *Protéines*

Les protéines représentent 2,6 % en masse des globules gras. Les protéines majoritaires ont des masses moléculaires de 72, 52, 50, 43, 36 et 34 kDa (Zinser et Daum, 1995). La protéine de 43 kDa réagit avec un anticorps anti-apolipoprotéine AII humaine (Keesler *et al.*, 1992 ; Leber *et al.*, 1994). Cette protéine pourrait servir de transporteur d'esters ou être une composante des enzymes d'estérification / d'hydrolyse (Keesler *et al.*, 1992).

En 1991, Zinser *et al.* ont trouvé des activités spécifiques d'acyltransférase glycérol-3-phosphate et de méthyltransférase stérol  $\Delta^{24}$  (protéine de 43 kDa) dans des fractions de particules lipidiques. Elles sont riches en esters d'ergostérols.

Une squalène époxydase a été trouvée dans les corps lipidiques de la levure, son activité n'est détectable qu'en présence de facteurs liés au RE (Leber *et al.*, 1998).

Pour l'instant, aucune protéine stabilisatrice de corps lipidiques, telle qu'il en existe chez les végétaux (chapitre 1.4.), n'a été trouvée chez la levure. Les PLs sont sensibles à l'attaque par la phospholipase, ils sont donc exposés à la surface des corps lipidiques (Leber *et al.*, 1994) et ne sont donc vraisemblablement pas protégés par des protéines.

#### **1.3.4. Graines des végétaux soumis à dessiccation**

Bien que des particules sphériques de réserves lipidiques, sphérosomes, aient été mises en évidence dans certaines parties des végétaux dès 1922 par Dangeard, ce n'est qu'au début des années 1970 que leur organisation a été décrite par Yatsu et ses collaborateurs.

En 1971, dans les oignons, les choux et les graines de coton, ils observent ainsi des corps lipidiques de diamètre 1  $\mu\text{m}$ , qui réfractent la lumière du microscope et qui paraissent entourés d'une simple membrane. Afin de confirmer la nature membranaire de la surface des sphérosomes, en 1972, Yatsu et Jacks observent par microscopie électronique des corps lipidiques d'arachide et étudient les protéines associées à la demi-membrane. Ils montrent une ressemblance de morphologie entre les globules lipidiques végétaux et, notamment, les chylomicrons et les adipocytes animaux. De plus, les protéines associées extraites présentent bien des caractéristiques de protéines membranaires (insolubles à pH neutre et ayant une forte proportion d'acides aminés hydrophobes).

##### **1.3.4.1. Localisation des corps lipidiques de réserve de la graine**

L'organisation microscopique du cotylédon et de l'albumen d'une graine de soja est reproduite sur la Figure 5. Les corps lipidiques se trouvent dans les cellules palissadiques du cotylédon.

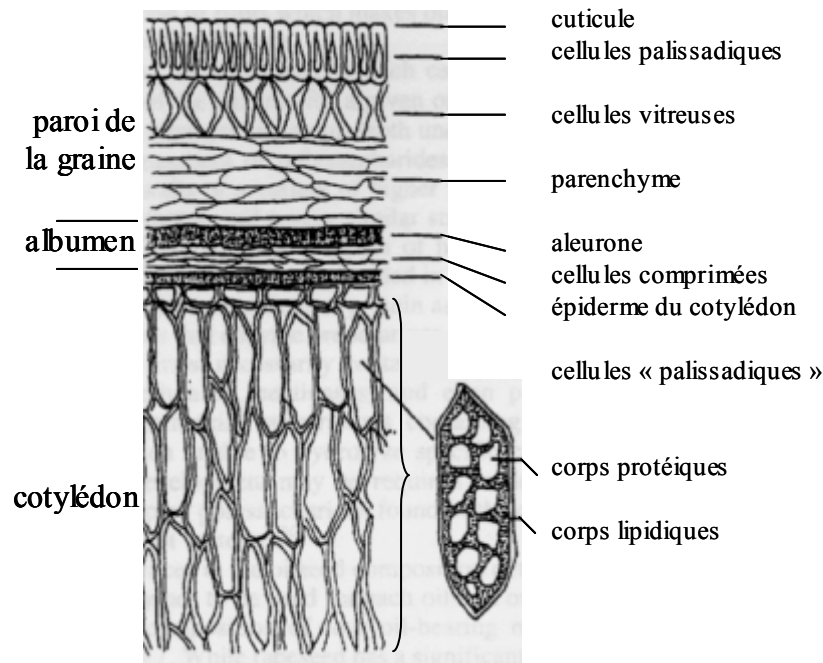


Figure 5 : Organisation du cotylédon et de l'albumen de graine de soja (schéma publié par Rosenthal *et al.*, 1996).

Des corps lipidiques sont non seulement présents dans la graine, mais aussi dans le pollen et dans les racines. Ceci sera abordé dans le chapitre 1.4.4.

#### 1.3.4.2. Structure des organites de réserve

En 1980, Slack et ses collaborateurs ont étudié la composition des corps lipidiques isolés à partir de cotylédons en développement de lin et de carthame. Chez les deux espèces végétales, et quel que soit le stade de maturité des cotylédons, le diamètre moyen des corps lipidiques est de 1,4  $\mu\text{m}$  et pour 1000  $\mu\text{mol}$  de TGs, il y a 4,3  $\mu\text{mol}$  de 3-*sn*-PC et 25,5  $\mu\text{mol}$  de diglycérides (DGs). Les protéines représentent 2,4 % en masse des glycérides. En 1989, Murphy et Cummins ont quantifié les contenus en protéines, TGs et PLs de corps lipidiques isolés à partir de graines de chou, moutarde, radis, *A. thaliana*, soja, tournesol et maïs. Ils ont trouvé les pourcentages suivants en masses : TGs / protéines / PLs (80 / 15 / 2). Tzen et Huang (1992) ont isolé des corps lipidiques de maïs. L'analyse des constituants donne les proportions suivantes (en masses) : TGs et DGs / PLs / protéines, 97,7 % / 0,9 % / 1,4 %. La composition en lipides neutres d'oléosomes isolés à partir de cotylédons de tournesol en développement est d'environ 98 % de TGs, 0,8 % de DGs, 0,1 % d'esters de stérols (Millichip *et al.*, 1996). Les PLs occupent 80 % de la surface du globule lipidique et le reste est occupé par des protéines. Par des calculs d'encombrement de la surface d'une sphère, Beisson *et al.* (1996) ont estimé un rapport PLs / TGs dans l'oléosome de 0,0115. Tzen *et al.* (1993) ont

réalisé des dosages qualitatifs et quantitatifs des constituants lipidiques et protéiques d'oléosomes de plusieurs espèces végétales. Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau 2. Les corps lipidiques des graines soumises à dessiccation ont un diamètre compris entre 0,2 et 3  $\mu\text{m}$ . Globalement, il y a toujours plus de 94 % de lipides neutres (essentiellement des TGs), 0,4 à 2 % de PLs et 0,5 à 4 % de protéines (Tableau 2). Les divergences entre équipes de recherche proviennent certainement des modes de préparation des oléosomes, plus ou moins corrosifs et des méthodes de quantification. Le rapport lipides neutres / protéines et PLs est corrélé à la taille des organelles.

**Tableau 2 : Diamètres moyens et constituants chimiques de corps lipidique isolé à partir de graine d'espèce végétale variée (d'après Tzen *et al.*, 1993).**

	colza	moutarde	coton	lin	maïs	arachide	sésame
diamètre ( $\mu\text{m}$ )	0,65	0,73	0,97	1,34	1,45	1,95	2,00
constituants (% en masse)							
lipides neutres	94,21	94,64	96,99	97,65	97,58	98,17	97,37
protéines	3,46	3,25	1,70	1,34	1,43	0,94	0,59
PLs	1,97	1,60	1,18	0,90	0,91	0,80	0,57
acides gras libres	0,36	0,17	0,13	0,11	0,09	0,09	0,13

- *PLs*

Le PL majoritaire des corps lipidiques est la PC, les minoritaires sont la PS, la PE et le Pi (Huang, 1992, Tzen *et al.*, 1993, Tableau 3).

**Tableau 3: Composition en phospholipides de corps lipidique isolé à partir de graine d'espèce végétale variée (% en masse) (d'après Tzen *et al.*, 1993).**

	amande <sup>*</sup>	tournesol <sup>**</sup>	colza	moutarde	coton	lin	maïs	arachide	sésame
PC	60	79	59,9	53,1	58,6	57,2	64,1	61,6	41,2
PE	12	13	5,9	15,5	4,6	2,8	8,1	5,0	15,8
PI	25	8	14,0	13,1	18,1	6,9	7,6	8,4	20,9
PS			20,2	18,3	18,7	33,1	20,2	25,0	22,1

\* et 3 % d'acide phosphatidique, d'après Beisson *et al.* (2001a)

\*\* d'après Millichip *et al.* (1996)

- *Protéines*

Seules les graines soumises à dessiccation ont des globules lipidiques de petite taille, totalement recouverts de protéines (Leprince *et al.*, 1997). Ainsi, les corps lipidiques du

mésocarpe de l'avocat sont quasiment dépourvus de protéines à leur surface et ils ont un diamètre très important (de l'ordre de 20  $\mu\text{m}$ ) (Ross *et al.*, 1993). C'est pourquoi nous nous intéressons principalement dans ce manuscrit aux espèces végétales soumises à dessiccation.

◆ *Protéines de structure*

Slack *et al.*, en 1980, mettent en évidence 4 protéines majoritaires dans le lin et le carthame, dont une de 17,5 kDa et une de 15,5 kDa. Dans le soja, Herman (1987) décrit la présence de protéines de 34, 24, 18 et 17 kDa, très riches en acides aminés hydrophobes. Les protéines majoritaires du corps lipidique sont les oléosines (chapitre 1.4). Des oléosines de maïs présentent des pI alcalins, et une grande hydrophobie. Les oléosines comportent la plus longue séquence hydrophobe connue à ce jour, 70 acides aminés (Qu et Huang, 1990).

A côté des oléosines, de nouvelles protéines ont été découvertes associées aux globules lipidiques de sésame (Chen *et al.*, 1998). Ces protéines tout d'abord dénommées Sop1, Sop2 et Sop3 ont des masses moléculaires de 27, 37 et 39 kDa. Contrairement aux oléosines, Sop 1 et 2 possèdent plus de résidus d'acides aminés hydrophiles qu'hydrophobes et Sop3 a une quantité équivalente de résidus hydrophiles et hydrophobes. De plus, Sop3 est composée à plus de 38 % de résidus de glycine.

Sop1 possède un domaine N-terminal comportant un seul site de fixation au calcium, le domaine «  $\text{Ca}^{2+}$ -binding EF hand » et elle est exprimée en réponse à l'acide abscissique ou au stress osmotique. L'activité de Sop1 est de plus certainement modulée par la présence de calcium ainsi que par phosphorylation (Frandsen *et al.*, 2001). Cette protéine a une masse moléculaire de 27,4 kDa chez le riz. Elle correspond à la protéine découverte par Frandsen *et al.* en 1996, qui a la capacité de se lier au calcium. Elle a donc été nommée « caléosine » par Chen *et al.* en 1999. Les caléosines pourraient jouer un rôle dans les fusions de membranes et de corps lipidiques (Murphy *et al.*, 2000). Elles comportent un segment central hydrophobe de 30 résidus d'acides aminés ainsi qu'une région adjacente riche en proline (Naested *et al.*, 2000). Leur sous-domaine comportant le nœud proline est crucial pour l'adressage des caléosines vers l'oléosome (Chen et Tzen, 2001). Chez le colza, une isoforme de 25 kDa de caléosine est retrouvée uniquement à la surface des corps lipidiques alors qu'une isoforme de 27 kDa est liée au réticulum endoplasmique (RE). Dans le génome d'*A. thaliana*, il y a sept gènes codant des caléosines, deux d'entre eux correspondant aux caléosines de 25 et 27 kDa très exprimées chez les crucifères (Hernandez-Pinzon *et al.*, 2001).

◆ *Protéine dotée d'activité enzymatique*

Sop2 existe dans les corps lipidiques des graines en développement d'espèces variées. Sop2 possède un segment hydrophobe d'attache précédant un domaine soluble qui est homologue aux stéroïdes réductases / déshydrogénases intervenant dans la biosynthèse et l'inactivation des hormones stéroïdes animales. Cette protéine a donc été nommée « stéroléosine ». Contrairement aux oléosines et aux caléosines, le motif proline des stéroléosines n'est pas central, mais il est situé à l'extrémité N-terminale hydrophobe (Figure 6). Huit protéines hypothétiques de type stéroléosine ont été trouvées dans le génome d'*A. thaliana*. Elles ont en commun un sous-domaine de liaison au NADPH mais des sous-domaines de liaison aux stéroïdes variés. Ainsi, les stéroléosines pourraient être une classe de déshydrogénases / réductases jouant un rôle dans la transduction du signal par les stéroïdes (Lin *et al.*, 2002).

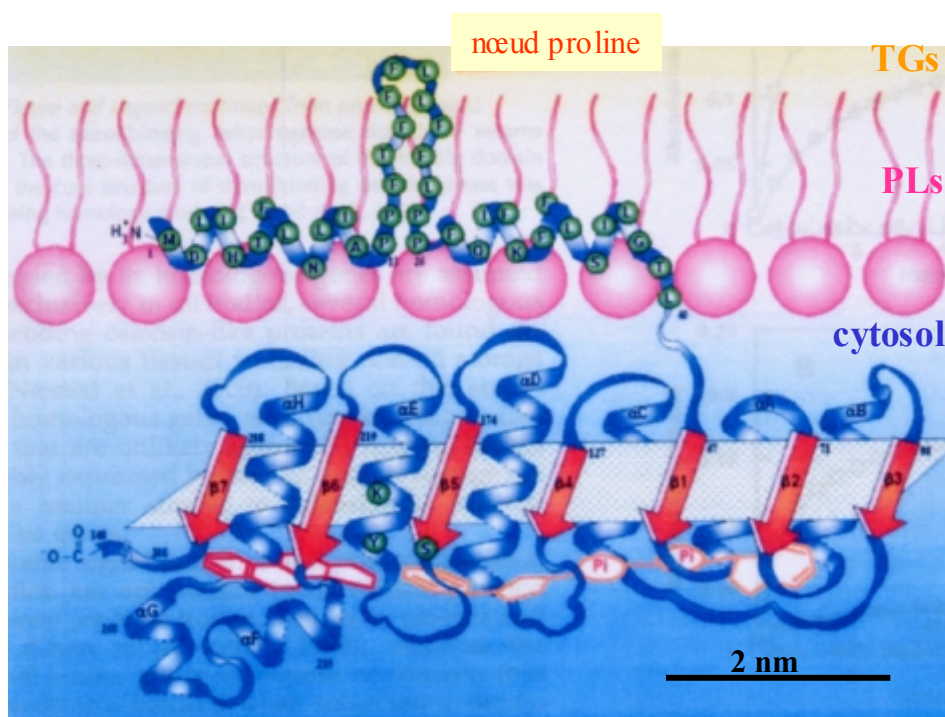


Figure 6 : Hypothèse de structure d'une stéroléosine (Sop2) de sésame (d'après Lin *et al.*, 2002).

◆ *Autres activités enzymatiques*

Huang (1992) a mis en évidence la présence d'une petite quantité d'une réductase du cytochrome c dans la fraction membranaire des oléosomes.

Matsui *et al.* (1999) mettent en évidence la présence d'une lipoxygénase à la surface de corps lipidiques de cotylédons de concombre en phase de post-germination. Valencia-Turcotte et Rodriguez-Sotres (2001) ont détecté une di-acylglycérol-acyltransférase (DAGAT) dans des corps lipidiques purifiés de maïs.

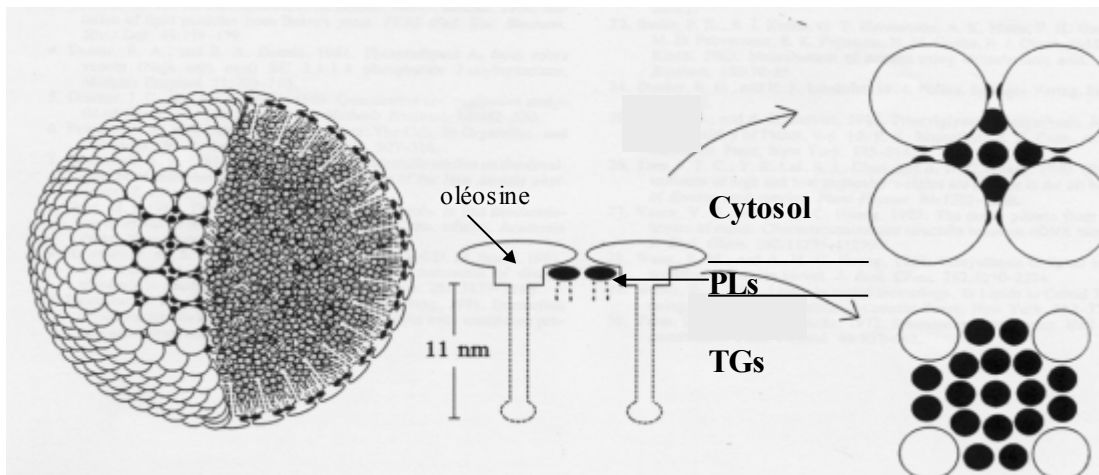
Lin et Huang (1984) ont isolé une lipase à partir de corps lipidiques de maïs. C'est une protéine hydrophobe de 65 kDa, associée à la membrane des corps lipidiques.

Les corps lipidiques de l'herbe de la Trinité, seules Bryophytes à posséder des corps lipidiques, possèdent des enzymes de la biosynthèse des isoprénoïdes. Les corps lipidiques pourraient donc jouer un rôle dans le métabolisme cellulaire, en plus de leurs fonctions d'accumulation et de séquestration d'huile (Suire *et al.*, 2000).

Il serait intéressant de savoir si les protéines à activité enzymatique sont constitutives du corps lipidique ou simplement associées à un moment donné du développement de la graine.

- *Modèles d'organisation de l'oléosome*

Un premier modèle de l'organisation des oléosomes végétaux est proposé (Figure 7). Les oléosines sont enchassées dans la monocouche de PLs avec pour un monomère d'oléosine, 13 molécules de PLs.



**Figure 7 : Modèle d'un corps lipidique du maïs (Tzen et Huang, 1992).**

Le modèle a été amélioré récemment en tenant compte de la présence des protéines Sop1 (ou caléosine), Sop2 (stéroléosine) et Sop3 (Figure 8).

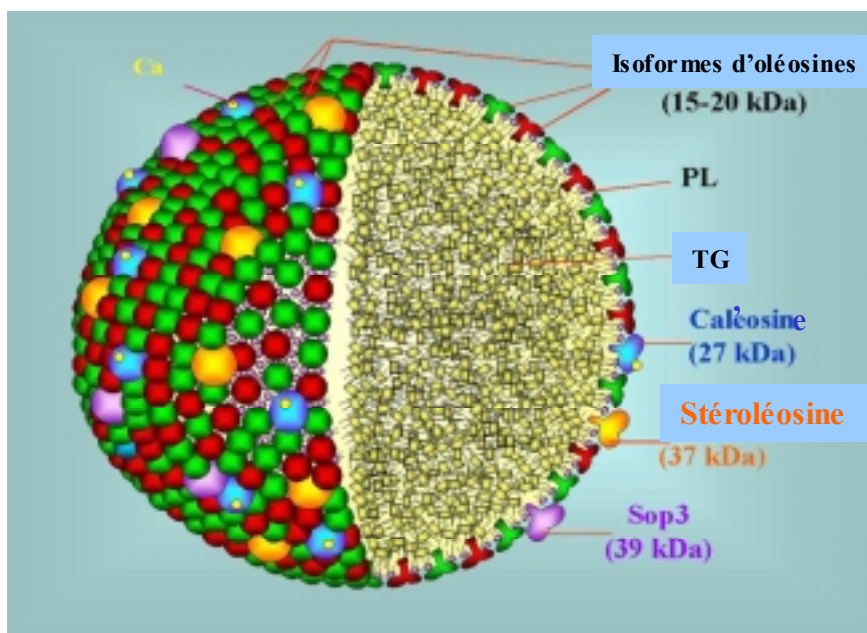


Figure 8 : Diagramme d'un corps lipidique (Frandsen *et al.*, 2001).

### 1.3.4.3. Caractéristiques physico-chimiques

Chez les espèces végétales soumises à dessiccation, les corps lipidiques de réserve des graines doivent être très résistants à la dessiccation, à la réhydratation, au chauffage et au refroidissement avant la germination de la graine et la mobilisation des réserves (Murphy et Cummins, 1989). En revanche, les corps lipidiques des plantes non soumises à dessiccation, telles que le cacao, ont des corps lipidiques de taille supérieure et ils coalescent rapidement (Leprince *et al.*, 1997). Du fait de leur forte teneur en TGs, la densité des globules lipidiques végétaux est proche de celle de l'huile, soit 0,92 (Tzen *et al.*, 1993). La surface des oléosomes est hydrophile et hydratée (Tzen et Huang, 1992). Les oléosomes des végétaux soumis à dessiccation sont complètement dispersés en solution de pH 7,1 à 8,3, en revanche, ils forment de gros agrégats réversibles entre pH 3,9 et 6,7 (Slack *et al.*, 1980 ; Tzen *et al.*, 1992). Leurs points isoélectriques (pI) sont compris entre 5,7 et 6,6, ils sont donc tous chargés négativement en surface à pH 7,2 (Tzen *et al.*, 1992 ; Tzen *et al.*, 1993). Slack *et al.* (1980) ont montré que des corps lipidiques incubés avec une phospholipase gardaient leur individualité, malgré l'hydrolyse de la PC, mais qu'ils coalesçaient en présence d'une lipase. Murphy et Cummins (1989) ont mis en évidence la grande résistance des oléosomes à l'attaque par des détergents (SDS) à température ambiante. Seul un chauffage prolongé en SDS permet une solubilisation partielle de leurs protéines. De plus, les corps lipidiques sont isolés à partir des tissus végétaux par homogénéisation des tissus puis par des centrifugations



répétées (voir chapitre 2.2). Suite à de tels traitements, ils ne coalescent pas et les protéines restent associées à leur surface.

La stabilité des corps lipidiques des végétaux soumis à dessiccation repose sur deux facteurs : l'encombrement stérique des protéines et la surface chargée négativement (Tzen et Huang, 1992).

#### **1.3.4.4. Mobilisation des réserves**

La biogénèse des oléosomes sera développée dans le chapitre 1.4.3. et nous traitons ici de leur disparition. Lors de la germination, les lipides de réserve des graines sont mobilisés. Le chemin est le suivant : les TGs de l'oléosome sont tout d'abord hydrolysés en acides gras et glycérol par une lipase (EC 3.1.1.3). Cependant, les lipases végétales n'ont pas été identifiées à l'heure actuelle, seules leurs activités ont été détectées. Les acides gras libérés sont ensuite activés en acyl-coA qui entrent dans le mécanisme de  $\beta$ -oxydation glyoxysomiale et dans le cycle du glyoxylate. Ceci aboutit à la formation de succinate qui est exporté vers la mitochondrie pour être converti en phosphoénolpyruvate. Finalement le phosphoénolpyruvate est converti en saccharose par glycolyse inverse dans le cytoplasme (Murphy, 1990), fournissant l'énergie nécessaire à la croissance de l'axe embryonnaire.

D'après Fernandez et Staehelin (1987), lors de la germination, la lipase, stockée auparavant sous forme inactive dans des corps protéiques, serait transférée par diffusion latérale (fusion de monocouches de PLs) vers les globules lipidiques et le transfert se ferait sous contrôle de l'acide gibbérellique. En revanche, Wang et Huang (1987) indiquent que l'ARNm spécifique des lipases n'est présent qu'entre le deuxième et le sixième jour après la réimbibition de la graine. La lipase serait donc synthétisée *de novo* après la germination et il n'y aurait pas de processus de co- ou post-traduction. Ils suggèrent aussi l'existence d'un signal de reconnaissance protéique à la surface des globules lipidiques qui permettrait à la lipase de se fixer. La lipolyse des corps lipidiques dans les graines peut avoir lieu sans préhydrolyse préalable de l'enveloppe protéique (Beisson *et al.*, 2001a). La lipase associée aux corps lipidiques a un pH optimum de 9,0 et son activité est peu dépendante de la composition en acides gras des TGs (Hills et Murphy, 1988). Murphy *et al.* (1989) ont montré que la lipase était uniquement localisée au niveau des graines en germination et qu'elle était absente d'autres tissus tels que les graines en développement, les feuilles, les racines, et les fleurs. Elle est présente en quantité très faible dans les graines sèches et est synthétisée *de novo* après 2 ou 3 jours de germination.

En parallèle, il y a, au cours du processus de germination des graines, synthèse de grandes quantités de lipoxygénase. Feussner et ses collaborateurs (1995 et 1997) ont montré, chez le concombre, que des lipoxygénases étaient impliquées, certainement avec des lipases, dans la mobilisation des lipides lors de la germination. Ces lipoxygénases ne peuvent pas agir sur des corps lipidiques intacts, mais uniquement après dégradation des protéines du corps lipidique (Matsui *et al.*, 1999). Mais Wang *et al.* (1999) n'ont pas pu mettre en évidence de lipoxygénase associée aux corps lipidiques de soja et ils rejettent donc l'hypothèse que des lipoxygénases interviennent directement dans la mobilisation des réserves lipidiques pendant la germination de la graine de soja.

Lors de la germination, près de 60 % des TGs stockés chez le riz ne sont pas utilisés. Si la majorité des corps lipidiques de l'embryon ont été mobilisés cinq jours après l'imbibition, ceux de la couche à aleurone restent intacts dans les semences après la germination. Les oléosomes de l'embryon et ceux de la couche à aleurone ont ainsi peut-être des fonctions biologiques différentes (Wu *et al.*, 1998).

### **1.3.5. Conclusion sur les globules lipidiques**

Le Tableau 4 présente un bilan des caractéristiques des globules lipidiques précédents. Au niveau du règne animal, ce sont donc les chylomicrons qui sont les plus proches des oléosomes végétaux, de par leur taille, leur densité et leur composition en protéines. Murphy et Vance (1999) ont recensé les mécanismes de formation de ces globules lipidiques. Bien que les corps lipidiques soient très différents d'un règne à l'autre (nature des lipides, protéines, taille), ils se forment certainement tous à partir de microdomaines du RE qui contiennent des enzymes de biosynthèse des lipides. La synthèse des globules et leur taille sont contrôlées par des composantes protéiques spécifiques.

**Tableau 4 : Caractéristiques des globules lipidiques.**

	localisation	diamètre	protéines de structure	structure	références
oléosome de plante	graine, pollen, tapetum floral	0,2 à 3 µm	oléosines caléosines	cœur : 95 % TGs, 2-3 % DGs et AGLs surface : 1 % PLs et 1 % protéines	Huang, 1996 ; Tzen <i>et al.</i> , 1993 ; Chen <i>et al.</i> , 1999
corps lipidiques <i>S.cerevisiae</i>	cytoplasme	environ 1 µm	?	cœur : 51,2 % TGs, 44,4 % esters de stérol, < 0,3 % stérols et 0,5 % squalènes surface : 1,3 % PLs et 2,6 % protéines	Clausen <i>et al.</i> , 1974 ; Zweytick <i>et al.</i> , 2000
chylo-microns		0,1 à 1 µm	apo A-I,-II,-IV ; apo B-48 ; apo C-I,-II,-III ; apo E	cœur : 85 % TGs et EC surface : 4 % cholestérol, 9 % PLs et 2 % protéines	Rawn, 1989 ; Rensen, 2001
LDL	plasma sanguin	20 nm monocouche 2 nm	apo B-100	cœur : 5 % TGs et 40 % EC surface : 10 % cholestérol, 20 % PLs et 20 % protéines	Hevonoja <i>et al.</i> , 2000
HDL		5 à 15 nm	apo A-I,-II,-IV ; apo C-I,-II,-III ; apo E	cœur : 4 % TGS et 15 % EC surface : 2 % cholestérol, 24 % PLs et 55 % protéines	Rawn, 1989 ; Segrest <i>et al.</i> , 2000
globules gras du lait	lait	3 – 5 µm		cœur : 95-96 % TGs, 2-3 % DGs surface (0,5 à 1 %) : 35 % PLs, 5 % AGLs et 60 % lipides neutres et 25 à 60 % de protéines	Danthine <i>et al.</i> , 2000

## 1.4. Oléosines

Les oléosomes des graines de végétaux soumises à dessiccation (Ross et Murphy, 1992 ; Leprince *et al.*, 1997), comportent toujours à leur surface au moins deux isoformes d'oléosines (Tzen *et al.*, 1990). Kalinski et ses collaborateurs montrent ainsi en 1991 qu'il existe deux isoformes, de masse proche de 24 kDa, chez le soja. Pour une graine contenant 40 % d'huile et 20 % de protéines, les oléosines représentent 0,4 à 1,6 % de la masse de la graine, soit 2 à 8 % des protéines de la graine (Huang, 1992).

### 1.4.1. Séquences des oléosines

#### 1.4.1.1. Nucléotidiques

Les premières études de séquence des protéines majoritaires des corps lipidiques ont été réalisées par Vance et Huang (1987) sur une oléosine de maïs de 16 kDa. Dès lors, de nombreuses isoformes ont été séquencées, notamment celle de 18 kDa du maïs (Qu et Huang, 1990), des isoformes d'oléosines de 19 et 20 kDa chez le radis et le colza (Murphy *et al.*, 1991), l'oléosine de 21,5 kDa du soja (Keddie *et al.*, 1992). Concernant *Arabidopsis thaliana*

(*A. thaliana*), la première séquence a été déterminée en 1992 par Van Rooijen et ses collaborateurs. Cette oléosine est similaire à 94, 67, 53 et 53 % et identique à 91, 53, 31 et 31 % aux oléosines de colza de 20 kDa, de maïs de 16 kDa, de maïs de 18 kDa et de carotte de 19 kDa respectivement. Aujourd'hui, grâce à la connaissance du génome complet d'*A. thaliana*, 16 gènes d'oléosines ont finalement été mis en évidence chez cette espèce végétale (Kim *et al.*, 2002).

Les gènes codant les oléosines de la graine, du tapetum ou des microspores ne possèdent aucun (maïs, carotte) ou un seul intron (*A. thaliana* isoformes de la graine, colza, soja). Celui-ci est alors localisé juste avant ou juste après la séquence codant un segment central hydrophobe (Kim *et al.*, 2002). Les gènes ne sont pas liés : ainsi, le gène codant l'oléosine de 16 kDa du maïs est localisé sur le chromosome 2 alors que celui de l'isoforme de 18 kDa est sur le chromosome 5 (Huang, 1992).

#### 1.4.1.2. Protéiques

Vance et Huang (1987) ont décrit la protéine majoritaire du corps lipidique en trois parties distinctes, selon leur caractéristique d'hydrophobie : N- et C- terminales amphiphiles et une partie centrale hydrophobe. Entre deux oléosines, seules les séquences protéiques du segment central sont très similaires, avec un motif à trois résidus de proline est très conservé : A T P L/V F/L V/L I/L F S P V/I L/I V P A (Beaudoin, 1999). Cela suggère que les oléosines sont des isoformes qui sont codées par des gènes dérivant d'un gène ancestral commun. Cette conservation du domaine central hydrophobe pourrait s'expliquer par son rôle indispensable dans le trafic intracellulaire des oléosines lors de leur synthèse mais aussi du fait de leur rôle d'ancrage dans le globule lipidique. Les domaines N- et C-terminaux peuvent eux subir des substitutions importantes d'acides aminés sans affecter la relation structure / fonction de ces protéines ou en leur conférant de nouvelles fonctions. Le segment central hydrophobe des oléosines possède quelques similarités avec les répétitions hydrophobes, riches en proline, de l'apo B-100 humaine (protéine séquencée par Knott *et al.*, 1986), seule composante protéique des LDL.

Tzen *et al.* (1990) proposent un classement des oléosines en deux classes : les isoformes de haute masse moléculaire (HMM) et ceux de basse masse moléculaire (BMM). Généralement, il y a 2 kDa d'écart entre les deux isoformes : 16 et 18 kDa chez le maïs, le riz, le coton et l'orge, 15 et 17 kDa chez le sésame et 19 et 21 kDa chez *A. thaliana* (Chen *et al.*, 1997). Des isoformes d'espèces végétales différentes sont immunologiquement proches si elles appartiennent à la même classe. En revanche, deux oléosines d'une même espèce, mais l'une

de HMM et l'autre de BMM ne présenteront pas de réactions croisées par immunochimie. Radetzky et Langheinrich (1994) ont montré qu'un anticorps dirigé contre une oléosine d'anis de 18,4 kDa était encore plus spécifique : il ne réagit qu'avec une isoforme oléosine de 19 kDa chez la carotte et chez la coriandre (les isoformes d'oléosines ont des masses moléculaires comprises entre 15 et 19 kDa chez ces espèces végétales). Seule l'isoforme de BMM est présente chez les gymnospermes, ce qui suggère que cette isoforme de BMM soit la forme primitive. L'isoforme de HMM est dérivé de celui de BMM avant la divergence entre les espèces mono- et di-cotylédones au cours de l'évolution (Wu *et al.*, 1999). Lee et Huang (1994) et Lee *et al.* (1995) ont trouvé trois isoformes d'oléosines : 16, 17 et 18 kDa chez le maïs. Elles sont présentes dans les proportions suivantes 2 / 1 / 1. Celle de 16 kDa fait partie des oléosines de BMM et celles de 17 et 18 kDa appartiennent aux HMM. Il y a donc présence en quantité égale d'oléosines de BMM et de HMM. Lee suggère ainsi la formation d'un hétéro-dimère entre les deux types d'isoformes. Tzen *et al.* (1998) et Tai *et al.* (2002) montrent que les deux isoformes d'oléosine cohabitent à la surface de l'oléosome, *in vivo* et *in vitro*, mais c'est celui de BMM qui est le plus apte à stabiliser le globule gras.

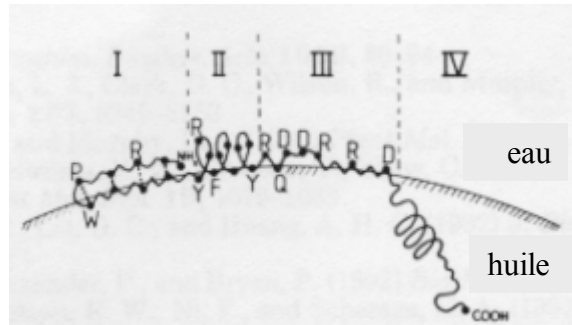
Keddie et ses collaborateurs (1992) décrivent la présence de résidus leucine espacés régulièrement (par 7 acides aminés en moyenne) dans le segment central hydrophobe de l'oléosine de 21,5 kDa du soja, similaire à un motif « leucine zipper ». Ce motif pourrait jouer un rôle dans des interactions protéines – protéines des oléosines.

## **1.4.2. Structure**

### **1.4.2.1. Extrémité N-terminale**

A partir d'algorithmes de calculs développés pour déterminer la structure de protéines solubles, l'extrémité N-terminale, acides aminés 1 à 47 d'une oléosine de colza de 19 kDa, est prédite en hélice  $\alpha$  (Murphy *et al.*, 1991).

Li et ses collaborateurs (1993) ont étudié la structure du domaine N-terminal (52 acides aminés) d'une oléosine de tournesol (18 kDa), exprimée dans *E. coli*, purifiée en présence de SDS et incorporée dans des liposomes, par dichroïsme circulaire (DC) et spectroscopie infrarouge (SIR). Le polypeptide N-terminal recombinant contient 10 % d'hélices  $\alpha$ , 20 à 30 % de feuillettes  $\beta$  parallèles, 8 % de coudes  $\beta$  et 60 % de structures non ordonnées en tampon phosphate. La proportion des structures ordonnées augmente lorsque le segment est reconstitué en liposomes : 20 % d'hélices  $\alpha$  et 30 à 40 % de feuillettes  $\beta$ . Le segment N-terminal de l'oléosine aurait donc des effets d'agent émulsifiant interfacial sur les liposomes. L'organisation de ce segment à la surface de l'oléosome est représentée sur la Figure 9.



**Figure 9 : Modèle simplifié du domaine N-terminal (52 acides aminés) d'une oléosine de tournesol de 18 kDa à l'interface huile / eau d'un corps lipidique de réserve (Li et al., 1993). II et IV = hélices  $\alpha$ , I et III = structures  $\beta$ .**

#### 1.4.2.2. Extrémité C-terminale

Par modélisation, le segment C-terminal (33 acides aminés d'une oléosine de maïs et 58 acides aminés d'une oléosine de colza de 19 kDa) est prédit comme étant une hélice  $\alpha$  amphiphile (Vance et Huang, 1987 ; Murphy *et al.*, 1991)

#### 1.4.2.3. Segment central hydrophobe

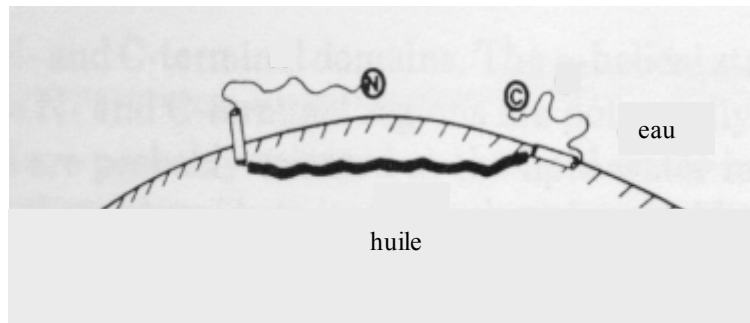
Des expériences de protéolyse menées sur des oléosomes montrent que le segment central hydrophobe est protégé. Ainsi, des auteurs ont proposé que ce domaine soit enchâssé dans la matrice lipidique (Tzen et Huang, 1992 ; Lacey *et al.*, 1998). Mais Beaudoin *et al.* (1999) puis Li *et al.* (2002) ont montré, en utilisant également des protéases, que le segment central hydrophobe n'était pas inséré en totalité dans la membrane. Plusieurs hypothèses ont été aussi formulées concernant la structure secondaire de ce segment.

- *En feuillets  $\beta$*

En 1990, Jacks et ses collaborateurs, par l'utilisation des techniques de DC et SIR sur des protéines isolées après délipidation de corps lipidiques d'arachide et solubilisées dans un mélange eau / acétonitrile / acide acétique, ont mis en évidence la présence de feuillets  $\beta$  et de structures non organisées, mais pas d'hélices  $\alpha$ . En 1991, Murphy et ses collaborateurs proposent, par l'utilisation de plusieurs algorithmes de prédiction, une structure en feuillet  $\beta$  du segment central hydrophobe (acides aminés 48 à 119 de l'oléosine de colza de 19 kDa).

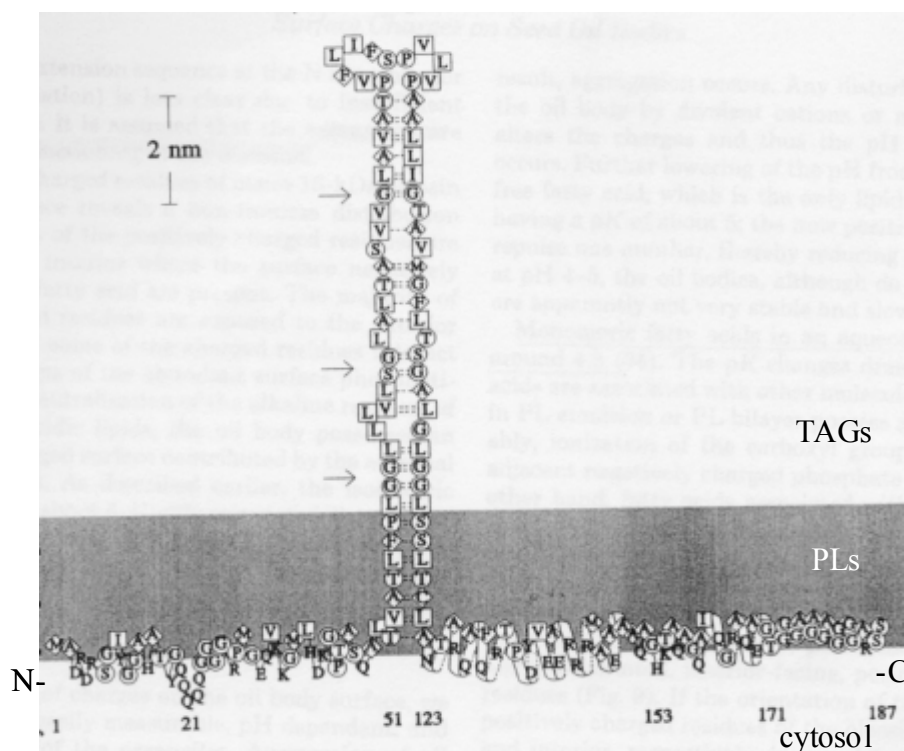
Par des techniques de DC et de SIR, sur des oléosines solubilisées avec du SDS, comparées à des prédictions de structure secondaire obtenues sur les séquences primaires d'acides aminés, Li *et al.* (1992) proposent, eux aussi, une composition à 45 % de feuillets  $\beta$  et à 13 % d'hélices  $\alpha$  des oléosines de colza (ceci est représenté sur la Figure 10). Le segment central hydrophobe de 71-72 acides aminés serait structuré en feuillet  $\beta$  et les extrémités terminales

comporteraient des hélices  $\alpha$ . Les trois isoformes d'oléosine de 19 kDa peuvent exister sous la forme de dimère de 40 kDa dans un environnement concentré en sels, ceci étant certainement favorisé par le feuillet  $\beta$  central et sa capacité à former des liaisons H.



**Figure 10 : Modèle d'orientation d'une oléosine de colza à l'interface huile / eau d'un corps lipidique de réserve (d'après Li *et al.*, 1992).**

Tzen *et al.* (1992) proposent une structure  $\beta$  anti-parallèle avec au centre un nœud proline. Les acides aminés sont associés par similarité de polarité (Figure 11). Les acides aminés chargés positivement font face aux PLs chargés négativement et les acides aminés chargés négativement sont exposés à la surface du corps lipidique, ce qui prévient l'agrégation des oléosomes.

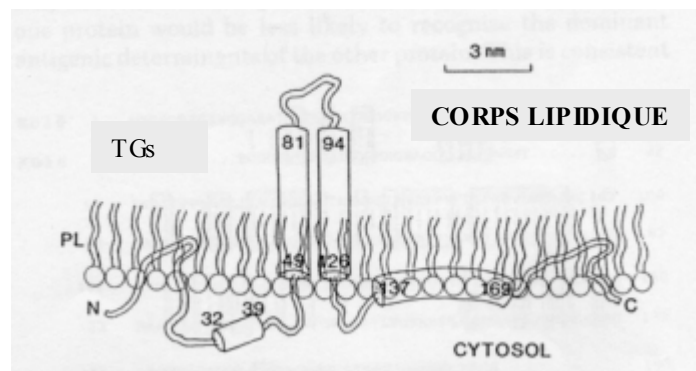


**Figure 11 : Modèle d'une oléosine de 18 kDa à la surface du corps lipidique (d'après Tzen *et al.*, 1992).**

Li *et al.* (2002) ont étudié la structure d'une oléosine de colza par DC et SIR à transformée de Fourier. Pour cela ils ont reconstitué le domaine central hydrophobe dans des liposomes et analysé sa structure. Elle serait constituée à 50 ou 63 % (par DC ou SIR) de feuillettes  $\beta$  et seulement 5 ou 7 % d'hélices  $\alpha$ . Deux hypothèses sont présentées : soit les feuillettes  $\beta$  hydrophobes sont arrangés en conformation linéaire ce qui leur permet d'interagir avec les molécules voisines d'oléosines pour former des oligomères, soit le domaine est une structure en épingle à cheveux (du fait du nœud proline) ce qui forme une structure anti-parallèle. Dans ce cas, le domaine s'insère profondément à l'intérieur des corps lipidiques. Cependant, le nœud proline paraît plus essentiel à l'adressage de la protéine vers l'oléosome qu'à sa topologie (Abell *et al.*, 1997) et les oléosines ont naturellement tendance à s'associer pour former des dimères, trimères ou plus (Li *et al.*, 1992).

- *En hélices  $\alpha$*

Par des considérations thermodynamiques, le segment central, formé de 72 acides aminés entièrement hydrophobes, est représenté par 2 hélices  $\alpha$  qui pénètrent dans le cœur lipidique de l'organite (Qu et Huang, 1990). Les 72 acides aminés hydrophobes contigus représentent 4 fois la taille d'un polypeptide transmembranaire habituel (Huang, 1996). Les 2 hélices sont reliées par un coude constitué d'un segment de 12 acides aminés comportant 3 résidus proline (Figure 12).



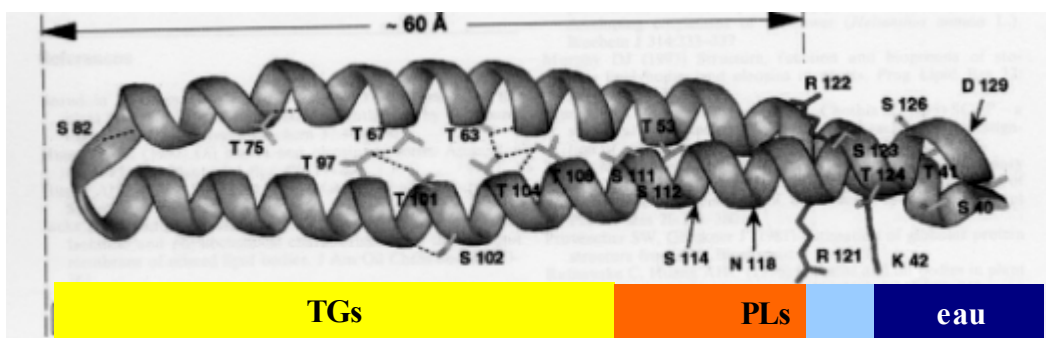
**Figure 12 : Modèle de la conformation d'une oléosine de 18 kDa à la surface du corps lipidique (Qu et Huang, 1990).**

En 1996, Millichip et ses collaborateurs trouvent majoritairement, par DC, des hélices  $\alpha$  dans des oléosines de tournesol solubilisées dans du trifluoroéthanol (TFE) (plus ou moins dilué dans l'eau). Néanmoins, les conditions (urée 9 M) utilisées dans cette étude pour l'isolement des corps lipidiques étaient draconiennes et ainsi, leurs résultats ont été très critiqués par Ratnayake et Huang (1996). L'urée pourrait détruire de façon irréversible les structures



secondaires natives de l'oléosine. Mais il est difficile de sortir les oléosines de leur environnement naturel sans les dénaturer, leur milieu naturel étant une interface.

Lacey *et al.* (1998a) ont étudié la structure de l'oléosine de carthame dans son contexte, l'oléosome, par SIR. Ils en déduisent une conformation majoritairement en hélices  $\alpha$  du segment central hydrophobe de l'oléosine dans des oléosomes intacts. De même Alexander *et al.* (2002) postulent, par l'utilisation de DC sur des micelles de SDS ou dans du trifluoroéthanol (TFE) 100 %, que le segment central hydrophobe d'une oléosine de tournesol est constitué d'hélices  $\alpha$  avec une structure en épingle à cheveux (Figure 13). Cette structure n'a aucune homologie avec celles de protéines connues.



**Figure 13 : Modélisation moléculaire du segment central hydrophobe d'une oléosine de tournesol (d'après Alexander *et al.*, 2002).**

Il est difficile d'étudier la structure d'une protéine non soluble en milieu aqueux et le solvant utilisé influe sur la structure.

### **1.4.3. Adressage des oléosines dans l'oléosome de la graine**

#### **1.4.3.1. Modèle de la biogénèse de l'oléosome**

Dès 1978, Wanner et Theimer proposent des hypothèses sur la biogénèse des sphérosomes : ils pourraient se former par l'accumulation de lipides de réserve entre les deux feuillettes membranaires du reticulum endoplasmique (RE). Lorsque le globule atteint une taille critique, il se détacherait et s'individualiserait. Dès lors, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées au moment et au lieu de la biogénèse des oléosomes. Il était important de savoir si les oléosines étaient présentes avant, pendant ou après l'accumulation des réserves et si elles jouaient un rôle dans le contrôle de l'accumulation des lipides.

En 1987, Herman a purifié une protéine de 24 kDa à partir de corps lipidiques de cotylédon de soja. Après avoir obtenu chez un lapin des anticorps contre cette protéine, il montre qu'elle est

uniquement localisée au niveau de la membrane du corps lipidique. Il n'y a pas de réaction immunochimique au niveau du RE. Ceci tend à infirmer le rôle du réticulum endoplasmique dans la biogenèse des corps lipidiques complets. En 1989 et 1993, Murphy et ses collaborateurs indiquent que l'accumulation des lipides et celle des oléosines sont décalées dans le temps dans des embryons de colza en développement (Murphy et Cummins, 1989 ; Cummins *et al.*, 1993). Les oléosines se déposeraient donc à la surface des corps lipidiques de réserve déjà formés. De même, pour Banas *et al.* (2000) l'accumulation d'oléosines ne coïncide pas avec celle des lipides dans le grain d'avoine et elles seraient donc insérées dans le corps lipidique après sa synthèse.

Mais Tzen *et al.* (1993) défendent l'idée d'une accumulation concomitante des oléosines et des réserves lipidiques. Deux variétés de maïs, l'une ayant des graines pauvres en huile et l'autre ayant des graines riches en huile, ont été étudiées (Ting *et al.*, 1996). La variété riche en huile a des globules lipidiques plus gros et de forme sphérique, alors que la variété pauvre présente des corps gras petits et de forme irrégulière. Malgré la différence de teneur en huile, provenant d'une modification génétique, les deux variétés possèdent les trois isoformes d'oléosines avec une répartition équivalente. Elles sont uniquement localisées sur les corps lipidiques et sont accumulées en même temps que l'huile. Des oléosines de soja exprimées dans du colza transgénique sont correctement adressées vers les corps lipidiques. Une petite proportion des oléosines de colza et de soja sont associées aux membranes du RE avant leur transfert vers les corps lipidiques en développement (Sarmiento *et al.*, 1997). Mazhar *et al.* (1998) ont mis en évidence la biosynthèse d'oléosines dans des étapes précoces du développement, parallèlement à la biosynthèse des lipides. Enfin, Beaudoin *et al.* (1999) montrent que les oléosines sont synthétisées au niveau de ribosomes liés et qu'elles sont insérées au moment de la traduction dans les membranes du RE. Beaudoin et Napier (2000) ont mis en évidence l'accumulation stable, au niveau de tissus ne stockant pas de lipides (feuilles, racines, pétales), d'oléosines de tournesol exprimées dans des plants transgéniques d'*A. thaliana*. Cette accumulation est contrôlée par l'insertion dans le système endomembranaire (le RE). Ceci conforte l'hypothèse que la genèse des corps lipidiques est le résultat des synthèses coordonnées des TGs et des oléosines avec un rôle central du RE.

#### **1.4.3.2. Domaines de l'oléosine requis pour l'adressage**

En 1991, Lee et ses collaborateurs ont montré que le transfert du gène codant une oléosine de maïs dans *Brassica napus*, via *Agrobacterium*, aboutissait à la localisation, à la surface du

globule lipidique de *Brassica napus*, non seulement des oléosines natives mais aussi de l'oléosine de maïs. L'oléosine d'une monocotylédone possède donc suffisamment d'information pour son adressage chez une dicotylédone.

La région du domaine N-terminal précédant directement le domaine hydrophobe est chargée positivement, la majorité des résidus d'acides aminés étant basiques (30 sur 37 chez une oléosine de colza). Bien que les oléosines ne possèdent pas de signal peptidique d'adressage pour le réticulum endoplasmique, cette région chargée positivement associée au domaine hydrophobe est un point commun à de nombreuses protéines membranaires adressées au RE. Les oléosines sont transportées via le RE avant leur insertion dans le globule gras (Hills *et al.*, 1993).

D'après Thoyts *et al.* (1995), les oléosines sont synthétisées en même temps (ou juste après) la formation du globule lipidique. De plus, la protéine est correctement adressée même après délétion d'une partie du segment C-terminal. Ceci suggère que l'oléosine est dirigée vers la membrane du RE au cours de la biogénèse du globule lipidique.

Van Rooijen et Moloney (1995b) ont démontré le rôle du segment central hydrophobe et de l'extrémité N-terminale dans l'adressage des oléosines vers le corps lipidique. En revanche, ils ont confirmé que l'absence du segment C-terminal n'influçait pas l'adressage.

Des substitutions des résidus de proline du nœud par des leucine aboutissent au même taux d'accumulation des protéines au niveau du RE. En revanche, les oléosines mutantes ne sont pas adressées vers l'oléosome. Le nœud proline n'est donc pas important pour l'intégration dans le RE et la détermination de la topologie de la protéine, mais il est indispensable pour l'adressage au corps lipidique (Abell *et al.*, 1997).

L'adressage des oléosines dans la membrane du RE se fait par un mécanisme dépendant d'un signal de reconnaissance (Beaudoin *et al.*, 2000). Puis le segment N-terminal des oléosines est essentiel pour le transfert du RE vers le corps lipidique. La première partie du segment central hydrophobe et le domaine N-terminal chargé positivement jouent le rôle d'un signal d'accrochage, mais la région proline et la deuxième partie du segment hydrophobe seules sont aussi suffisantes pour diriger l'oléosine vers le RE et permettre une intégration stable dans la membrane. L'oléosine contient donc plusieurs domaines au niveau du segment central hydrophobe capables d'interagir avec le signal de reconnaissance pour diriger l'oléosine vers le RE (Beaudoin et Napier, 2002). Le coeur protéique du virus de l'hépatite C est localisé à la surface des corps lipidiques de réserve dans des cellules de mammifère. Des oléosines de colza, exprimées dans des lignées cellulaires de mammifère, ont aussi la capacité de se fixer aux globules lipidiques. En fait, les séquences végétale et virale comportent toutes deux un

motif proline P x x (x) x P (x leucine ou valine surtout) situé au centre d'une séquence hydrophobe. Ceci confirme des points communs dans des protéines disparates qui sont nécessaires à la localisation sur les globules lipidiques (Hope *et al.*, 2002). L'introduction d'une séquence codante d'oléosine dans des cellules de feuilles de tabac aboutit à l'adressage des oléosines vers les corps lipidiques, bien que ces globules lipidiques des feuilles (diamètre moyen 4 µm) ne comportent pas, *in vivo*, d'oléosine. Pour son transport, la protéine est uniquement associée au RE, indépendamment de l'appareil de Golgi (Wahlroos *et al.*, 2003).

#### **1.4.3.3. Modèle consensuel**

En tenant compte des recherches des équipes précédentes, un nouveau modèle de genèse de l'oléosome est proposé (Sarmiento *et al.*, 1997 ; Galili *et al.*, 1998 ; Lacey *et al.*, 1998b ; Beaudoin, 1999). Les TGs sont synthétisés dans des sous-domaines spécialisés du RE. Ils s'accumulent avec leur enveloppe de PLs. En parallèle, des oléosines sont insérées dans la même région du RE par un signal de reconnaissance (Thoyts *et al.*, 1995). Les corps lipidiques naissant se détachent par bourgeonnement des extrémités du RE tubulaire. L'accumulation des TGs étant excédentaire par rapport à celle des oléosines dans les premières étapes du développement des corps lipidiques de la graine, les petits corps lipidiques ne sont pas entièrement couverts d'oléosines, et donc coalescent. Lorsque les globules atteignent une taille où les oléosines couvrent entièrement la surface - la coalescence provoque une diminution du rapport surface / volume des globules - le phénomène de coalescence s'arrête et les oléosomes sont constitués. Ceci permet d'expliquer pourquoi des corps lipidiques peuvent se former sans qu'il y ait d'oléosines et les oléosines seraient donc un facteur déterminant dans la taille finale des oléosomes. A partir de ces idées, Beisson (1999) a proposé un schéma de la biosynthèse des oléosomes (Figure 14).

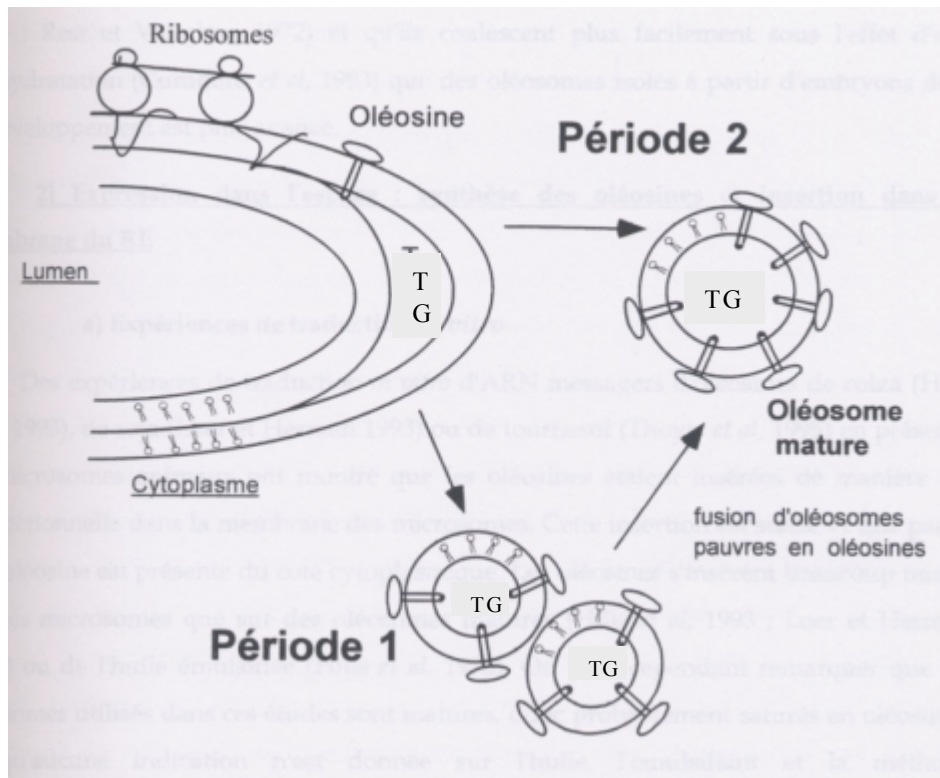


Figure 14 : Modèle de synthèse de la biogénèse des oléosomes (d'après Beisson, 1999).

#### 1.4.3.4. Régulation de l'expression des oléosines

L'expression des gènes codant les oléosines est sensible à l'acide abscissique (stimulation) (Vance et Huang, 1988 ; Qu *et al.*, 1990 ; Plant *et al.*, 1994) et au sorbitol. L'effet positif de l'acide abscissique sur l'expression des oléosines est modulé par l'acide jasmonique qui pourrait jouer un rôle dans la réduction de l'acide abscissique dans les étapes tardives du développement de la graine (Hays *et al.*, 1999). Plant et ses collaborateurs (1994) mettent en évidence la présence d'éléments de régulation positive impliqués dans la modulation des quantités d'expression des oléosines par des méthodes de délétion sur les séquences jouxtant l'extrémité 5' codante. L'expression d'une oléosine de cellules embryonnaires de carotte est diminuée par un stress à la chaleur (Miloni *et al.*, 2001).

De plus, l'induction de la synthèse d'un homologue d'oléosine (144 acides aminés comportant un domaine central hydrophobe quasi identique à celui des oléosines de colza) a été obtenue par l'ajout d'une forte concentration en sels sur des cellules d'agrumes (Naot *et al.*, 1995).

Lors du développement de la graine de sésame, l'oléosine de 15 kDa apparaît avant celle de 17 kDa. Ainsi les corps lipidiques assemblés au cours des étapes tardives du développement ont une proportion d'oléosine de 17 kDa supérieure par rapport aux oléosines de 15 kDa. Ces

corps lipidiques sont utilisés prioritairement lors de la germination. La proportion d'oléosines de 17 kDa semble donc liée à l'ordre de priorité d'utilisation des oléosomes (Peng et Tzen, 1998). Ainsi, Sadeghipour et Bhatla (2002) ont montré que la dégradation *in vitro* et *in vivo* de l'oléosine de 17,5 kDa du tournesol était plus rapide que celle des isoformes de 16 et 20 kDa. L'isoforme de 17,5 kDa est plus susceptible d'être protéolysé. La dégradation aboutit à la formation d'un polypeptide de 14,5 kDa puis à un fragment de 11 kDa, non sensible aux protéases qui apparaît après la germination et s'accumule au rythme de la mobilisation des lipides. Kaderbhai *et al.* (1990) ont montré une évolution temporelle quantitative et qualitative des oléosines présentes dans les oléosomes. Dans des graines en dormance de ricin, ils trouvent 8 protéines majoritaires de 20 à 35 kDa. En revanche, au premier jour de la germination, ils décrivent l'apparition de nouvelles oléosines de 15 et 60 kDa, puis de 16 kDa au jour 2. Les quantités d'oléosines de 16 et 60 kDa progressent jusqu'au troisième jour puis diminuent. L'oléosine de 15 kDa augmente jusqu'au jour 2 puis son niveau se maintient. Chez un mutant d'*A. thaliana* ayant une réduction de 80 % de la teneur en huile de sa graine, l'expression des oléosines augmente plus tardivement que chez la plante sauvage. L'expression demeure ensuite élevée (Ruuska *et al.*, 2002).

#### **1.4.4. Autres oléosines**

Les seize gènes d'oléosines trouvés dans le génome d'*A. thaliana* ont été classés en trois groupes selon la localisation tissulaire de leur expression : ceux exprimés spécifiquement dans le tapetum floral (huit gènes), ceux exprimés spécifiquement dans les graines (5 gènes) et ceux exprimés à la fois dans les graines en maturation et dans les microspores florales qui deviendront le pollen (trois gènes). Les protéines ont des masses de 10 à 53 kDa (Kim *et al.*, 2002).

##### **1.4.4.1. Oléosines du tapetum floral et du pollen**

Les oléosines sont localisées dans les graines mais aussi dans des tissus qui accumulent peu de réserve lipidique : le tapetum floral et le pollen. Le tapetum entoure le locule de l'anthere dans lequel a lieu la genèse des microspores. Chez les crucifères, le tapetum est constitué d'une simple couche de cellules qui délivrent les nutriments nécessaires au développement du pollen (Murphy et Ross, 1998 ; Piffanelli *et al.*, 1998). Après la lyse des cellules du tapetum, les élioplastes et les tapétosomes sont libérés dans le locule de l'anthere et leurs composantes protéiques et lipidiques sont remodelées. Ces deux organites contribuent à la formation de l'enveloppe lipidique des grains de pollen matures (Hernandez-Pinzon *et al.*, 1999). Les

protéines de type oléosine de l'anthere, ont des motifs riches en glycine, ces domaines jouent certainement un rôle dans les interactions protéines-protéines. De plus leurs motifs conservés indiquent une implication dans la stabilisation des lipides (Sachetto-Martins *et al.*, 2000).

La majorité des protéines de l'enveloppe du pollen est dérivée d'une coupure endoprotéolytique d'un précurseur de protéines de type oléosine qui s'accumule avec les gros corps lipidiques cytoplasmiques des cellules tapétales (Murphy et Ross, 1998 ; Ting *et al.*, 1998). Toutes les séquences d'acides aminés contiennent le long segment hydrophobe caractéristique des oléosines de la graine. Les séquences des protéines du pollen et du tapetum ont pour la plupart une extension C-terminale très variable (de 50 à 400 acides aminés), ce qui aboutit à des masses variables : de 14 à 60 kDa (Huang, 1996). Une protéine de l'inflorescence d'*A. thaliana*, exprimée essentiellement dans les anthères à la fin du développement de la fleur, comporte à son extrémité N-terminale un domaine hydrophobe, suivi d'une région de motifs répétés riches en glycine. Une homologie est trouvée entre cette protéine et une oléosine de maïs. De Oliveira et ses collaborateurs (1993) émettent donc l'hypothèse d'une stabilisation des globules lipidiques du tapetum par des protéines homologues aux oléosines trouvées dans les graines. Murphy (1993) a montré que les oléosines étaient présentes en quantité abondante dans les graines et dans le pollen. Avec Ross, en 1996, ils étudient plus en détail la paroi du pollen du colza. Ils trouvent beaucoup de polypeptides extracellulaires de 32 à 38 kDa et certains de taille inférieure à 15 kDa (en moindre quantité). Toutes ces protéines ont un segment central hydrophobe de 70 acides aminés très conservé et sont structurellement proches des oléosines intracellulaires spécifiques de la graine. Néanmoins, leurs fonctions biologiques pourraient être différentes. Ils nomment donc ces protéines du pollen de type oléosine. Les oléosines du pollen de brocoli dérivent d'un seul gène. Elles sont uniquement localisées à la surface lipophile de la paroi (Ruiter *et al.*, 1997). Des oléosines sont localisées à la périphérie des plastides dans les cellules du tapetum (Wu *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1997), ainsi qu'à la surface des corps lipidiques de réserve dans les microspores en maturation (Wang *et al.*, 1997). Une mutation qui retire un domaine oléosine de l'enveloppe du pollen d'*A. thaliana* gêne le processus d'hydratation du pollen. Le domaine oléosine pourrait ainsi réguler les propriétés des lipides lors de la mobilisation de l'enveloppe et le domaine C-terminal répétitif, qui est très divergent entre les homologues et les orthologues, serait un signal spécifique d'espèce (Mayfield et Preuss, 2000 ; Mayfield *et al.*, 2001). Les domaines similaires aux oléosines sont coupés après la libération dans le locule de l'anthere et les protéines matures qui sont les protéines majeures du grain de pollen ne contiennent plus de séquence de type oléosine. Ces protéines sont donc

nommées pollénines (Murphy, 2001). Ce sont des protéines hybrides formées de domaine d'association aux lipides de 7 à 8 kDa similaire au segment central des oléosines. Par fusion, les domaines protéiques font de 7 à 37 kDa (Murphy *et al.*, 2001).

Les interactions entre le pollen et le stigma sont essentielles à la reproduction des végétaux et elles sont rendues possibles grâce aux composés lipidiques et protéiques à leur surface. Chez les crucifères, la protéine majoritaire de l'enveloppe du grain de pollen mature est une protéine de type oléosine. La fusion d'une enzyme à la protéine de type oléosine aboutit à la localisation de cette enzyme à la surface du grain de pollen. Les protéines du pollen, de type oléosine, pourraient jouer un rôle dans l'établissement de la barrière d'espèce (Foster *et al.*, 2002).

La fonction des oléosines du tapetum ne sont pas clairement établies. Bien qu'il y ait une grande similarité de séquence du domaine hydrophobe et d'organisation de la structure primaire des oléosines entre les pollens, les graines et le tapetum, l'absence de corps lipidiques typiques dans le tapetum et les variations C-terminales suggèrent une fonction cellulaire différente de ces protéines (Alves Ferraira *et al.*, 1997).

#### **1.4.4.2. Oléosines de la racine**

Des corps lipidiques de la racine contiennent des oléosines et de la caléosine (Naested *et al.*, 2000). Les oléosomes de la racine pourraient jouer un rôle dans le gravitropisme (Murphy *et al.*, 2001). En effet, des globules lipidiques ont été trouvés dans un champignon *Phycomyces* chez lequel ils jouent un rôle de bouée dans la perception du gravitropisme en association avec des cristaux de protéine (Schimek *et al.*, 1999).

#### **1.4.4.3. Oléosines de la drupe de l'olive**

La drupe de l'olive est constituée à 22 % d'huile, 50 % d'eau, 1,6 % de protéines et 19,1 % de glucides. Un polypeptide de 4,6 kDa de composition similaire (richesse en acides aminés hydrophobes) aux oléosines a été trouvé dans l'huile d'olive. Ce polypeptide est la protéine majoritaire de l'huile et des corps lipidiques du mésocarpe de l'olive. La teneur en huile est corrélée à la teneur en protéines, ce qui suggère une fonction stabilisatrice des corps lipidiques par la protéine (Zamora *et al.*, 2001).



## **1.4.5. Rôles physiologiques des oléosines**

### **1.4.5.1. Stabilisation des oléosomes**

Du fait de la structure inhabituelle des oléosines et de leur abondance sur le corps lipidique, Vance et Huang (1987) leur attribuent un rôle structural dans la stabilisation des corps lipidiques. Tzen et Huang (1992) ont en effet montré qu'un traitement à la trypsine entraînait la coalescence des oléosomes, alors qu'en présence de phospholipase, les globules gardaient leur intégrité. De plus, des émulsions reconstituées avec des mélanges binaires (PLs et TGs ou TGs et oléosines) n'étaient pas stables au cours du temps alors qu'en mélange, les trois constituants (TGs, PLs et oléosines) forment des émulsions très stables. Les oléosines, en interaction avec les PLs, confèrent à l'oléosome une surface amphiphile et elles provoquent des répulsions stériques. La légumineuse *Phaseolus vulgaris* stocke majoritairement de l'amidon et des protéines dans ses graines. Contrairement aux autres espèces végétales soumises à dessiccation, ses globules lipidiques de réserve, de diamètre 90 à 180 nm, ne sont pas complètement recouverts d'oléosines, laissant par endroit les PLs apparents. Ceci peut s'interpréter par le fait que ses globules lipidiques sont moins susceptibles de coalescer du fait de leur dispersion au sein des grains d'amidon et des corps protéiques. De même, les globules ne s'agrègent pas à pH 6,5 (Froese *et al.*, 2003). Du fait de la présence des oléosines, les oléosomes restent individualisés en petits globules et ils ne coalescent pas, même au moment de la germination de la graine. Ceci permet d'augmenter le ratio surface / volume et donc la vitesse de la mobilisation des réserves par les lipases. En effet, pour agir, les lipases doivent d'abord s'adsorber à la surface du substrat émulsionné (Benzonana et Desnuelle, 1965).

### **1.4.5.2. Site de fixation pour la lipase**

Vance et Huang (1987) avancent aussi l'hypothèse d'un rôle de site de reconnaissance pour un accrochage spécifique des lipases sur le globule. Cette hypothèse a longtemps été reprise, sans toutefois pouvoir être démontrée (Tzen *et al.*, 1992). Un parallélisme est fait entre la relation structure / fonction des oléosomes végétaux intracellulaires et les lipoprotéines extracellulaires des mammifères (chylomicrons et lipoprotéines de très basse densité) par Tzen et ses collaborateurs (1992). Les deux organites comportent un cœur de lipides hydrophobes entouré d'une couche de PLs dans laquelle s'insèrent des protéines. Mais il existe des différences structurales majeures qui traduisent les divergences des métabolismes impliqués. L'absence de cholestérol chez les végétaux donne une matrice plus hydrophobe. De plus, les oléosines sont plus hydrophobes que les apolipoprotéines. De ce fait, les

lipoprotéines sont plus instables que les oléosomes, ce qui leur permet de participer à un métabolisme dynamique. Les oléosines et les apolipoprotéines forment des hélices  $\alpha$  à la surface des corps lipidiques. Les hélices  $\alpha$  amphiphiles des apolipoprotéines sont censées intervenir dans la fixation de la lipase à la surface du globule. Mais en 1997, Hoppe et Theimer infirment l'hypothèse d'un tel rôle pour les oléosines et suggèrent que la lipase interagisse avec le globule lipidique par des constituants de surface chargés négativement, différents des oléosines. En effet, la dégradation des TGs catalysée par la lipase est mise en évidence dans des corps lipidiques isolés de graine au deuxième jour de la germination, mais pas dans des graines sèches ou au premier jour de la germination. Il y aurait une inhibition de l'activité lipasique due à la présence de la demi-membrane complète entourant les TGs.

#### **1.4.6. Applications industrielles pour les oléosines**

Des protéines et peptides d'intérêt pharmaceutique (vaccins, anticorps, drogues) sont aujourd'hui produits dans des plantes transgéniques. Ainsi, il existe des plants transgéniques exprimant des protéines telles que les enképhalines, l'interféron- $\alpha$ , l'albumine sérique humaine et la lipase canine (Giddings *et al.*, 2000). Actuellement, des oléosines recombinantes sont exploitées industriellement pour la production d'hirudine (Figure 15). Une utilisation d'oléosines natives pourrait aussi être envisagée pour d'autres applications. En effet, la production mondiale de colza représentait 35 millions de tonnes en 1995 / 1996 (Schweisguth, 1997). Suite à l'extraction de l'huile des graines oléagineuses, les membranes des oléosomes contenant les oléosines sont retrouvées dans les tourteaux. Ces tourteaux, utilisés aujourd'hui essentiellement dans l'alimentation du bétail pourraient donc être une source importante d'oléosines.

##### **1.4.6.1. Utilisation du promoteur des oléosines pour une expression ciblée vers la graine**

Les huiles végétales sont une composante importante du régime alimentaire humain. Elles peuvent représenter jusqu'à 25 % des calories ingérées. Les récentes avancées en ingénierie génétique offrent la possibilité d'optimiser la composition lipidique de produits végétaux en fonction des besoins (Broun *et al.*, 1999 ; Murphy, 1999). Les régions régulatrices 5' d'un gène d'oléosine d'*A. thaliana*, liées à la séquence de codage d'un gène hétérologue ou à une séquence complémentaire d'un gène de plante natif, dirigent l'expression de la séquence dans une graine de la plante. Ces régions régulatrices sont utiles pour la transformation de plantes en tant que cassettes et vecteurs d'expression, permettant ainsi de moduler le niveau

d'expression d'un gène hétérologue, tel qu'un gène du métabolisme des lipides ou de synthèse des acides gras (Thomas et Li, 1998).

#### **1.4.6.2. Expression et ciblage de protéines chimériques vers l'oléosome**

Si *E. coli* présente l'avantage d'être facilement manipulable génétiquement et donne de bons rendements de protéines recombinantes, en revanche, elle est incapable de faire des modifications post-traductionnelles et les protéines sont fréquemment mal repliées. Tous les systèmes d'expression eucaryotes sont capables de faire des modifications post-traductionnelles, mais la nature et l'importance de ces modifications dépend de chaque système. Les levures font ainsi des hyper-glycosylations de protéine et elles ne peuvent pas ajouter de glycanes complexes aux protéines, ce qui limite leur usage pour l'expression de protéines de mammifères. Les plantes présentent donc une bonne alternative (Boothe *et al.*, 1997).

La région promotrice, située à l'extrémité 5' du gène d'une oléosine d'*A. thaliana*, peut être couplée à un gène pour permettre un ciblage tissulaire de l'expression d'une protéine hétérologue. Ainsi Thomas et Li (1998) ont exprimé une protéine recombinante spécifiquement dans la graine de la plante.

L'entreprise Sembiosys Genetics Inc. (Moloney, 1996 et 2000) a déposé de nombreux brevets concernant les oléosines. Ainsi, Moloney et son équipe de recherche proposent d'utiliser des corps lipidiques recombinants pour la production de protéines recombinantes (Van Rooijen et Moloney, 1995a) (Figure 15). En effet, une protéine de fusion oléosine –  $\beta$  glucuronidase est correctement adressée à l'oléosome (Abenes *et al.*, 1997). Ce même système a été utilisé pour la production d'hirudine (protéine anti-coagulante) recombinante (Parmenter *et al.*, 1995 ; Boothe *et al.*, 1997 ; Chaudary *et al.*, 1998). Ainsi une protéine de fusion hirudine – oléosine a été exprimée dans des plants de colza, puis de moutarde éthiopienne et aujourd'hui dans du tabac transgénique pour éviter la dissémination du gène à des plantes adventices. La protéine de fusion est correctement dirigée vers la membrane des corps lipidiques. Après séparation des protéines du corps lipidique, l'hirudine est libérée par attaque d'une endoprotéase.

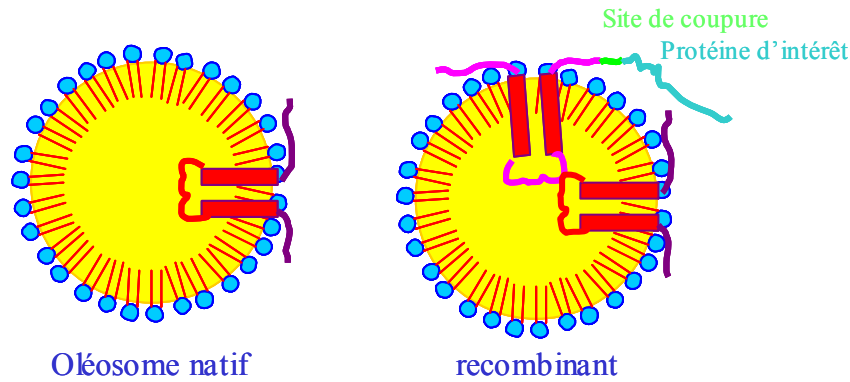


Figure 15 : Système d'expression de protéines recombinantes *via* l'oléosome (échelle des tailles non respectée) (site web Sembiosys).

### 1.4.6.3. Agents émulsifiants

Des oléosomes artificiels sont reconstitués à partir des éléments TGs / PLs / oléosines isolées, dans des proportions en masse 100 / 1 / 2. L'émulsion est faite par sonication dans un milieu tamponné de pH 7,4. La stabilité des émulsions est suivie par une mesure de la diminution de l'absorbance ( $A$ ) à 600 nm dans la partie inférieure de l'émulsion. Des espèces végétales variées ont ainsi été étudiées : maïs, soja, jojoba (Tzen et Huang, 1992), riz (Tzen et Huang, 1992 ; Tzen *et al.*, 1998), colza (Tzen et Huang, 1992 ; Li *et al.*, 2002), sésame (Chen et Tzen, 2001), amande (Beisson *et al.*, 2001b) et arabette (Kim *et al.*, 2002, Figure 16).

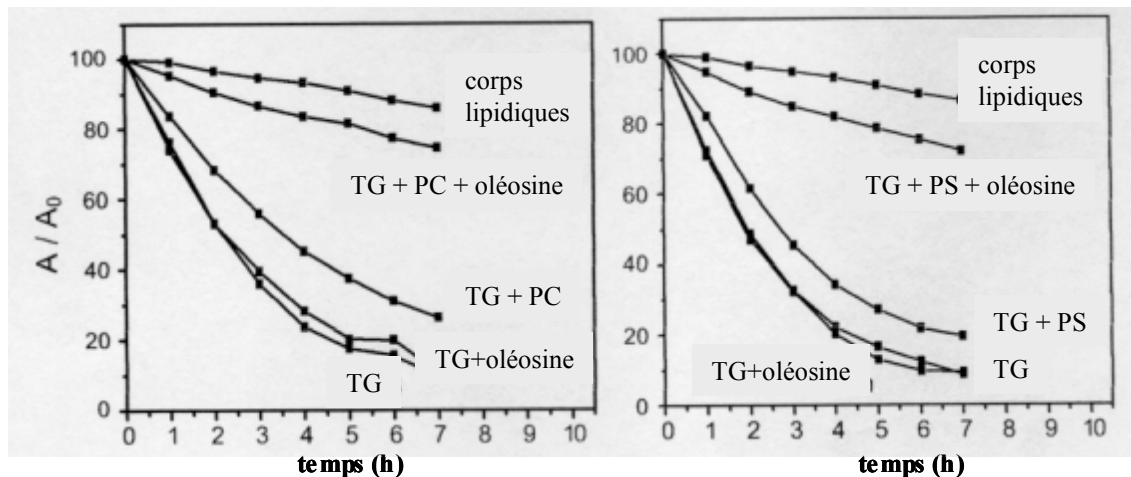


Figure 16 : Stabilité au cours du temps d'émulsions formées de TG / PL (PC ou PS) / oléosine.  $A / A_0$  = rapport des absorbances (Kim *et al.*, 2002).

Les oléosomes artificiels complets présentent une stabilité comparable à celle des oléosomes natifs. Les oléosines pourraient donc être utilisées comme agent émulsifiant. Ainsi, le groupe Ajinomoto Co. (Harada *et al.*, 2002) a obtenu un stabilisant d'émulsion à partir d'un complexe oléosine / phospholipide extrait du corps lipidique de graines végétales. Les

recherches effectuées au cours de la thèse de F. Beisson (1999) étaient financées par Yves Rocher, en vue de l'utilisation des oléosines en cosmétique. L'entreprise a depuis déposé un brevet sur l'utilisation d'oléosomes végétaux dans une crème nourrissante pour la peau (site Web Yves Rocher). Les oléosomes des plantes non soumises à dessiccation, dont le cacao, sont considérés comme dépourvus d'oléosines (Leprince *et al.*, 1997). Néanmoins, un brevet déposé par Nestlé en 2000 (Mac Carthy) concerne l'utilisation de deux isoformes d'oléosines du cacao pour la fabrication d'émulsifiants, d'agents d'encapsulation et d'agents aromatisants.

#### **1.4.7. Allergies**

Avant d'utiliser une protéine dans les industries agro-alimentaire et cosmétique, il convient tout d'abord de s'assurer qu'elle n'est pas allergénique. Les protéines ayant de nombreux résidus cystéine, des points isoélectriques acides, une activité enzymatique et subissant des modifications post-traductionnelles sont les plus susceptibles d'avoir un pouvoir allergénique. Bien que les oléosines ne possèdent pas ces caractéristiques, Pons *et al.* (2002) ont montré des réactions croisées de sérum de patients allergiques à l'arachide avec certaines oléosines de cacahuète (16-18 kDa et surtout leurs polymères, Pons *et al.*, 1998) et de soja (16,5 et 24 kDa et leurs polymères). Les oléosines pourraient donc être responsables en partie des allergies aux cacahuètes et au soja. Néanmoins, ceci n'est pas généralisable à d'autres oléosines. En effet, le segment central hydrophobe très conservé est faiblement antigénique et ce sont surtout les extrémités variables N- et C-terminales qui interviennent dans les réactions immunochimiques (Au *et al.*, 1989). On ne peut donc pas écarter un futur usage alimentaire à certaines isoformes d'oléosines (Roux *et al.*, 2003).

### **1.5. Deux organismes modèles**

Deux organismes modèles stockant des lipides sous forme de globules ont été choisis pour notre étude. Il s'agit de la plante *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) et de la levure *Yarrowia lipolytica* (*Y. lipolytica*).

#### **1.5.1. Plante : *A. thaliana***

*A. thaliana* (Figure 17) appartient à la famille des crucifères, tout comme le colza, cultivé pour son huile, et les moutardes. Son nom commun est l'arabette, elle est très répandue dans les zones cultivées ou les friches d'Europe et d'Asie. A l'âge adulte elle mesure 30 à 40 cm.

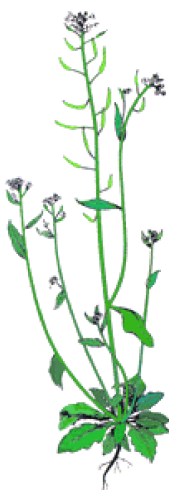


Figure 17 : *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Information Resource, about *Arabidopsis thaliana*, <http://www.arabidopsis.org/info/aboutarabidopsis.html>).

Elle présente l'avantage d'avoir des cycles de développement très courts de six semaines environ de la germination à la graine mature, elle est très prolifique et présente une forte densité de population (1000 individus.m<sup>-2</sup>). De plus, elle a le plus petit génome végétal connu (5 chromosomes). Il est aujourd'hui entièrement séquencé. Il existe de nombreux mutants d'*A. thaliana* et des banques de séquence. Elle est donc devenue la plante modèle des biologistes moléculaires, bien qu'elle ne présente pas d'intérêt agronomique majeur. Son huile est en effet considérée comme une huile « rare » ou peu abondante (Bussard et Fron, 1905).

### 1.5.2. Levure : *Y. lipolytica*

Jusqu'à récemment, toutes les études sur les levures concernaient *Saccharomyces cerevisiae*, qui est responsable, entre autres, de la fermentation du pain et de la bière. Mais dès 1942, des chercheurs s'intéressent à une levure, appelée *Candida lipolytica* (puis *Yarrowia* dès 1980), qui possède des caractéristiques physiologiques peu communes (Barth et Gaillardin, 1996). En effet, cette levure, localisée notamment dans les produits laitiers et les charcuteries, peut croître sur des lipides et alcanes. Son génome est aujourd'hui entièrement séquencé (disponible sous forme de communication personnelle).

#### 1.5.2.1. Physiologie de la cellule

La fréquence de sporulation est lente et la viabilité des spores est faible (Romanos *et al.*, 1992). Ainsi, aucun cycle sexuel n'avait été démontré jusqu'à 1970 et elle avait été classée comme *Candida*. Sa température maximale de croissance est de 32-34 °C, en conditions aérobies. Elle assimile les n-alcanes, mais aussi les poly-alcools, les acides organiques et les

paraffines. Lorsqu'elle est cultivée sur du triacétate de glycérol comme seule source de carbone, il y a induction d'une activité extracellulaire lipolytique d'une estérase de basse masse moléculaire (Adoga et Matthey, 1979).

### 1.5.2.2. Métabolisme des lipides

Lors de la culture sur acide oléique, les substrats hydrophobes émulsionnés adhèrent à la surface de la levure (Aguedo *et al.*, 2003). On observe ensuite à l'intérieur de la levure une prolifération des peroxysomes. En effet, la principale voie de dégradation des alcanes en acides gras est la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale (Luo *et al.*, 2000). Lors de cette dégradation des acides gras, il apparaît des acides gras plus courts de deux carbones à chaque cycle (Figure 18).

Le métabolisme des substances hydrophobes est intéressant puisqu'il peut aboutir à la synthèse de composés d'arômes (par exemple la  $\gamma$ -décylactone pour l'arôme de pêche), de polymères, d'émulsifiants, ou intervenir en dépollution des sols ou d'effluents des industries agroalimentaires, telles que les huiles.

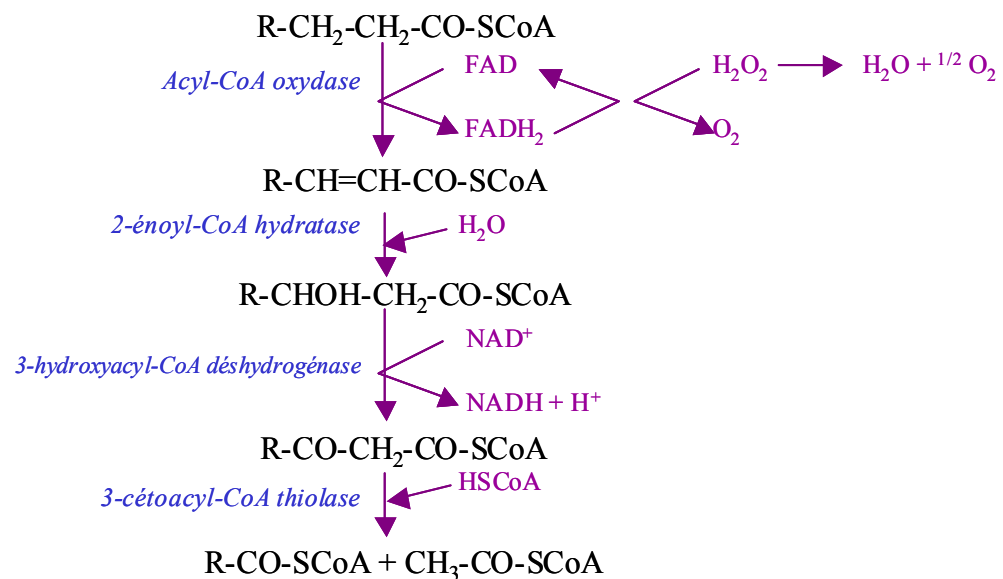


Figure 18 : Différentes étapes de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale.

Le stockage des acides gras est effectué sous la forme de TGs dans des vacuoles lipidiques. Au laboratoire, des études sont actuellement menées sur les acyl-coA oxydases (AoxP). Il en existe cinq isoformes chez *Y. lipolytica*. Chaque isoforme a une activité spécifique, plus ou moins marquée, selon les longueurs de chaîne des acides gras. Ainsi, en modifiant le pool d'AoxP de la levure, on peut espérer synthétiser des acides gras de longueurs variées. Ceci est

très important pour des applications industrielles : aspects nutritionnels et non alimentaires (savons, détergents et autres tensioactifs (Ohlrogge, 1994)).

Cette levure est capable de synthétiser un bioémulsifiant de nature lipide-protéine-polysaccharide lorsqu'elle est cultivée sur de l'huile du palmier Babassu comme seule source de carbone (Sarubbo *et al.*, 1999).

De nombreux facteurs influencent la production de lipase par les microorganismes : la source de carbone, la source d'azote, la présence d'activateurs, de stimulateurs ou d'inhibiteurs, les agents affectant l'interface, la température, le pH, l'inoculum (Hadeball, 1991).

### **1.5.2.3. Expression de protéines hétérologues**

Les levures peuvent être utilisées afin de produire des substances par génie génétique (Gaillardin et Heslot, 1987 ; Dominguez *et al.*, 1998). Elles présentent l'avantage par rapport aux bactéries de pouvoir faire des modifications post-traductionnelles des protéines (Romanos *et al.*, 1992). Ensuite, la séparation de la cellule et de la protéine d'intérêt est plus aisée dans la levure que chez la bactérie (classiquement *E. coli*). *Y. lipolytica* présente en plus l'avantage d'être GRAS (généralement admise comme saine). Alors que *Saccharomyces cerevisiae* (*S.c.*) secrète peu de grosses protéines dans le milieu de culture, *Y. lipolytica* peut sécréter en quantité abondante des enzymes hydrolytiques telles que la protéase alcaline extracellulaire, des protéases acides et une ARNase.

La compagnie Pfizer a montré la possibilité de produire et sécréter de la chymosine bovine par *Y. lipolytica* (Gaillardin et Heslot, 1988). Nicaud et ses collaborateurs (2002) ont utilisé *Y. lipolytica* pour produire une lipase extracellulaire de *Y. lipolytica* ainsi qu'une leucine-amino peptidase II d'*Aspergillus oryzae*.



## 1.6. But du travail

Dans une première partie, nous avons souhaité étudier la structure et la dynamique de globules lipidiques de levures, en comparaison à des oléosomes végétaux. Pour cela, nous avons choisi une plante modèle *A. thaliana* et une levure stockant en grande quantité des lipides : *Y. lipolytica*.

Dans une seconde partie, nous traitons des oléosines. Afin d'obtenir des oléosines recombinantes, nous avons utilisé deux systèmes connus pour leur efficacité dans l'expression de protéines recombinantes, l'un procaryote (la bactérie *E. coli*) et l'autre eucaryote (la levure *Y. lipolytica*). Après avoir déterminé le meilleur système d'expression des oléosines, nous les avons exprimées et purifiées. Nous nous sommes ensuite intéressés à leur structure ainsi qu'à leurs propriétés de surface à différentes interfaces. En effet, les oléosines ont été très étudiées ces dernières années mais la plupart des recherches ont porté sur la biogénèse des oléosomes et l'insertion des oléosines dans l'oléosome. Il y a peu de données disponibles actuellement sur les propriétés de surface aux interfaces, *in vitro*, de ces protéines fonctionnelles et les études passées n'ont toujours pas abouti à un consensus sur la structure des oléosines au sein de l'oléosome. Il existe en effet plusieurs hypothèses contradictoires : localisation en superficie de l'oléosome ou ancrage profond dans la matrice lipidique et structure du segment central majoritairement en hélices  $\alpha$  ou en feuillets  $\beta$ .

**Première partie :**  
**Les globules lipidiques**

## 2. Matériel et méthodes

---

Tous les réactifs sont de qualité analytique.

### 2.1. Stabilité d'émulsions huile /eau

#### 2.1.1. Composants

##### 2.1.1.1. PLs

Les PLs utilisés sont un mélange pour CLHP (chromatographie liquide haute performance) de la société Supelco. Ils sont composés de 7,8 mg de PLs de soja, dont 3,0 mg de PC, 2,4 mg de PE, 1,8 mg de Pi et 0,6 mg de lyso-PC. Après dissolution des PLs dans 2 mL de chloroforme, ils sont aliquotés en fractions de 1 mg et évaporés sous courant d'azote.

##### 2.1.1.2. TGs

- *Huile d'olive (Sigma diagnostics for lipase activity)*

L'huile d'olive native contient des phospholipides. Afin de s'affranchir de ces tensioactifs, nous purifions l'huile d'olive par des lavages successifs avec de l'eau milli-Q dans une ampoule à décanter. Un mélange d'huile d'olive / eau (v / v, 1 / 1,5) est vivement agité. L'ampoule est laissée à décanter puis les phases aqueuses et émulsionnées sont éliminées, seule la phase grasse homogène est conservée. L'opération est renouvelée autant de fois que nécessaire, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'émulsion visible.

- *Huile de tournesol de cuisine*

L'huile utilisée est de marque Leader Price et a été achetée dans la grande distribution. Pour les expériences réalisées sur la balance de Langmuir, elle a été au préalable filtrée sur colonne Sep-Pak Silica Cartridges (Waters Corporation, Massachusetts, USA). Chaque colonne ne sert qu'à filtrer 3 mL d'huile.

- *Trioléine et trilinoléine*

Un mélange trioléine / trilinoléine (1 / 2) décrit par Tzen et Huang (1992) a été utilisé. La trilinoléine C18 :2, [cis,cis]-9,12 et la trioléine C18 :1, [cis]-9 proviennent de chez Sigma et sont pures à 99 % environ.

### **2.1.2. Fabrication de l'émulsion**

Ce protocole a été établi à partir des articles de Tzen *et al.* (1992 et 1998), Chen et Tzen (2001) et Beisson *et al.* (2001b) pour reconstituer des oléosomes. 0,01 mg de PLs dissous dans du chloroforme sont mis au fond d'un microtube et le chloroforme est évaporé sous courant d'air comprimé. 3,3  $\mu$ L de TGs sont ensuite ajoutés dans le tube. Le volume est complété à 1 mL par ajout d'un tampon de phosphate de sodium pH 7,5 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ). Après 30 s d'agitation au vortex, les solutions sont soniquées à l'aide d'un appareil Digital Sonifier II, W-450 (Branson, Genève, Suisse) sur lequel est adapté une sonde en titane de 3 mm (adaptée à des volumes de 0,3 à 5 mL). La puissance maximale délivrée par l'appareil est de 400 W. Nous l'utilisons à 10 % de sa puissance (soit environ 10 W délivrés dans 1 mL) pendant 15 s, suivi de 5 min de repos de l'échantillon sur de la glace. L'opération est renouvelée 2 fois (entre deux échantillons, la sonde est soigneusement lavée et séchée).

### **2.1.3. Suivi de la stabilité de l'émulsion**

#### **2.1.3.1. Spectrophotométrie**

On suit le crémage de l'émulsion par la diminution de l'absorbance dans sa partie inférieure, les lipides montant peu à peu à la surface. Pour cela, l'émulsion est transférée dans une cuve spectrophométrique à usage unique de capacité 1 à 3 mL (dimensions de la fenêtre de lecture (mm) : 23 x 5 x 10) recouverte d'un parafilm. La variation de la turbidité de l'émulsion est suivie par la mesure à 20 °C de l'absorbance à 600 nm de la phase inférieure à intervalles réguliers (toutes les 30 minutes) pendant des temps longs (de 15 h à 5 jours) sur un appareil DU 640B Spectrophotometer (Beckman-Coulter, USA). Les cuves restent dans l'appareil pendant toute la cinétique.

Le résultat est représenté graphiquement de l'une des façons suivantes :

- $A = f(t)$
- $A / A_0 = f(t)$  d'après Kim *et al.* (2002)
- $T / T_0 = f(t)$  avec T la turbidité,  $T = 10^A$  (Tzen et Huang, 1992)

#### **2.1.3.2. Microscopie optique**

Une goutte de l'émulsion est déposée sur une lame, puis recouverte d'une lamelle. L'émulsion est ainsi observée au microscope optique avec un objectif à immersion 100 x (appareil Olympus BX51) afin de mesurer la taille des globules gras. Les photographies sont prises avec une caméra Cool SNAP d'oculaire 10 x, couplée au microscope, et enregistrées à l'aide du logiciel Photometrics Cool SNAP.

Afin de mettre en évidence l'origine lipidique des globules observés (Greenspan *et al.*, 1985), une coloration au rouge Nil (Molecular Bioprobe) de l'échantillon a été réalisée. La solution mère est constituée de 1 mg de rouge Nil dissous dans 1 mL d'éthanol et est conservée à -20 °C. Pour colorer les globules lipidiques, la solution mère est diluée 10 fois dans de l'éthanol puis est ajoutée sur la lame, au bord de la lamelle. Le rouge Nil pénètre par diffusion entre la lame et la lamelle. Après 30 min de repos, les corps lipidiques sont observés à travers des filtres WIG ou WB pour fluorescence.

### **2.1.3.3. Diffusion dynamique de la lumière**

La diffusion dynamique de la lumière permet de déterminer la taille (rayon hydrodynamique) des particules diffusantes, leur masse moléculaire (si d'autres paramètres sont connus) et dans certains cas, la poly-dispersité. Pour cela, l'échantillon est éclairé par un faisceau lumineux polarisé linéairement délivré par un laser. Le principe de la diffusion de la lumière est basé sur l'analyse de l'interaction entre un faisceau laser et une émulsion pour en déduire le coefficient de diffusion des particules. L'interaction entre les particules et les ondes électromagnétiques produit un modèle de diffraction dont la nature dépend de la position relative des particules dans la cellule de mesure. Si ce modèle de diffraction est observé sur un temps très court, on observe des variations de l'intensité diffractée avec le temps. Ces fluctuations sont induites par le mouvement des particules dû à l'agitation thermique : autrement dit, la fréquence des variations dépend de la vitesse des particules et donc de la taille de ces dernières. Le diamètre hydrodynamique des particules est calculé selon la théorie de Mie. L'appareil utilisé est un modèle à rétrodiffusion HPPS 5001 de la société Malvern Instruments. Il permet de mesurer des diamètres hydrodynamiques compris entre 0,6 et 6000 nm, correspondant à des masses moléculaires de  $10^3$  (ou moins : exemple du cholestérol) à  $10^7$  Da. Il est sensible jusqu'à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de lysozyme et les volumes requis sont de 12  $\mu\text{L}$  à 3 mL. La température est régulée par effet Peltier. Pour pouvoir déduire des tailles de particules à partir d'une mesure par diffusion de la lumière, il est nécessaire de connaître les paramètres de viscosité et l'indice de réfraction des particules et du solvant. D'après Attaie et Richter (2000) et Michalski *et al.* (2001), à 20 °C, l'indice de réfraction (n) de globules gras du lait est estimé à 1,45-1,46 et celui de l'eau est de 1,33. La viscosité de l'eau en fonction de la température est donnée par des tables (annexe 1). Les particules lipidiques sont diluées dans de l'eau milli-Q. Par ailleurs, des particules de latex (standard de diamètre  $199 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ , Duke Scientific), dissoutes dans de l'eau milli-Q sont utilisées pour vérifier la validité de la mesure. Les expériences sont réalisées dans une microcuve plastique de contenance 1 mL, à 20 °C. Les mesures sont

réalisées en mode automatique. Chaque mesure consiste en 10 à 15 cycles de 10 s et est répétée 5 fois.

## **2.2. Globules lipidiques d'*A. thaliana***

### **2.2.1. Isolement des corps lipidiques**

L'isolement des corps lipidiques vise à récupérer des globules complets, comportant les TGs, la demi-membrane de PLs et les protéines spécifiques associées, tout en s'affranchissant de protéines extérieures. Pour cela, une première étape consiste à séparer les particules lipidiques du reste de la graine par des gradients en sucres et des centrifugations. Une deuxième étape permet d'extraire les protéines extérieures à l'oléosome par des lavages avec des détergents et des sels. Le protocole est adapté de Tzen *et al.* (1997). Tous les tampons utilisés ont été filtrés à 0,2 µm. Des graines d'*A. thaliana* (150 mg) (écotype Wassilewskja, offertes par M. Miquel, UMR Biologie des Semences, INRA, Versailles) sont trempées dans l'eau pendant 1 h puis égouttées. Elles sont ensuite broyées, par 20 mouvements dans un potter (animé à l'aide d'un moteur Heidolf à la vitesse 7) en présence de 4 mL de tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 contenant 0,6 M de saccharose. Entre deux broyages de 15 s dans le potter, l'échantillon est laissé 15 s sur de la glace. Le potter est rincé avec 8 mL du tampon précédent. Puis 3 x 4 mL de suspension sont placés dans 3 tubes à centrifugeuse de 10 mL et 3 x 4 mL de tampon phosphate 10 mM pH 7,5 contenant 0,4 M de saccharose y sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés 30 min, à 10000 x g, à 4 °C dans une centrifugeuse centricon T-2060 (Kontron) équipée d'un rotor balançoire. Les corps lipidiques sont ensuite collectés à la surface du tube puis resuspendus dans un tube Falcon avec 12 mL de tampon phosphate 5 mM pH 7,5, 0,2 M de saccharose et 0,1 % de Tween 20. 3 x 4 mL de la suspension sont répartis à nouveau dans des tubes, auxquels on ajoute 3 x 4 mL de tampon phosphate 10 mM pH 7,5 puis une nouvelle centrifugation est réalisée. Les corps lipidiques qui surnagent sont resuspendus dans 12 mL de tampon phosphate 10 mM pH 7,5, 0,6 M saccharose et 2 M NaCl. Après séparation en 3 tubes, 4 mL de tampon phosphate 10 mM pH 7,5, 0,25 M saccharose et 2 M NaCl sont ajoutés dans chaque tube pour une dernière centrifugation. La fraction lipidique est collectée en surface et resuspendue dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5 contenant 0,6 M de saccharose. Les échantillons sont conservés à 4 °C.

## 2.2.2. Analyse des protéines

### 2.2.2.1. Électrophorèse en milieu dénaturant

Un volume correspondant à 1 à 10 µg de protéines est repris dans un même volume de tampon de solubilisation (Tp SDS-βME) [62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 % SDS (p / v), 10 % glycérol (p / v), bleu de bromophénol 0,001 % (p / v), 5 % β-mercaptoéthanol (v / v)] et portés à 100 °C pendant 5 min. Le marqueur de taille déposé (8 µL / puits) est du « Mark12™ Wide Range Protein standard » de la société Invitrogen.

Deux types de gels ont été utilisés pour les dépôts :

- des gels Novex Tris-glycine, 4 - 20 % de polyacrylamide (Invitrogen)

La migration se fait dans un tampon Tris - glycine - SDS (0,3 % Tris-base (p / v), 1,44 % glycine (p / v), 0,1 % SDS (p / v)) à un voltage constant de 120 V pendant environ 1h30 dans une cuve « Novex mini-cell X-Cell sure lock » (Invitrogen).

- des gels Novex Nu-page Bis-Tris, 4 - 12 % de polyacrylamide

Dans ce cas, la migration a été faite dans un volume total de 400 mL d'un tampon « Nu-Page MES SDS running » (solution stock 20x de la société Invitrogen). Aux 200 mL de tampon de la cathode (partie centrale entre les deux gels) ont été ajoutés 500 µL d'antioxydant Nu-Page (Invitrogen). Une intensité constante de 40 mA pour un gel (ou 80 mA pour deux gels en parallèle) a été appliquée.

Les protéines sont enfin colorées au bleu de Coomassie (méthode de Neuhoff *et al.*, 1988) : le gel est mis à tremper dans un mélange, préparé extemporanément, contenant 10 mL d'une solution de bleu de Coomassie G-250 (0,4 % (p / v)), 10 mL de méthanol et 90 mL d'une solution à 1 % de sulfate d'ammonium (p / v) et 0,25 % d'acide phosphorique (commercial à 85 %). Après 2 h minimum dans le tampon de coloration, le gel est rincé à l'eau puis séché dans une solution à 5 % en glycérol (p / v) et 30 % en éthanol (v / v). L'image du gel est reproduite à l'aide d'un scanner photo Epson Perfection 1200, à 300 dpi. L'intensité de la coloration au bleu de Coomassie peut ensuite être évaluée à l'aide du logiciel de dynamique moléculaire Image Quant (version 4.2a) sur des images enregistrées en « .tiff ». L'identification des protéines par spectrométrie de masse est décrite dans l'article de Jolivet *et al.* (soumis à publication en 2003).

La présence d'oléosines sur le gel peut être détectée à l'aide d'anticorps spécifiques.

#### 2.2.2.2. Immunochimie

- *Obtention d'anticorps polyclonaux*

Des anticorps anti-oléosine S4 d'*A. thaliana* recombinante ont été obtenus par S. Denery (Unité de recherche sur les protéines végétales et leurs interactions, INRA, Nantes). Pour cela, nous avons fourni un échantillon de 200  $\mu\text{L}$  à 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de rS4 pure (chapitre 5.3.3), de concentration en urée inférieure à 2 M, qui a servi à faire 5 injections sur 9 mois d'un mélange adjuvant de Freund / protéine (1 / 1) chez un lapin. Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant la première injection (sérum pré-immun) puis à intervalles réguliers avant la saignée finale. Les sérums obtenus ont été testés (chapitre 5.3.3.6).

- *Immunodétection*

- ◆ *Électrophorèse*

Les électrophorèses ont été conduites selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2.2.1. Les quantités de protéines déposées sont de l'ordre de 0,1  $\mu\text{g}$  et le marqueur Mark 12 est remplacé par un marqueur coloré. 7  $\mu\text{L}$  du marqueur « SeeBlue Pre-Stained Standard » d'Invitrogen (visible sur les membranes après transfert) ont ainsi été déposés sur les gels.

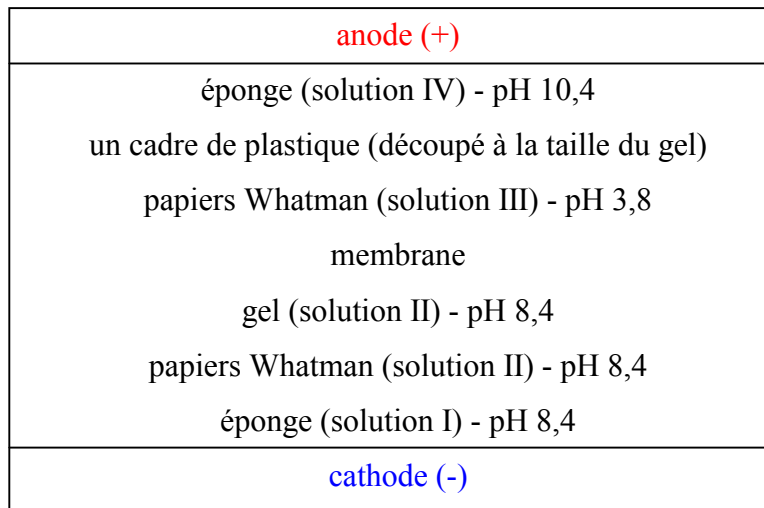
- ◆ *Transfert semi-sec sur membrane (d'après Laurière, 1993)*

Le transfert des protéines du gel vers une membrane est effectué selon le principe suivant : le gel est placé en condition basique, en présence de SDS. Les protéines sont ainsi éluées hors de l'acrylamide. Leur migration est ensuite stoppée au niveau de la membrane par un pH acide et la présence de méthanol.

Ainsi, à la fin de la migration, le gel d'électrophorèse est mis à tremper dans une solution II (0,135 % acide lactique (p / v), 0,302 % Tris-base (p / v), 0,1 % SDS (p / v), pH 8,4). Parallèlement une membrane Immobilon-P de Millipore en PVDF, pores de 0,45  $\mu\text{m}$ , découpée à la taille du gel, est mouillée à l'éthanol puis rincée avec de l'eau distillée. 3 papiers Whatman (3MM Chr), de la taille du gel, sont mouillés avec de la solution II précédente et 3 autres avec une solution III (60 mM acide lactique, 20 mM Tris-base, 20 % isopropanol (v / v), pH 3,8). Une éponge (0,5 \* 19 \* 20 cm) est imbibée de 90 mL de solution I (60 mM acide lactique, 100 mM Tris-base, 0,4 % SDS (p / v), pH 8,4) et une autre est recouverte de 90 mL d'une solution IV (100 mM Tris-base, 20 % isopropanol (v / v), pH 10,4). Les pH des solutions sont ici donnés à titre indicatif, mais ils ne sont jamais ajustés. Les couches sont ordonnées selon la Figure 19, tout en faisant bien attention de ne pas faire de bulles d'air entre les différentes couches, ce qui perturberait le passage du courant. Pour cela,



nous passons un petit rouleau de verre sur le sandwich. Une tension de 36 V est appliquée pendant 1h à 1h30 pour permettre le transfert à l'aide d'un appareil MilliBlot - Graphite Electroblotter de la société Millipore. Au bout de ce temps, la membrane est récupérée et laissée à sécher. Elle peut alors être conservée plusieurs semaines avant d'effectuer l'immunodétection.



**Figure 19 : Transfert sur membrane d'un gel d'électrophorèse.**

◆ *Immunorévélation*

Des anticorps anti-oléosines d'amande, fournis par F. Beisson et V. Arondel (Laboratoire de lipolyse enzymatique, CNRS, Marseille) ou des anticorps anti-oléosine S4 d'*A. thaliana* recombinantes ont été utilisés. Les anticorps anti-oléosines d'amande sont des IgY. Ils ont été obtenus chez la poule à partir de la protéine entière dénaturée par du SDS. Leur concentration est de 11,3 mg.mL<sup>-1</sup>. Les anticorps conjugués ont été commandés auprès d'Interchim. Ils ont été obtenus chez la chèvre à une concentration de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>. Les anticorps anti-rS4 ont été obtenus chez le lapin. Les anticorps conjugués dirigés contre les anticorps de lapin ont une concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Ils ont été obtenus chez la chèvre par la société Biosys. Tous les anticorps conjugués utilisés sont couplés à la phosphatase alcaline.

La membrane sèche est mouillée avec de l'éthanol puis rincée à l'eau et disposée dans une boîte légèrement plus grande que sa taille. 20 mL d'une solution de TBS 1x (solution stock 5x : 4,5 % NaCl, 0,6057 % Tris-base, 4,2 % HCl 1 M (v / v), pH 7,4) contenant 1 % de sérum albumine bovine (SAB) sont ajoutés et mis en contact, avec agitation sur plaque, pendant 30 min afin de saturer la membrane. La boîte est vidée puis 20 mL de TBS-Tween-SAB (TBS 1x, 0,05 % Tween 20, 1 % SAB) et des anticorps anti-oléosine d'amande dilués 1/5000 ou des anticorps anti-rS4 dilués 1/1000 sont ajoutés, le contact est maintenu pendant 1h avec

agitation sur plaque. Nous procédons ensuite à une première étape de lavage : la boîte est d'abord vidée puis 20 mL de TBS-Tween-SAB sont ajoutés, la membrane est retournée dans sa boîte, le liquide est éliminé, puis 4 fois de suite, nous ajoutons 20 mL de TBS-Tween-SAB, agitons pendant 10 min puis vidons la boîte. Nous mettons alors en contact la membrane avec l'anticorps conjugué de la manière suivante : dans 20 mL de TBS-Tween-SAB, des anticorps couplés à la phosphatase alcaline anti-poule dilués 1/50000 ou anti-lapin dilués 1/2000 sont ajoutés. L'anticorps est, à nouveau, laissé au contact de la membrane pendant 1 h, sous agitation, puis une nouvelle étape de lavage en TBS-Tween (TBS 1x, 0,05 % Tween 20) est effectuée avec un cycle supplémentaire par rapport à l'étape précédente. Après trois lavages d'une minute en TBS 1x, 1 comprimé de NBT/BCIP (*NitroTetrazolium Blue / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate*, Roche), dilué dans 10 mL d'eau, est mis dans la boîte et très rapidement la coloration apparaît. Quand la révélation est suffisante, le liquide est jeté et de l'acide acétique 0,1 M est additionné pour bloquer la réaction puis un dernier rinçage à l'eau est effectué. La membrane est mise à sécher à l'air libre puis scannée.

### **2.3. Isolement des globules lipidiques de levure**

Ce travail a été réalisé à Graz (Autriche), dans l'institut de biochimie de la Technische Universität, avec le Pr. G. Daum et le Dr. K. Athenstaedt.

#### **2.3.1. Souche**

Une souche sauvage de *Y. lipolytica* W29 (ATCC20460) a été utilisée.

#### **2.3.2. Culture**

Deux milieux ont été utilisés pour cultiver la souche de *Y. lipolytica* sauvage. Tout d'abord un milieu riche, composé à 80 % d'YPD (*Yeast Peptone Dextrose*, 1 % extrait de levure (p / v), 1 % bactopeptone (p / v), 2 % glucose (p / v)) et 20 % d'un tampon phosphate pH 6,8 de concentration stock 0,5 M. Ensuite, un milieu minimum, dépourvu d'azote aminé et enrichi en acide oléique, a été utilisé. Ce milieu est constitué de 0,17 % de YNB (*Yeast Nitrogen Base*) sans sulfate d'ammonium ni acides aminés, 0,5 % de chlorure d'ammonium, 50 mM de tampon phosphate pH 6,8, 0,1 % d'extrait de levure et 5 % d'acide oléique, apporté sous forme d'émulsion. L'émulsion stock d'acide oléique est préparée par sonication (3 fois 15 s, 10 % puissance) extemporanément à partir de 25 mL d'acide oléique, 25 mL d'eau milli-Q stérile et 0,25 mL de Tween 40.

Les précultures sont réalisées dans 5 mL de milieu riche, sur la nuit, en tube en verre à partir de cellules fraîchement étalées sur boîte de Pétri YPD agar. Le lendemain, le milieu de culture minimum estensemencé avec 0,5 unité d'absorbance par millilitre de milieu. Pour cela, 1 mL de préculture est prélevé, puis centrifugé 2 min à 14000 x g. Après élimination du surnageant, le culot de cellules est lavé avec de l'eau milli-Q. L'opération de lavage est répétée à nouveau deux fois. On reprend alors les cellules dans 1 mL final d'eau milli-Q. La mesure de l' $A_{600\text{nm}}$  de la préculture est réalisée. Avant d'ensemencer le milieu de culture, le volume adéquat de préculture est lavé selon le protocole décrit ci-dessus de façon stérile. Les cultures sont faites dans des erlenmeyers à baffles, de façon aérobie, sous une agitation orbitale de 180 rpm à 28 °C pendant 3 h, 20 h ou 40 h maximum. A la fin de la culture, le rendement est estimé par une mesure de l' $A_{600\text{nm}}$  après lavages à l'eau, puis les cellules sont récoltées par centrifugation 3000 x g, 3 min, à la température du laboratoire et elles sont lavées trois fois avec une solution aqueuse de SAB à 0,5 % et une fois à l'eau milli-Q. Au final, les cellules sont reprises dans un volume d'eau distillée identique au volume de culture initiale.

### **2.3.3. Extraction des lipides totaux**

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch *et al.* (1957). 50 mL de culture lavée sont centrifugés. Les cellules sont resuspendues dans 10 mL d'eau distillée et 20 mL de billes de verre (diamètre 0,45  $\mu\text{m}$ ) sont additionnées. L'échantillon est placé 3 min dans un appareil Merkenschlager, vibreur refroidi sous courant de  $\text{CO}_2$ . L'échantillon est alors additionné de 90 mL d'un mélange chloroforme / méthanol (2 / 1) et est incubé une heure à température du laboratoire, sous agitation à l'aide d'un barreau magnétique. Après 1 min de repos, le liquide est récupéré et les billes de verre sont rincées avec 20 mL de  $\text{CHCl}_3$  / méthanol. La nouvelle phase liquide est récupérée et est regroupée avec la première. On y ajoute alors un volume de  $\text{MgCl}_2$  à 0,034 % équivalent à un quart du volume de l'extrait. L'échantillon est placé 5 min sous agitation puis centrifugé 3 min à 3000 x g. La phase supérieure aqueuse est aspirée à l'aide d'une trompe à vide, puis jetée. La phase inférieure chloroformique et l'interface sont reprises avec un même volume d'un mélange méthanol / eau / chloroforme (48 / 47 / 3). Après 5 minutes sous agitation, l'échantillon est centrifugé, la phase aqueuse est à nouveau éliminée et l'interface et la phase inférieure lavées avec le mélange méthanol / eau / chloroforme (48 / 47 / 3). On procède ainsi à trois lavages. A la fin du troisième lavage, seule la phase inférieure chloroformique est conservée (l'interface est éliminée à l'aide d'une spatule). Elle est transférée dans un ballon et est évaporée avec un rotavapor. Le ballon sec est rincé par 2 fois 2 mL de chloroforme / méthanol (2 / 1) pour permettre le transfert en petits

tubes de verre. Le solvant est à nouveau évaporé et les échantillons sont conservés à sec à -20 °C.

#### **2.3.4. Dosage des phospholipides**

##### **2.3.4.1. Dosage du phosphore (d'après Broekhuysse, 1968)**

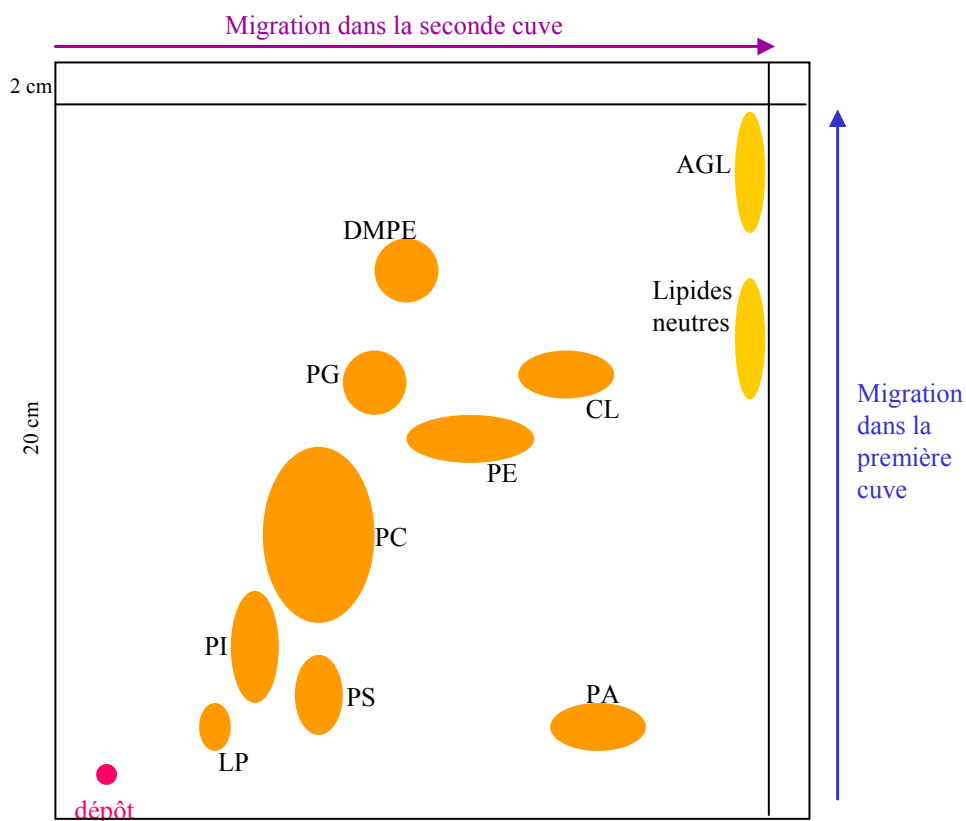
La verrerie utilisée pour ce dosage est sans phosphate. L'extrait lipidique précédent est repris dans exactement 2 mL de chloroforme / méthanol (2 / 1, v / v). Après dilution au 1 / 50 d'une partie de cet extrait, dans du chloroforme / méthanol, on en introduit 20 µL dans un premier tube et 40 µL dans un second. Deux quantités de standard sont aussi utilisées : 15 µL (représentant 2,99 µg de phosphate) et 25 µL (4,98 µg phosphate). Un dernier tube vide constitue le témoin négatif. Les tubes sont placés 5 min sur une plaque électrique à thermostat 4 (la chauffe maximale de la plaque est de 6) afin d'évaporer le solvant.

0,4 mL d'un mélange HClO<sub>4</sub> / H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 / 9, v / v) sont introduits dans les tubes. Les tubes sont vortexés puis ils sont placés, sans leurs bouchons, sur la plaque électrique réglée sur 5 pendant 30 min. Après refroidissement des tubes, 9,6 mL d'un mélange ANSA (acide sulfonique 1-amino-2-hydroxy-4-naphthalène de la société Merck) / molybdate (22 mL / 500 mL) sont ajoutés. Les tubes sont soigneusement bouchés (bouchons rodés et clips), vortexés puis chauffés 20 min dans un bain-marie à 90 °C. Au bout de ce temps, les échantillons contenant du phosphore ont pris une couleur bleue alors que le témoin est incolore. Les tubes sont refroidis puis centrifugés 3 min à 1500 x g pour culotter la silice, lorsque les phospholipides ont été séparés au préalable par chromatographie sur couche mince (chapitre ci-après). On procède alors à une lecture au spectrophotomètre de l'absorbance des échantillons, à 830 nm (la couleur est stable pendant 2 h). Les quantités de phosphore sont calculées à partir des absorbances lues, en fonction du standard.

##### **2.3.4.2. Séparation des phospholipides**

Les différents phospholipides sont séparés par une chromatographie sur couche mince en migration bidimensionnelle (Figure 20). Les plaques sont des feuilles d'aluminium, de dimensions 20 x 20 cm, recouvertes de gel de silice 60 F<sub>254</sub> et proviennent de la société Merck.

L'extrait lipidique est repris dans du chloroforme / méthanol (2 / 1, v / v) pour déposer 20 µg de phosphate total. Le dépôt est fait en un point à 2 cm des bords de la plaque. La première migration s'effectue dans une cuve saturée en CHCl<sub>3</sub> / méthanol / NH<sub>3</sub> 25 % (65 / 35 / 5, en v). Après séchage, la plaque est tournée de 90 ° et la deuxième migration est effectuée dans un mélange CHCl<sub>3</sub> / acétone / méthanol / acide acétique / eau (50 / 20 / 10 / 10 / 5, en v). Les plaques sont révélées par incubation 2 min dans une cuve saturée à l'iode. Les tâches jaunes de phospholipides sont alors entourées au crayon de papier. La plaque est ensuite séchée au sèche-cheveux jusqu'à disparition des tâches.



**Figure 20 : Dessin des plaques de silice pour la séparation des phospholipides et localisation des phospholipides après la révélation à l'iode (CL : cardioline, DMPE : diméthyl-phosphatidyléthanolamine, PG : phosphatidylglycérol, PE : Phosphatidyléthanolamine, PC : phosphatidylcholine, Pi : phosphatidylinositol, PS : phosphatidylsérine, PA : acide phosphatidique, LP : lysophospholipides, AGL : acides gras libres).**

### 2.3.4.3. Dosage des phospholipides

Les plaques de silice, sur lesquelles les phospholipides ont été séparés, sont vaporisées d'eau milli-Q pour être légèrement ré-humidifiées. Les tâches sont alors grattées à l'aide d'un morceau de lame de rasoir maintenu avec une pince. Les rouleaux de silice détachés sont introduits dans des tubes en verre (sans phosphate). Un témoin négatif est constitué de silice

grattée dans un coin de la plaque resté blanc après la révélation à l'iode. 15  $\mu\text{L}$  de standard (2,99 g de phosphate) sont aussi directement introduits dans un tube. Les morceaux de silice sont séchés par un passage dans une étuve à 100 °C pendant 25 min.

Après refroidissement, le standard, le blanc et les phospholipides sont traités en parallèle, selon le même protocole que celui décrit précédemment pour le phosphate total (à partir de l'introduction des 0,4 mL du mélange  $\text{HClO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ ).

### 2.3.5. Dosage des ergostérols et des esters d'ergostérols

Des quantités croissantes d'extraits lipidiques dilués dans du chloroforme / méthanol (2 / 1, v / v) et des quantités croissantes de standard d'ergostérol (Boehringer, Mannheim, Allemagne) sont déposées à intervalles réguliers sur une plaque de silice de dimensions 20 x 10 cm (Figure 21) à l'aide d'un appareil Linomat IV (CAMAG, Muttenz, CH).

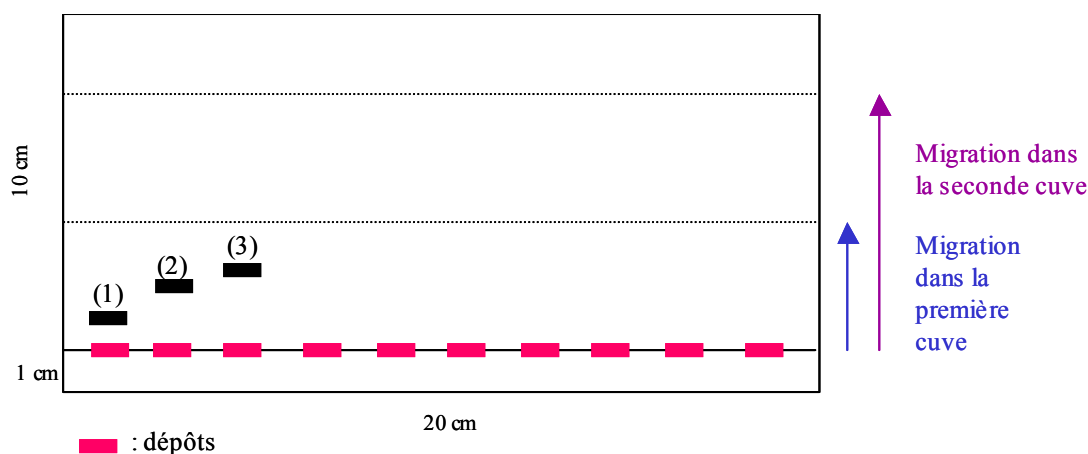


Figure 21 : Schéma de la plaque de silice utilisée pour la quantification des triglycérides (2), des ergostérols (1) et des esters d'ergostérols (3).

La plaque est tout d'abord placée dans une cuve saturée en éther de pétrole / éther éthylique / acide acétique (20 / 20 / 0,8 en v). Lorsque le front de solvant atteint 4 cm à partir du bas de la plaque (soit environ un tiers de la hauteur de la plaque), la plaque de silice est retirée de la cuve et séchée brièvement avec un sèche-cheveux pour éliminer l'odeur d'acide acétique. Elle est ensuite mise, dans la même direction, dans une deuxième cuve saturée en éther de pétrole / diéthyléther (49 / 1, v / v). La migration est arrêtée lorsque le front de solvant se trouve à 7 cm du bas de la plaque (soit environ deux tiers de la hauteur de la plaque).

Après séchage de la plaque, les bandes d'ergostérols et d'esters d'ergostérols sont quantifiées à l'aide d'un scanner Shimadzu CS 930, à 275 nm.

### **2.3.6. Dosage des triglycérides (d'après Athenstaedt *et al.*, 1999)**

La migration est la même que pour les triglycérides. Le standard utilisé est de la trioléine (NuCheck, Inc., Elysian, Maine). A la fin de la migration, la plaque sèche est plongée 6 s exactement dans une solution composée de 0,8 g de  $MnCl_2$ , 8 mL de  $H_2SO_4$ , 120 mL d'eau et 120 mL de méthanol. La révélation est effectuée par chauffage de la plaque dans une étuve à 101 °C pendant 30 min. Il apparaît alors des bandes brunes qui sont quantifiées par le scanner Shimadzu à 400 nm.

### **2.3.7. Dosage des acides gras**

Après méthylation des échantillons (d'après Morrison et Smith, 1964), ils sont analysés par CPG (chromatographie en phase gazeuse) selon le protocole décrit par Athenstaedt *et al.* (1999).

#### **2.3.7.1. Méthylation des acides gras**

50  $\mu$ L d'extraits lipidiques, solubilisés dans du chloroforme / méthanol (2 / 1, v / v), sont introduits dans des tubes en verre à bouchon à vis. Le chloroforme / méthanol est évaporé sous courant d'azote puis 1 mL de  $BF_3$  / méthanol 14 % est ajouté. Les tubes sont soigneusement re-bouchés et incubés pendant 10 min dans du sable chauffé à 100 °C. Après refroidissement, on ajoute 0,86 mL de benzol et on chauffe pendant 30 min à 100 °C. Lorsque les tubes sont froids, 1 mL d'eau est ajouté. On procède alors à 3 extractions à l'éther de pétrole : incubation 15 min avec 2 mL d'éther de pétrole puis centrifugation 2 min à 2000 x g. A chaque extraction, la phase supérieure est récupérée et transvasée dans un tube propre. L'éther de pétrole est finalement évaporé sous courant d'azote. Les esters méthyliques sont stockés à -20 °C.

#### **2.3.7.2. CPG**

Les esters méthyliques sont séparés et quantifiés à l'aide d'un chromatographe Hewlett Packard 5890 couplé à un détecteur à ionisation de flamme (320 °C) et d'une colonne capillaire Hewlett Packard 5 (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu$ m d'épaisseur de film). Après 2 min à 150 °C, la température est élevée à 300 °C progressivement (10 °C.min<sup>-1</sup>). La température de 300 °C est maintenue 5 min. Le gaz porteur est de l'azote et 1  $\mu$ L d'échantillon est injecté dans la colonne (température de l'injecteur : 320 °C). Les acides gras sont identifiés par comparaison à des standards commerciaux d'esters méthyliques d'acides gras (NuCheck, Inc., Elysian, MN).

### 2.3.8. Isolement des corps lipidiques

Les particules lipidiques sont isolées selon un protocole dérivé de ceux de Daum *et al.* (1982) pour l'extraction des sphéroplastes et de Leber *et al.* (1994) pour l'isolement des particules lipidiques à partir des sphéroplastes. Les cellules cultivées pendant 20 h, à 28 °C, en milieu minimum enrichi à 5 % d'acide oléique ont été récoltées puis lavées trois fois avec 0,5 % de SAB et une fois à l'eau milli-Q. Pour 1 g de masse humide, récupéré après centrifugation et élimination du surnageant, 2 mL d'un tampon A (0,1 M Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 9,4) et 3,086 mg de 1,4-dithiothreitol sont ajoutés sur le culot de cellules. L'échantillon est incubé 10 min à 30 °C sous agitation puis centrifugé. Le culot de cellules obtenu est resuspendu avec 6,67 mL d'un tampon B (1,2 M sorbitol, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,42) et 2 mg de zymolase (lyticase, Sigma). Cette enzyme clive les structures glucidiques de la paroi cellulaire de la levure et on aboutit à la formation de sphéroplastes (Zinser et Daum, 1995). Après 45 min à 30 °C, sous agitation, la concentration en sorbitol de l'échantillon est abaissée à 0,8 M par ajout d'eau milli-Q. Toutes les étapes suivantes se font à froid, avec des solutions conservées sur de la glace pour maintenir les organelles intactes. Les cellules sont alors centrifugées puis lavées 2 fois avec le tampon B dilué à 0,8 M sorbitol. Afin d'isoler les particules lipidiques à partir de ces sphéroplastes, on broie les cellules par 30 mouvements minimum d'aller-retour dans un potter, sur de la glace, en présence de 5 mL d'un tampon A (6 % ficoll 400 en tampon 10 mM MES/Tris pH 6,9 et 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA) et de PMSF (1 mM final, en stock dans du DMSO). L'échantillon est transféré dans des tubes à ultra-centrifugeuse, en les remplissant à ras bord avec du tampon A. Après 60 min de centrifugation à 100000 x g, la phase supérieure grasse est récoltée à l'aide d'une spatule et transférée dans un potter propre. On dilue alors par un petit volume d'un tampon C (0,6 M sorbitol et 8 % ficoll dans un tampon 10 mM MES/Tris pH 6,9 et 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA), en présence de 1 mM de PMSF, et on procède à une homogénéisation par quelques mouvements doux du piston dans le potter. L'échantillon, contenu dans le potter, est alors récupéré dans une seringue puis vidé doucement au fond d'un tube à ultra-centrifugeuse rempli au préalable d'un tampon D à 0,25 M sorbitol dans 10 mM MES/Tris pH 6,9 et 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA. On crée ainsi un gradient en concentration de sorbitol dans le tube. Après une centrifugation de 30 min à 100000 x g, la phase supérieure grasse est à nouveau récupérée et transférée dans un potter propre en présence d'un peu de tampon D et de PMSF, broyée, puis est mise au fond d'un tube rempli d'un tampon E (0,15 M sorbitol dans un tampon 10 mM MES/Tris pH 6,9 et 0,2 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Après une dernière étape de



centrifugation à 100000 x g pendant 30 min, les corps lipidiques flottant à la surface des tubes sont récupérés.

Une étape supplémentaire de lavage des corps lipidiques peut être effectuée en présence de KCl afin d'améliorer la purification et l'élimination de protéines contaminantes. Pour cela, 500 µL de corps lipidiques sont incubés avec 500 µL de KCl 1 M pendant 15 min sur de la glace, en mélangeant doucement toutes les 5 min par retournement du microtube. L'échantillon est ensuite transvasé dans un tube à ultra-centrifugeuse rempli de solution de KCl. Après une centrifugation de 15 min à 100000 x g à 4 °C, les corps lipidiques isolés et purifiés sont récupérés à la surface du tube.

#### **2.3.8.1. Analyse quantitative des protéines totales**

Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) après délipidation des échantillons au diéthyl-éther et précipitation des protéines au TCA. La délipidation est conduite de la manière suivante : on ajoute 2 volumes de diéthyl-éther à 1 volume de corps lipidiques purs d'environ 200 µL. Le mélange est vortexé toutes les 5 min pendant 20 min puis centrifugé 10 min à 4 °C, 15000 x g. La phase supérieure est enlevée par aspiration et le reste d'éther évaporé sous courant d'azote. La phase inférieure aqueuse est récupérée et les protéines sont précipitées au TCA selon le protocole suivant : l'échantillon est complété à 400 µL par ajout d'eau milli-Q et 100 µL de TCA 50 % froid sont ajoutés (concentration finale de 10 %). Après 1 h d'incubation sur la glace, on centrifuge 10 min à 15000 x g. La phase supérieure est éliminée par aspiration. Le culot de protéines est repris avec 125 µL d'une solution contenant 0,1 M de NaOH et 0,1 % de SDS. L'échantillon est incubé à 37 °C et il est régulièrement vortexé pendant 30 min. Dans un tube en verre, 300 µL d'eau milli-Q, 100 µL d'échantillon protéique et 2 mL d'une solution composée de 220 µL de tartrate disodique à 2,2 % (p / v), 220 µL de sulfate de cuivre à 1 % (p / v), 550 µL de SDS à 20 % (p / v) et 22 mL de NaOH 0,1 M contenant 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont mélangés au vortex. Après 10 min d'attente, 200 µL de réactif de Folin et Ciocalteu (2 / 1 dans de l'eau) sont additionnés dans les tubes. Entre 30 min et 2 h plus tard, l'A<sub>546nm</sub> de l'échantillon est lue par spectrophotométrie. On déduit la concentration en protéines (en µg.µL<sup>-1</sup>) de l'échantillon en fonction d'une gamme étalon effectuée au laboratoire sur de la SAB.

#### **2.3.8.2. Pureté des corps lipidiques**

La contamination croisée éventuelle des corps lipidiques par des peroxysomes est vérifiée par western-blot à l'aide d'anticorps anti-acyl-coA-oxydase 3 (Aox3p) (fournis par J.-M. Nicaud,

laboratoire de microbiologie et génétique moléculaire des microorganismes, CNRS / INRA / INA P-G, Grignon).

Le bilan des études réalisées sur les corps lipidiques de la levure *Y. lipolytica* est représenté sur le diagramme suivant (Figure 22).

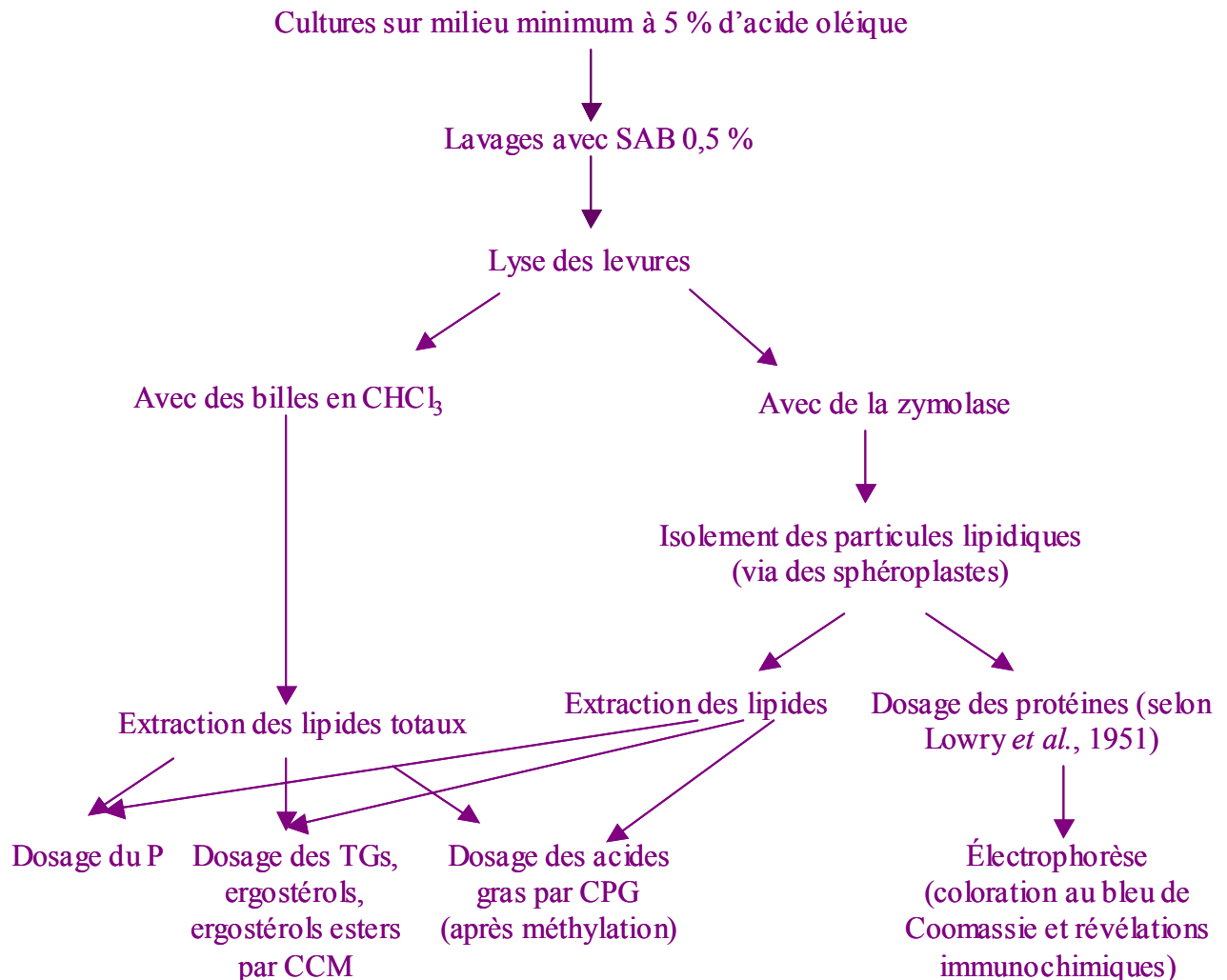


Figure 22 : Diagramme d'étude des lipides et des protéines de *Y. lipolytica*.

#### 2.4. Méthodes d'étude de la tension interfaciale

A l'aide d'une balance de Langmuir, on peut mesurer la tension de surface (IFT) s'exerçant sur une couche superficielle. Pour cela, la couche est comprimée par des barrières en Téflon qui se déplacent à sa surface. Un capteur de pression est placé à la surface du film (Figure 23). Il permet de suivre l'IFT, soit en fonction de l'aire comprise entre les barrières, soit en fonction du temps. De plus, la surface du film est observée via un microscope à angle de Brewster (BAM). Le principe du BAM est le suivant : une monocouche a une épaisseur très faible (de l'ordre de 0,5 % de la longueur d'onde de la lumière visible) et est masquée par la

réflexion de la lumière à la surface de l'eau. Mais si la surface de l'eau est éclairée par une lumière polarisée selon l'angle de Brewster, alors il n'y a plus de réflexion à la surface de l'eau. Dans ce cas précis, le fond de l'image observée est complètement noir et il est alors possible de visualiser la monocouche (Nima technology, basics).

La technique de la monocouche est un outil d'étude des propriétés interfaciales des peptides et de leurs interactions avec des lipides membranaires (Maget-Dana, 1999). Ces manipulations ont été réalisées avec M. Axelos (Unité de physico-chimie des macromolécules, INRA, Nantes) sur un appareil NIMA 601 couplé à un microscope à angle de Brewster (BAM). L'aire observée avec le BAM est d'environ 4 x 5 mm.

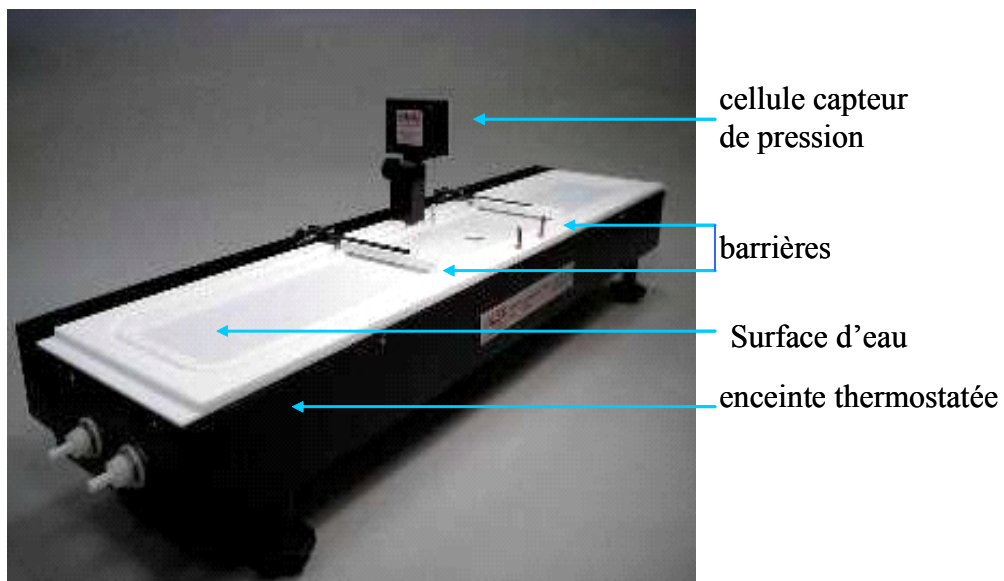


Figure 23 : Balance de Langmuir NIMA 601.

La surface maximale d'ouverture des barrières sur la balance est de  $700 \text{ cm}^2$  et la surface minimale de  $30 \text{ cm}^2$ .

Les oléosomes ont été isolés selon la méthode décrite dans le chapitre 2.2.1 pour *A. thaliana* et selon la méthode du chapitre 2.3.8 pour les levures. Les TGs sont de l'huile de tournesol filtrée sur une colonne de silice puis dilués 1 / 1000 dans du chloroforme. Les oléosomes ou les TGs ont été déposés à l'aide d'une seringue par-dessus un film d'eau milli-Q filtrée à  $0,2 \mu\text{m}$  (pH 5,6) sur la balance de Langmuir. Un temps de repos de 30 min est observé puis l'isocycle de compression / décompression commence. La vitesse de fermeture (ou réouverture) des barrières est de  $50 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  et la surface comprise entre les barrières évolue entre  $694$  et  $30 \text{ cm}^2$ .

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Propriétés interfaciales des lipides

##### 3.1.1. Comportement dans des émulsions

La stabilité d'émulsions constituées d'huile de tournesol commerciale ou de trioléine / trilinoléine et de PLs est présentée sur la Figure 24.

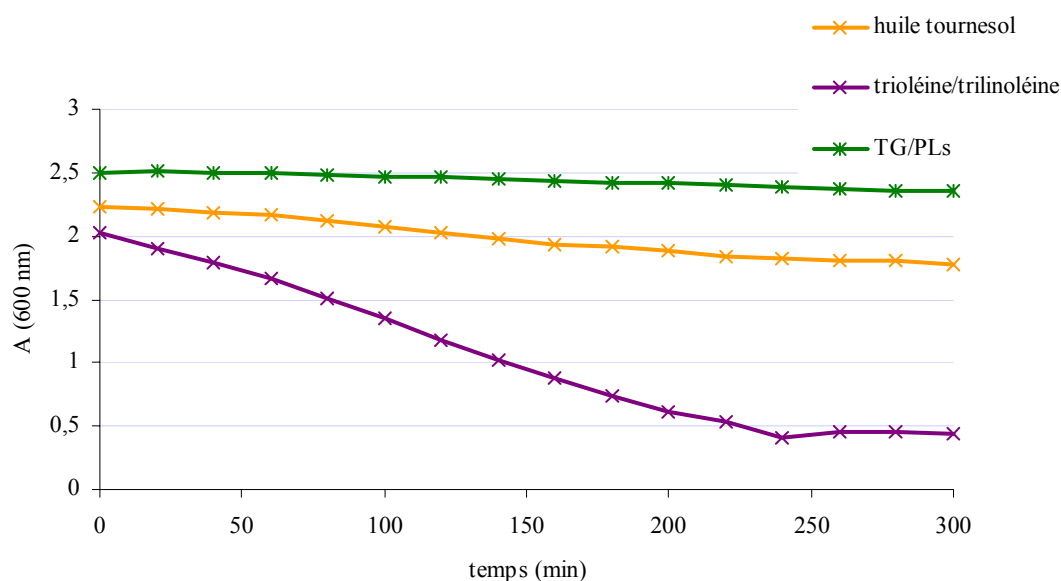


Figure 24 : Stabilité d'émulsion constituées de 3 mg de TG (huile de tournesol ou mélange trioléine / trilinoléine) ou de 3 mg du mélange trioléine / trilinoléine et de 0,01 mg de PL. Suivi par mesure de  $A_{600\text{nm}}$ .

On remarque sur la Figure 24, que l'huile de tournesol telle quelle permet la formation d'émulsions stables au cours du temps. Il existe certainement des PLs endogènes dans cette huile de cuisine bien que très raffinée. Les photographies des émulsions obtenues par microscopie sont les suivantes (Figure 25).

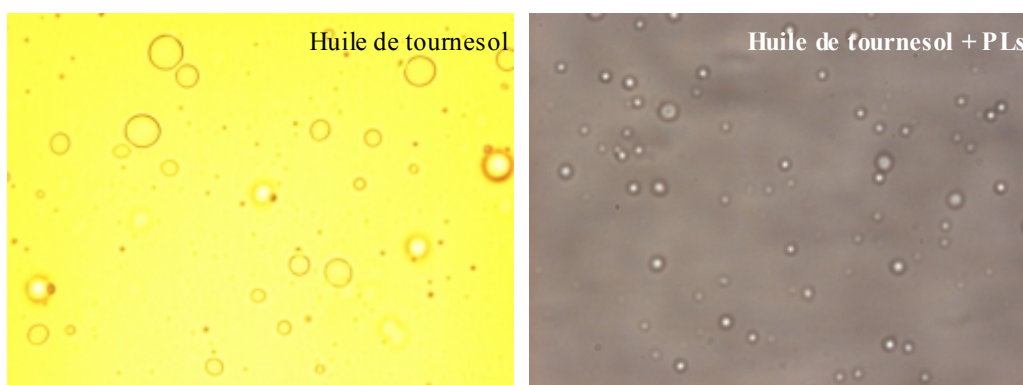
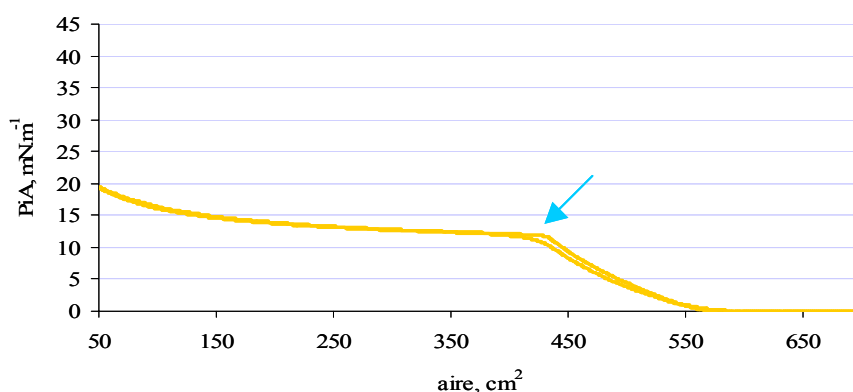


Figure 25 : Microscopie (x100) sur des émulsions huile de tournesol / PLs, 20 min après sonication.

L'échelle de la Figure 25 a été déterminée de deux façons : soit en tenant compte de la taille du champ du microscope (1392 x 1040 pixels, avec 1 pixel = 4,65 x 4,65  $\mu\text{m}$ ) qui correspond à une photographie entière, soit en photographiant au même grossissement que l'échantillon (\* 100) une cellule de Malassez dont la surface d'un carré est connue (1 / 400  $\text{mm}^2$ ). On en déduit que les globules présents dans l'émulsion non stabilisée par des PLs ont des tailles variables de 0,9 à 4,5  $\mu\text{m}$ , alors que ceux des émulsions TGs / PLs / eau ont des tailles plus conservées de 0,9 à 2  $\mu\text{m}$ . Ces tailles correspondent à celles d'oléosomes végétaux. Après 20 min, les émulsions constituées à partir d'huile de tournesol raffinée sont moins fines qu'une émulsion TGs / PLs / eau (vu par microscopie), il y a certainement eu coalescence des globules. Cette huile a été utilisée telle quelle pour les mesures de tension de surface de gouttes où d'importants volumes d'huile étaient nécessaires. En revanche, pour affiner les résultats, elle a été utilisée après purification sur une colonne de silice, permettant une rétention des PLs, pour les mesures sur la balance de Langmuir.

### 3.1.2. Comportement sur une surface plane comprimée

De l'huile de tournesol purifiée a été déposée sur la balance de Langmuir remplie d'eau. L'isotherme obtenu (Figure 26) présente un épaulement visible pour une pression de surface de 12  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  traduisant une re-organisation de la surface. Par ailleurs, cette monocouche comprimée de TGs seuls a une surface entièrement grisée au BAM traduisant une répartition homogène des TGs à la surface. Mais cette homogénéité n'existe plus si les TGs sont déposés sur une monocouche de PLs (non montré ici) et non sur de l'eau pure.



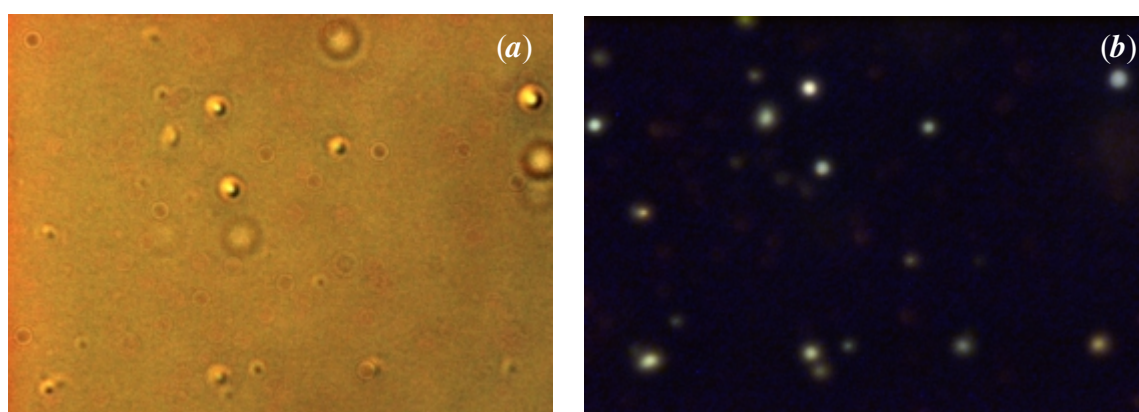
**Figure 26 : Isotherme de compression d'une couche d'huile de tournesol sur la balance de Langmuir. Dépôt de 75  $\mu\text{L}$  d'huile diluée 1/1000 dans du chloroforme. Compression à  $50 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ . Les deux courbes correspondent à la fermeture puis à la réouverture des barrières.**

## 3.2. Comparaison des globules lipidiques de plante et de levure

### 3.2.1. Oléosomes natifs d'*A. thaliana*

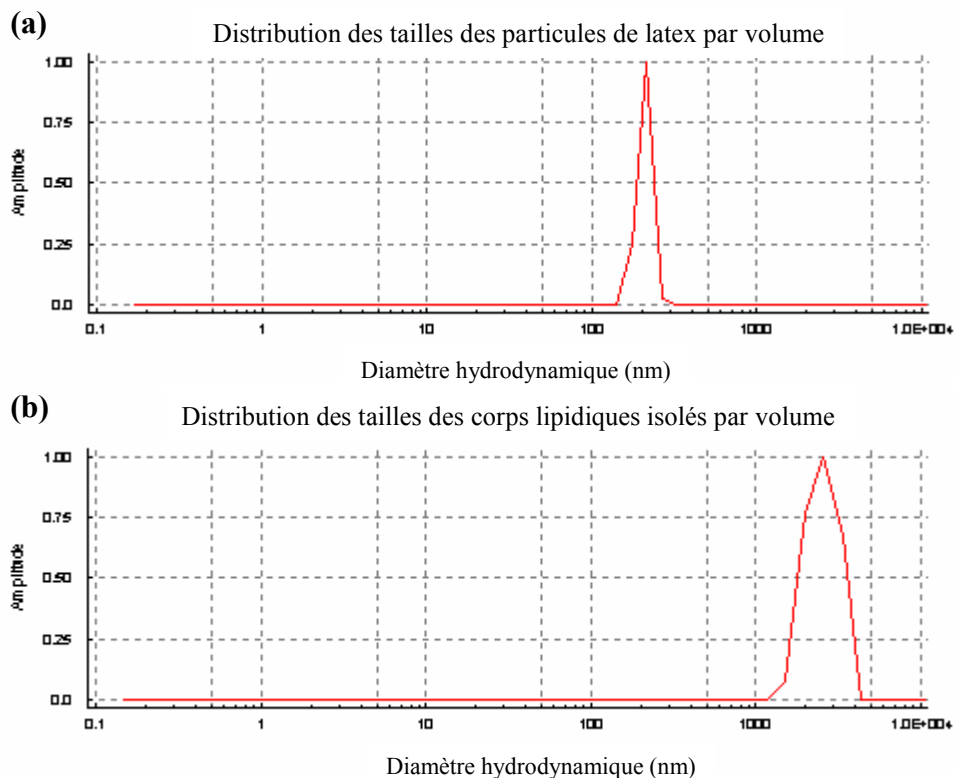
#### 3.2.1.1. Analyse de la taille et des protéines spécifiques des oléosomes

Les corps lipidiques isolés d'*A. thaliana* sont visibles sur la Figure 27. Par microscopie, les tailles des globules semblent homogènes et sont évaluées à  $2,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$  de diamètre.



**Figure 27 : Photographies de microscopie optique avec (b) ou sans (a) fluorescence au rouge Nil sur des corps lipidiques isolés de graine d'*A. thaliana* (même vue).**

Cette valeur est confirmée par une mesure à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  par diffusion de la lumière (diamètre hydrodynamique  $2,6 \mu\text{m}$ ), vue sur la Figure 28.

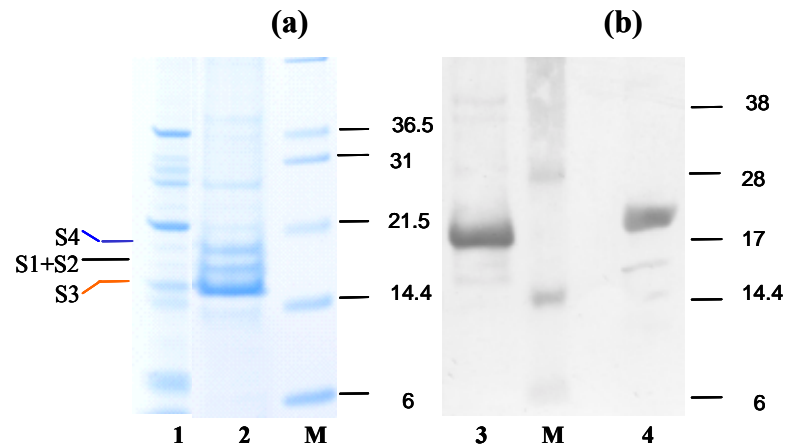


**Figure 28 : Diffusion de la lumière d'oléosomes isolés de graine d'*A. thaliana*.**

Ces valeurs de diamètre sont relativement grandes pour des oléosomes végétaux mais restent dans la gamme de valeurs de Tzen *et al.* (1993).

La Figure 29 présente le gel d'électrophorèse en SDS de la graine entière et des oléosomes purifiés ((a), pistes 1 et 2 respectivement). La comparaison de ces profils montre la disparition de protéines de masses moléculaires apparentes comprises entre 22 et 36,5 kDa avec la purification des oléosomes et l'enrichissement relatif en protéines de masses moléculaires apparentes inférieures à 21,5 kDa. En effet, le corps lipidique possède des protéines spécifiques concentrées à sa surface. Trois bandes protéiques majoritaires sont ainsi observées dans les oléosomes purifiés. Parmi ces protéines, nous avons reconnu l'oléosine S4 (piste 3, western blot (b)) à l'aide d'anticorps dirigés contre une oléosine S4 recombinante exprimée au laboratoire (chapitre 4.3). La différence de taille observée entre l'oléosine native (piste 3) et l'oléosine recombinante (piste 4) provient, sans doute, des huit acides aminés supplémentaires ajoutés à l'oléosine recombinante. Par spectrométrie de masse sur les bandes protéiques, digérées à la trypsine, les protéines du corps lipidique ont été identifiées (Pascale Jolivet, UMR Chimie Biologique, INRA, Grignon). Le constat est le suivant : les oléosines S1, S2, S3 et S4 ont été trouvées. L'isoforme S5 dont l'existence est prédite par l'analyse des gènes n'a pas été mise en évidence. Par évaluation de l'intensité de la coloration au bleu de Coomassie

des bandes d'électrophorèse, S3 constitue la protéine majoritaire du corps lipidique (proche de 50 %), S1+S2 représentent environ 20 % et S4 20 %. Enfin, les corps lipidiques contiennent 1 µg de protéines pour environ 20 µg de TGs. Ce rapport protéines / TGs est proche de celui trouvé par Tzen *et al.* (1993) chez d'autres crucifères, en moyenne 1 µg de protéines pour 28 µg de TGs (Tableau 2, chapitre 1.3.4.2).

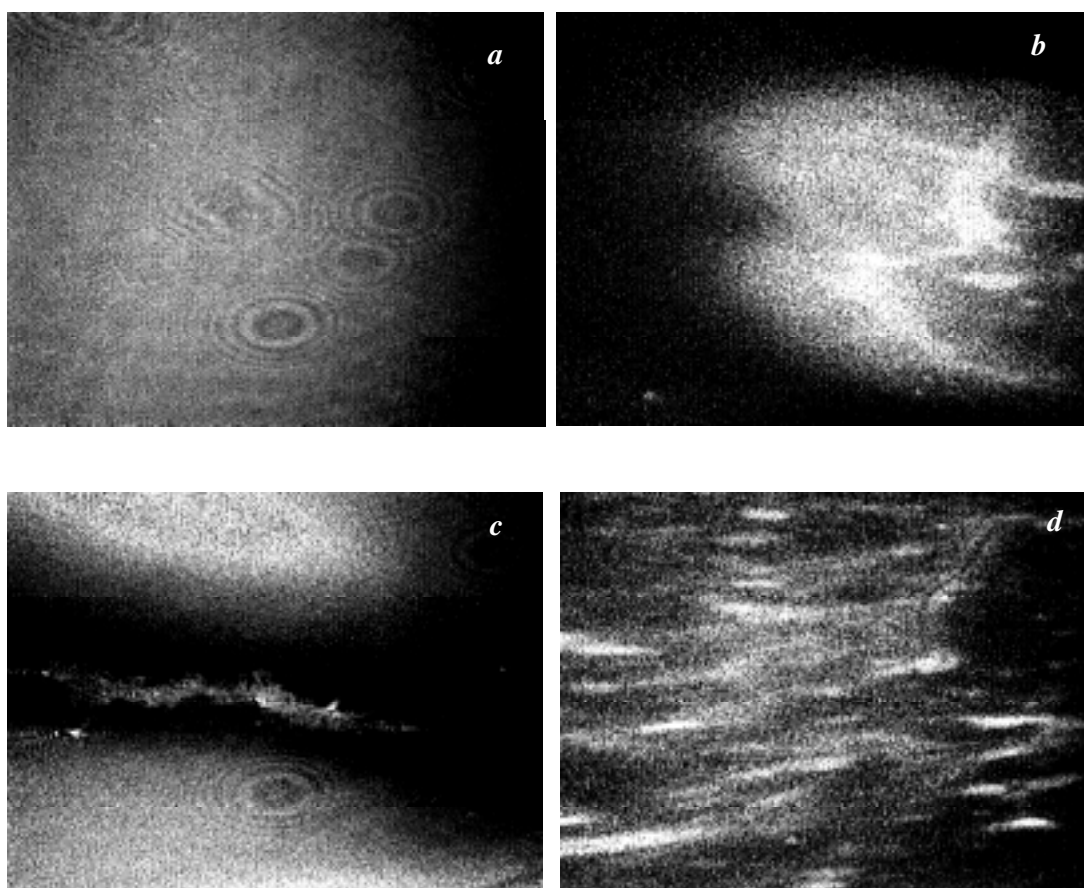
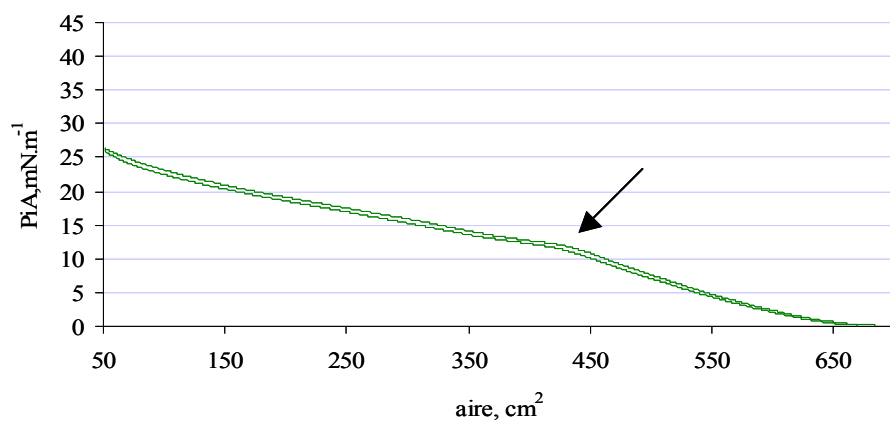


**Figure 29:** Électrophorèse en conditions dénaturantes sur 20 µg de protéines d'extraits totaux de graine d'*A. thaliana* (a, piste 1), d'oléosines recombinantes purifiées rS4 (b, piste 4) et de corps lipidiques isolés (a, piste 2 et b, piste 3). M = marqueur de masse moléculaire. Coloration au bleu de Coomassie (a) et Western Blot (b).

### 3.2.1.2. Comportement des oléosomes en film

La Figure 30 donne un isotherme de pression en présence de  $x$  µg d'oléosomes et la Figure 31 en présence de  $2x$  µg d'oléosomes.  $x$  représente ici 12,15 µg de protéines (dosage effectué selon la méthode de Lowry *et al.*, 1951). Un épaulement de la courbe (Figure 30) est observé à  $12 \text{ mN.m}^{-1}$ . Les photographies prises au BAM sont difficiles à interpréter et reflètent surtout un changement d'organisation. Ainsi, une répartition homogène (signée par un fond noir) des oléosomes sur la surface est observée pour des pressions faibles (jusqu'à  $16 \text{ mN.m}^{-1}$  au moins) puis on voit un regroupement des oléosomes par îlots à la surface de l'eau lorsque la pression dépasse  $19 \text{ mN.m}^{-1}$  (Figure 30 b, c et d).

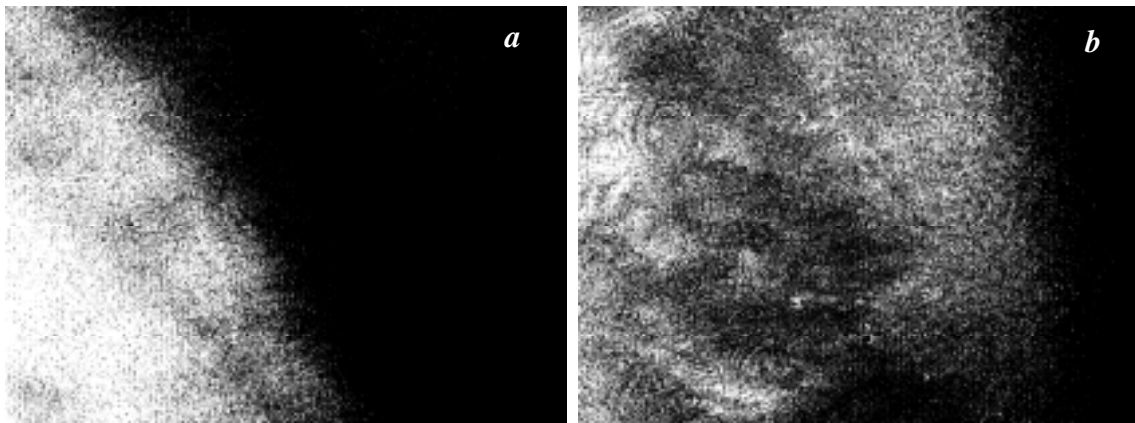
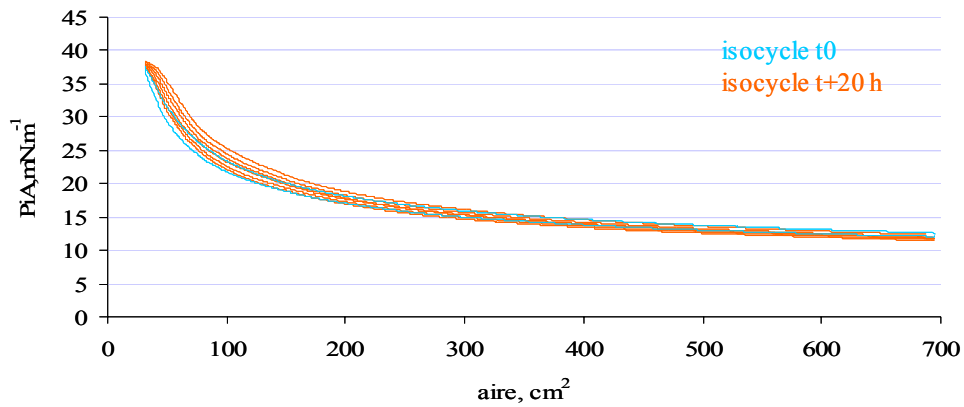




**Figure 30 : Balance de Langmuir. Dépôt de  $x$   $\mu\text{g}$  d'oléosomes natifs d'*A. thaliana* (correspondant à 12,15  $\mu\text{g}$  de protéines) sur un film d'eau de 700  $\text{cm}^2$ . Isocycle à 50  $\text{cm}^2.\text{min}^{-1}$ . Les photographies ont été prises au BAM à 16,5  $\text{mN}.\text{m}^{-1}$  (a), 19,4  $\text{mN}.\text{m}^{-1}$  (b), 20,3  $\text{mN}.\text{m}^{-1}$  (c) et 21,5  $\text{mN}.\text{m}^{-1}$  (d) lors de la compression.**

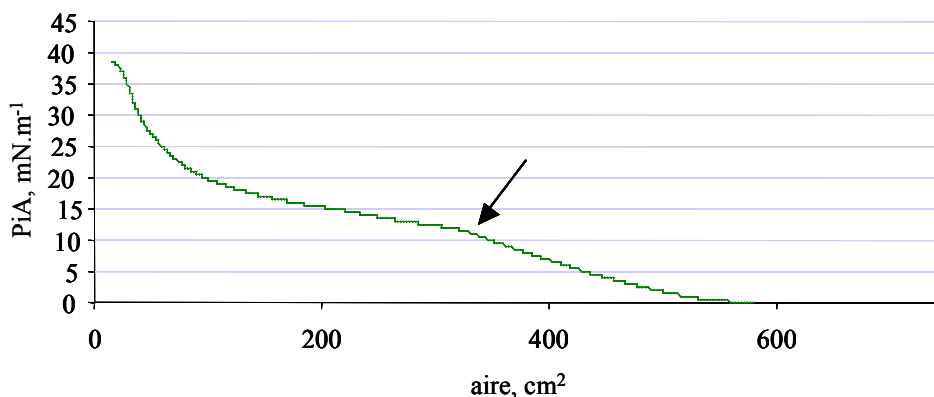
Afin d'avoir accès à l'isotherme des oléosomes entier - de 0  $\text{mN}.\text{m}^{-1}$  au collapse - nous avons refait un nouvel isotherme avec deux fois plus d'oléosines (le collapse se traduit par un plateau sur l'isotherme de pression, c'est le moment où des molécules commencent à disparaître sous la couche de surface par manque de place à l'interface). Sur cette couche,

nous avons aussi fait des isocycles successifs (et après une nuit), pour étudier les propriétés mécaniques (résistance à la compression) des oléosomes. Nous avons, à chaque fois, stoppé la compression juste avant le début du collapse pour éviter de perdre du matériel. Il en résulte que les isothermes sont tout à fait superposables au cours du temps (Figure 31).



**Figure 31 : Balance de Langmuir. Dépôt de  $2 \times \mu\text{g}$  d'oléosomes natifs d'*A. thaliana* (soit  $24,3 \mu\text{g}$  de protéines) sur un film d'eau de  $700 \text{ cm}^2$ . Isocycle à  $50 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ . Après une nuit de repos, 3 nouveaux isocycles sont réalisés sur le même film. Les photographies ont été prises au BAM lors du premier isocycle à  $14,2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  (a) et à  $16,0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  (b).**

Enfin, les isothermes des Figure 30 et Figure 31 ont été raccordés en divisant par deux les aires (en  $\text{cm}^2$ ) de l'isotherme fait avec  $57 \mu\text{L}$  d'oléosines. L'isotherme finalement obtenu est représenté sur la Figure 32.



**Figure 32 : Superposition des isothermes effectués sur des oléosomes natifs d'*A. thaliana* en réajustant l'aire de la balance de Langmuir sur l'expérience à 24,3  $\mu\text{g}$  de protéine (équivalence à un dépôt de 12,15  $\mu\text{g}$  de protéine).**

Ainsi, les oléosomes natifs (Figure 32) présentent bien la signature des TGs avec l'épaule caractéristique (Figure 26). Les oléosomes nous paraissent de plus résistants à des cycles de compression / décompression, sans coalescer (Figure 31). Ceci est en accord avec la résistance des corps lipidiques au cours de la réhydratation des graines lors de la germination. Néanmoins, d'après la littérature, les oléosomes seraient agrégés au pH 5,6 utilisé. Ainsi, nos expériences seraient équivalentes à celles avec les trois composantes TGs, PLs et oléosines non émulsionnées, simplement déposées en couches successives sur la balance. Il est difficile de trancher expérimentalement : le BAM ne permet malheureusement pas de voir des objets inférieurs à 10  $\mu\text{m}$ . On ne peut donc pas visualiser si les oléosomes sont bien individualisés ou uniquement présents sous la forme d'agrégats.

Des isothermes et des photographies semblables ont été obtenus sur des LDL du jaune d'œuf (S. Dauphas, Laboratoire d'Étude des Interactions des Molécules Alimentaires, INRA, Nantes), ainsi que sur des corps lipidiques de *Y. lipolytica* (chapitre 3.2.2.3). Un isotherme modèle est présenté sur la Figure 86 (chapitre 5.6.2.2).

### 3.2.2. Corps lipidiques de *Y. lipolytica*

#### 3.2.2.1. Isolement des corps lipidiques

Après 20 h de culture sur un milieu minimum enrichi en acide oléique (Figure 33), la souche sauvage (W29) de *Y. lipolytica* présente des globules lipidiques hypertrophiés (Figure 34).

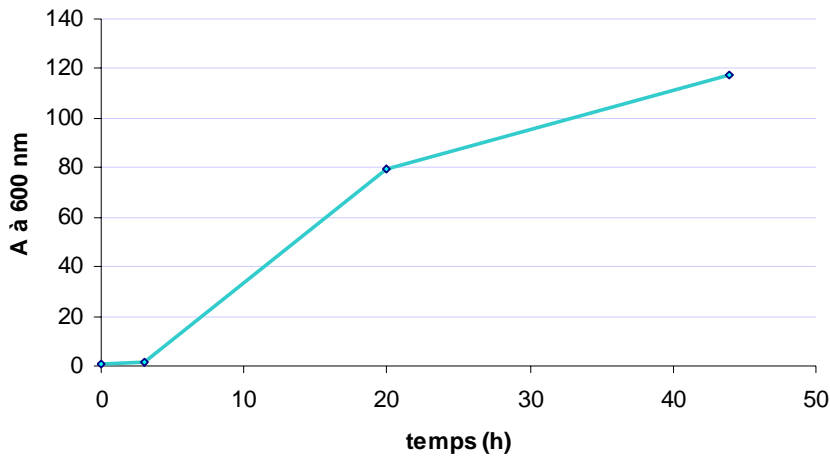


Figure 33 : Courbe de croissance de la souche W29 sur milieu minimum enrichi à 5 % d'acide oléique.

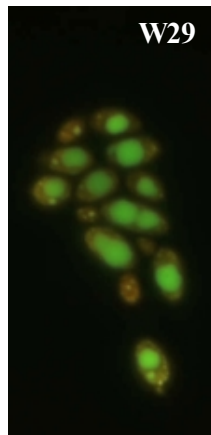
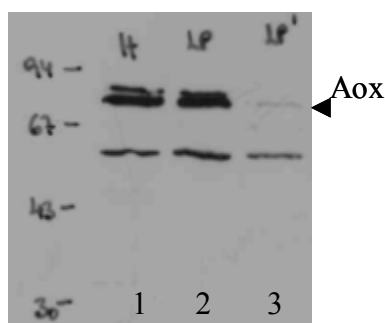


Figure 34 : Photographie de levures après 20 h de croissance sur milieu minimum enrichi avec 5 % d'acide oléique (microscopie, fluorescence au rouge Nil).

Du fait de cette grande richesse en lipides intracellulaires, le protocole de purification des particules lipidiques mis au point par Leber *et al.* (1994) chez *S. cerevisiae* n'était pas adapté à *Y. lipolytica*. Les globules lipidiques n'étaient pas correctement séparés des déchets cellulaires lors des étapes de flottation. Pour améliorer cette séparation, le protocole de purification a été modifié en diminuant les concentrations en ficoll et sorbitol utilisés lors des étapes de centrifugation sur gradient. Une étape supplémentaire de gradient a également été ajoutée.

Afin de vérifier la pureté des préparations de corps lipidiques et la non contamination par des peroxysomes, nous avons déposé sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE les particules lipidiques isolées. Après migration et transfert sur membrane, nous avons réalisé un western blot en incubant la membrane avec des anticorps dirigés spécifiquement contre Aox3p (acyl-coA-oxydase, protéine du peroxysome de *Y. lipolytica*). L'anticorps réagit avec les membranes, les corps lipidiques ne sont pas exempts de contamination peroxysomiale lors d'un isolement simple des corps lipidiques (Figure 35, puits 1 et 2).

Depuis, le Dr. Karin Athenstaedt a amélioré la séparation en rajoutant une étape de lavage des corps lipidiques avec une solution de KCl 1 M (Figure 35, puits 1 et 3).



**Figure 35 :** Western blot avec des anticorps anti-Aox (protéine des peroxysomes). 1 = extrait brut de cellules de *Y. lipolytica*, 2 = corps lipidiques isolés, 3 = après lavage des corps lipidiques isolés avec KCl 1 M. Dépôt de 10  $\mu\text{g}$  de protéines dans chaque puit (dosage de Lowry).

### 3.2.2.2. Dosage des lipides

- *Extraits totaux de cellule*

Les phospholipides sont répartis de la manière décrite dans le Tableau 5. Tout comme chez les végétaux, la PC est le PL cellulaire majoritaire.

**Tableau 5 :** Répartition des phospholipides (en %) dans les extraits totaux de *Y. lipolytica*.

%	LP	DMPE	CL	PA	PS	Pi	PE	PC
W29	nd	2,1	7,7	5,9	2,9	11	24,3	46,1

Nous avons obtenu par chromatographie sur couche mince, les résultats présentés dans le Tableau 6 concernant la teneur en lipides neutres des extraits cellulaires totaux.

**Tableau 6 :** Dosage des lipides neutres dans des extraits totaux de *Y. lipolytica* après 20 h de culture. Quantités exprimées en  $\mu\text{g}.\mu\text{g}^{-1}$  de protéines.

	ergostérols	esters d'ergostérols	triglycérides
en $\mu\text{g}.\mu\text{g}^{-1}$ protéines	0,025	0,02	2,625

L'acide oléique est l'acide gras majoritaire dans la cellule (Tableau 7), mais d'autres acides gras sont aussi présents dans les corps lipidiques, en quantités décroissantes lorsque l'on descend en nombre de carbone. La forme d'apport extracellulaire (C18:1) ne représente ainsi que 50 % des acides gras totaux intracellulaires. Les autres acides gras sont issus du métabolisme, avec notamment l'activité C-2 de la  $\beta$ -oxydation peroxysomiale. Le rapport acides gras insaturés / acides gras saturés est de 14,8 et la répartition C14:1 / C16:1 / C18:1 de 22 / 35 / 100 (Tableau 7).

**Tableau 7 : Répartition des acides gras (%) dans les extraits totaux de *Y. lipolytica*.**

	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1
W29	0	11,5	5,0	18,7	1,3	53,2	7,6	0	2,6

- *Particules lipidiques isolées*

L'analyse des PLs du globule gras isolé de *Y. lipolytica* a donné les résultats reportés dans le Tableau 8. A nouveau, la PC est le PL majoritaire, mais la composition globale est très différente de celle trouvée chez *S. cerevisiae* (1.3.3). Nous avons notamment des quantités bien inférieures en PLs chargés négativement : 5 % de Pi + PS chez *Y. lipolytica* contre 37 % chez *S. cerevisiae*.

**Tableau 8 : Répartition des phospholipides dans les particules lipidiques de *Y. lipolytica*.**

%	LP	DMPE	CL	PA	PS	PI	PE	PC
W29	0,45	0,57	6,53	1,93	2,15	2,87	5,89	79,61

La présence de LP vus dans le Tableau 8, qui n'était pas mise en évidence dans les extraits totaux, vient certainement de l'enrichissement en ce PL dans les particules lipidiques, alors qu'il était très minoritaire dans l'extrait total.

D'après le Tableau 9, les TGs sont les lipides neutres majoritaires du globule gras. Ceci est proche des oléosomes végétaux mais très éloigné de la composition des globules lipidiques de *S. cerevisiae*, où les TGs et les stérols sont présents en quantité équivalente. Les levures ont été préalablement cultivées sur un milieu enrichi à 5 % en acide oléique, alors que *S. cerevisiae* dans l'article de Leber *et al.* (1994) était cultivée sur un milieu contenant du glucose. La richesse en TGs des globules lipidiques de *Y. lipolytica* est certainement une conséquence de l'apport très important de TGs par le milieu nutritif et la composition lipidique des globules est représentative des lipides sur lesquels pousse la levure.

**Tableau 9 : Dosage des lipides neutres dans des particules lipidiques isolées après 20 h de culture de *Y. lipolytica*. Quantités exprimées en  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  de protéines.**

	ergostérols	esters d'ergostérols	triglycérides
en $\mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ protéines	0,057	0,05	13,4

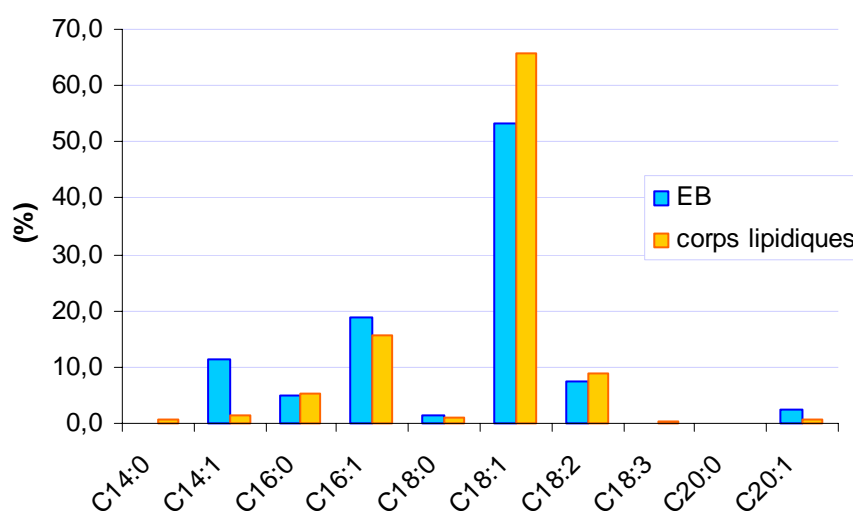
Le Tableau 10 met en évidence l'importance du C18 :1 dans les corps lipidiques de stockage. Cet acide gras est celui contenu dans le substrat. Il y a donc peu de modification lors du stockage des lipides apportés par le milieu de culture. Le rapport acides gras insaturés / acides gras saturés est de 12,8 et la répartition C14:1 / C16:1 / C18:1 est la suivante : 2 / 24 / 100.

**Tableau 10 : Répartition des acides gras dans les corps lipidiques isolés de *Y. lipolytica*.**

	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1
W29	0,6	1,3	5,5	15,8	1,1	65,8	8,7	0,5	0,7

- *Bilan*

Les deux extraits (total et lipidique) sont finalement comparés dans la Figure 36. Nous avons  $2,67 \mu\text{g}$  de lipides neutres  $\cdot \mu\text{g}^{-1}$  de protéines dans les extraits totaux contre  $13,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1}$  dans les corps lipidiques isolés. Les rapports TG / (ergostérols + esters d'ergostérols) sont de 58 pour les extraits cellulaires et 125 pour les corps lipidiques.



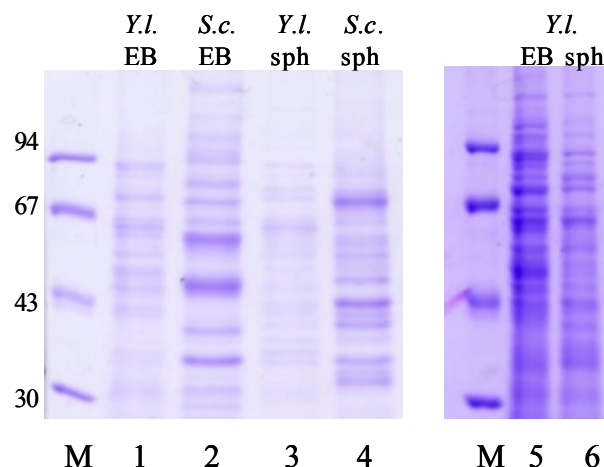
**Figure 36 : Dosage des acides gras dans les extraits totaux (EB) et dans les particules lipidiques isolées de *Y. lipolytica*.**

Aucune étude n'avait été réalisée jusqu'à présent sur le stockage des lipides par des levures cultivées sur un milieu nutritif enrichi en lipides, l'essentiel des recherches sur les globules

lipidiques ayant été réalisées sur *Saccharomyces cerevisiae*, cultivée en milieu glucidique. Nous avons montré que, dans nos conditions de culture, la composition cellulaire globale de *Y. lipolytica* et celle de ses corps lipidiques diffèrent surtout dans l'importance relative du C18:1 par rapport aux autres acides gras. Le corps lipidique est ainsi un lieu de stockage des lipides captés dans le milieu, quasiment sans modification préalable. Au contraire, dans le reste de la cellule, nous avons mis en évidence un métabolisme important des lipides, avec certainement le signe de la  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes.

- *Protéines*

Les échantillons ont été déposés sur gel d'électrophorèse (dépôt de l'équivalent de 10  $\mu$ g de protéines). Le résultat est présenté sur la Figure 37. D'après ces gels d'électrophorèse, la composition en protéines des corps lipidiques est beaucoup plus complexe chez la levure que chez les plantes (Figure 29).



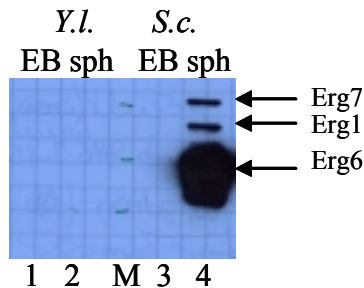
**Figure 37 : Electrophorèse SDS-PAGE sur des extraits cellulaires totaux (puits 1, 2 et 5) et des particules lipidiques isolées (3,4 et 6) de *Y. lipolytica* (1, 3, 5 et 6) et de *S. cerevisiae* (2 et 4) (offerts par K. Athenstaedt). EB = extrait brut, sph = particules lipidiques et M = marqueur de masse moléculaire.**

Athenstaedt). EB = extrait brut, sph = particules lipidiques et M = marqueur de masse moléculaire.

Des western blots ont été réalisés successivement par incubation avec des anticorps dirigés contre des protéines du corps lipidique de *S. cerevisiae* : Erg1 (squalène époxydase), Erg6 (stérol- $\Delta^{24}$ -méthyltransférase) et Erg7 (lanostérol synthétase) (protéines identifiées par Athenstaedt *et al.*, 1999). Les blots obtenus sont montrés sur la Figure 38. Les anticorps réagissent fortement avec des protéines du corps lipidique de *S. cerevisiae*, mais pas avec l'extrait total des cellules. En effet, ces enzymes sont concentrées à la surface des corps lipidiques, alors qu'elles sont minoritaires dans le pool protéique total. En revanche, aucune protéine similaire n'est détectée dans les corps lipidiques de *Y. lipolytica*. Soit la composition en protéines des corps lipidiques des deux levures est très différente, soit les anticorps sont



très spécifiques et ils ne reconnaissent pas les isoformes des protéines exprimées chez *Y. lipolytica*. Les trois enzymes existent chez les deux levures, c'est donc la deuxième hypothèse qui est retenue.

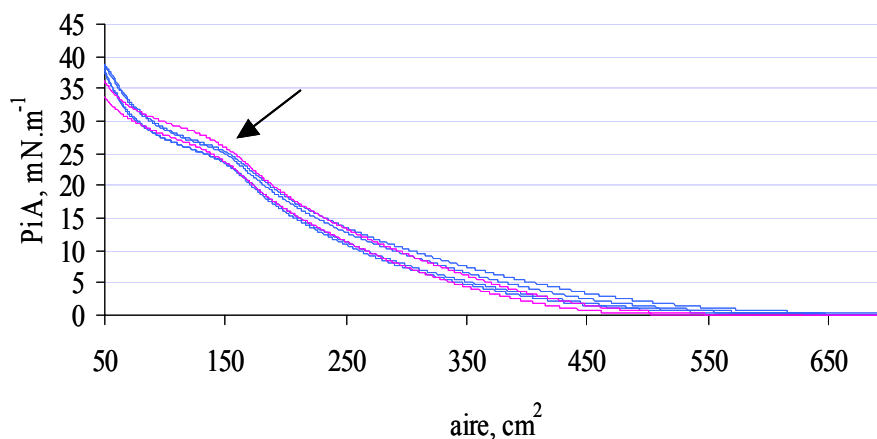


**Figure 38 :** Western blot sur des extraits totaux (EB) et des corps lipidiques (sph) isolés de *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*.

La disponibilité du génome de *Y. lipolytica* a confirmé l'absence d'homologues d'oléosines chez la levure mais a permis de mettre en évidence l'existence de protéines à motifs glycine répétés, motifs présents dans certaines isoformes d'oléosines. Le rôle et la localisation de ces protéines restent à préciser

### 3.2.2.3. Comportement des particules lipidiques en film

Il y a peu de données concernant la résistance mécanique des corps lipidiques. Nous avons donc fait des expériences de compression des globules. Pour cela, les corps lipidiques isolés de W29 ont été déposés sur une balance de Langmuir, par-dessus un film d'eau. Nous avons obtenu l'isotherme de la Figure 39. Un épaulement est visible à  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .



**Figure 39 :** Dépôt sur la balance de Langmuir de  $100 \mu\text{L}$  de corps lipidiques isolés à partir d'une culture (24 h sur milieu minimum enrichi à 5 % d'acide oléique). En rose, premier isocycle, en bleu isocycles après 24 h de repos du film.

Tout comme pour les oléosomes, l'isotherme a globalement la même allure que celui de l'huile de tournesol filtrée seule. En revanche, l'épaule est ici à  $25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  et non à  $12 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  comme nous l'avons vu précédemment. Les différences de composition lipidique des globules gras de levure et de plante peuvent expliquer cette variation importante. Par ailleurs, des cycles répétés au cours du temps présentent à nouveau des isothermes superposables. Ces corps lipidiques ne subissent pas de contraintes aussi fortes *in vivo* que les oléosomes (dessiccation / réhydratation des graines lors de la germination). De plus, les images d'oléosomes natifs prises avec le BAM ne sont pas homogènes, tout comme celles de PLs et TGs non émulsionnés (simplement disposés successivement sur la balance). On ne peut donc pas conclure à partir de ces manipulations sur de l'eau que les oléosomes d'*A. thaliana* sont résistants à la compression. Le meilleur moyen, que nous ayons actuellement, de vérifier la stabilité de la résistance des oléosomes végétaux au cours du temps est la mesure de taille des globules par diffusion de la lumière ou microscopie optique. A ce jour, aucune protéine stabilisatrice des globules lipidiques homologue des oléosines n'a été observée chez la levure. Nous avons donc d'une part modifié génétiquement une levure pour qu'elle exprime une oléosine et d'autre part étudié les propriétés de surface aux interfaces d'oléosines végétales purifiées.

**Deuxième partie :**  
**Les oléosines**

## 4. Matériel et méthodes

---

Tous les réactifs sont de qualité analytique.

### 4.1. Analyse des séquences d'oléosines

Les séquences ont été analysées par le logiciel Bioedit sequence alignment editor (1997-2001, Tom Hall department of microbiology, North Carolina State University, USA) ou par le logiciel Protparam tool, disponible sur le site : <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>.

L'hydrophobie des protéines a été déterminée par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) disponible dans le logiciel Bioedit. Pour cela, il existe une échelle « d'hydropathie », définie à partir des propriétés hydrophile / hydrophobe de chacun des vingt acides aminés. Le programme analyse la séquence protéique en se déplaçant par segments de tailles prédéfinies en acides aminés et détermine ainsi l'hydropathie moyenne par segment.

### 4.2. Clonage des oléosines

#### 4.2.1. Multiplication de l'ADN

##### 4.2.1.1. Obtention de l'ADN codant les oléosines

Les ADNc codant quatre isoformes d'oléosines d'*A. thaliana* nous ont été donnés par V. Guyon et L. Lepiniec (laboratoire de biologie des semences, INRA, Versailles). Ils correspondent à S2, S3, S4 et S5 dans la nomenclature de Kim *et al.* (2002) ou encore aux oléosines de type 4, de type 1, de type 2 et de type 3 dans la première nomenclature du groupe de Huang.

Nous avons choisi de limiter notre étude aux isoformes les plus différentes, les deux premiers types d'oléosines (type 1 ou S3 : 18,5 et type 2 ou S4: 21,2 kDa) fournis sous forme de clones YAP et provenant d'une banque d'ADNc de siliques immatures, ADNc non orientés, insérés dans  $\lambda$ ZAPII (*EcoRI*).

##### 4.2.1.2. Amplification des séquences

L'amplification des fragments d'ADN codant les oléosines est réalisée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) dans un appareil thermocycleur Minicycler-16 (MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA).

Les oligonucléotides à façon ont été commandés auprès de la société MWG-Biotech AG et ont été obtenus sous forme lyophilisée. Ils sont re-dissous dans de l'eau milli-Q (Millipore) stérile à 100 pmol.µL<sup>-1</sup> puis conservés à -20 °C. Ils codent les extrémités N- et C- terminales des oléosines et comprennent des sites de restriction additionnels aux fins de clonage orienté. Les séquences d'oligonucléotides correspondantes sont celles indiquées dans le Tableau 11 pour les séquences destinées à être exprimées par *Y. lipolytica* et dans le Tableau 12 pour *E. coli*. Les sites de restriction sont soulignés.

**Tableau 11 : Amorces utilisées pour l'expression intracellulaire de S4 par *Y. lipolytica* (clone Y4).**

N-terminale	OleoAT2ic1-1	5' <u>ac'c tag gcc atg gcg gat aca cac cgt</u> 3' <i>BlnI</i> M A D T H R
C-terminale	OleoAT2s1-2	3' <u>ccc tgc tgc cga cgt act ccg ggg cgc ccg g</u> 5' 5' <u>ggg acg acg gct gca</u> tga <u>ggc ccc gc'g ggc c</u> 3' G T T A A <i>SfiI</i>

**Tableau 12 : Amorces utilisées pour l'expression intracellulaire de S3 et S4 par *E. coli*.**

- des oléosines S3 :

N-terminale	OleoAT1ec1-1	5' g gaa ttc <u>ca't atg gcg gat aca gct aga gga</u> 3' <i>NdeI</i> M A D T A R G
C-terminale	OleoAT1ec1-2	3' <u>cca ccg gtc gtg tga tga gag ctc gcc</u> 5' 5' <u>ggt ggc cag cac act act c'tc gag</u> cgg3' G G Q H T T <i>XhoI</i>

- des oléosines S4 :

N-terminale	OleoAT2ec1-1	5' g gaa ttc <u>ca't atg gcg gat aca cac cgt</u> 3' <i>NdeI</i> M A D T H R
C-terminale	OleoAT2ec1-2	3' <u>ccc ccc tgc tgc cga cgt gag ctc gcc</u> 5' 5' <u>ggg ggg acg acg gct gca c'tc gag</u> cgg3' G G T T A A <i>XhoI</i>

Les milieux des PCR contiennent des éléments communs à tous les clonages :

- 1 bille Ready To Go PCR (de la société Amershan Pharmacia Biotech, de concentration 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de

MgCl<sub>2</sub>, 200μM de chaque déoxynucléotide tri-phosphate (dNTP) et 1,5 U de Taq-polymerase)

- 24 μL d'eau milli-Q
- 0,1 μL de Tfu DNA d'Appligène
- 50 μL d'huile minérale (l'ajout d'huile permet de limiter l'évaporation lors de la PCR)

auxquels sont à ajouter, selon les spécificités de chaque clonage (détaillées dans le Tableau 13) :

- 0,1 μL de la matrice nucléotidique
- 0,2 μL de l'amorce N-terminale à 100 pmol.μL<sup>-1</sup>
- 0,2 μL de l'amorce C-terminale à 100 pmol.μL<sup>-1</sup>

**Tableau 13 : Amorces et matrices utilisées pour les PCR de S3 et S4.**

	<b>Y4</b>	<b>rS3</b>	<b>rS4</b>
matrice	YAP 109	YAP 230	YAP 109
amorce Nt	OléoAT 2ic1-1	OléoAT 1ec1-1	OléoAT 2ec1-1
amorce Ct	OléoAT 2s1-2	OléoAT 1ec1-2	OléoAT 2ec1-2

Les PCR sont alors réalisées selon l'un des deux programmes indiqués dans le Tableau 14, en fonction de l'isoforme concernée. Seule la température d'hybridation (T<sub>m</sub>), liée à la séquence d'ADN varie. La T<sub>m</sub> optimale a été déterminée expérimentalement, à partir de la T<sub>m</sub> donnée par le fabricant d'oligonucléotides, en diminuant ensuite celle-ci par paliers de 4 °C.

**Tableau 14 : Programmes de PCR.**

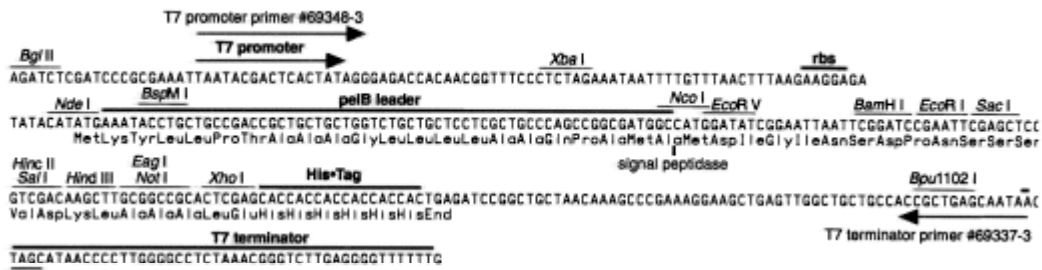
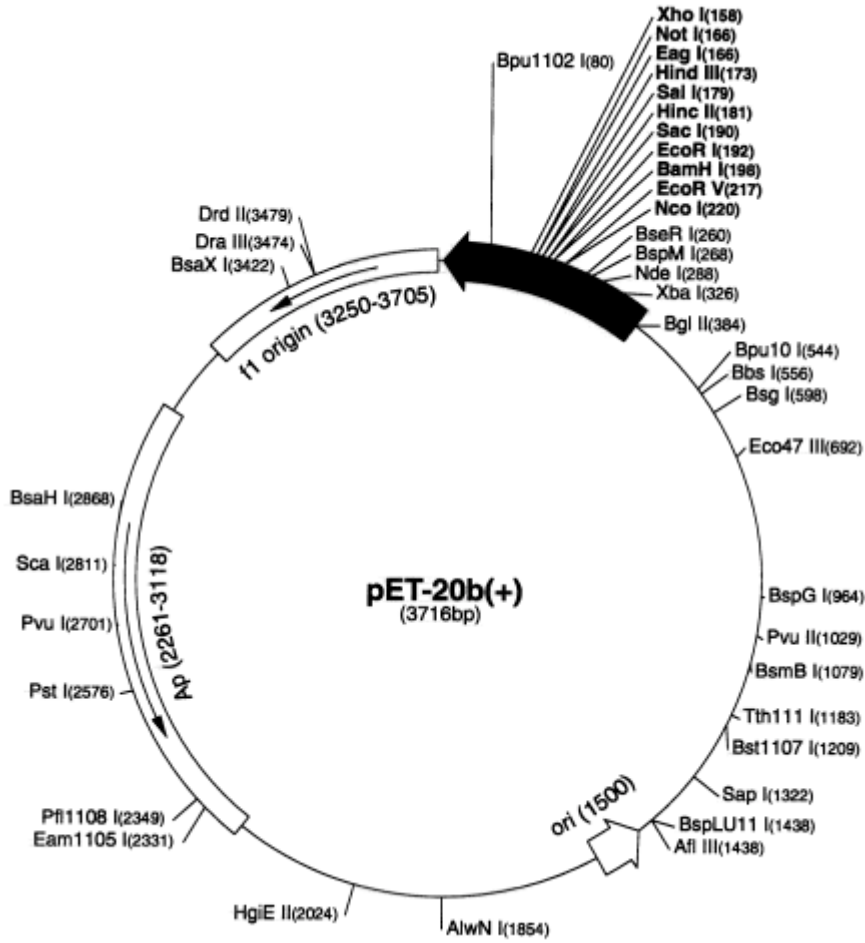
étape	oléosine rS3		oléosine rS4	
	température (°C)	temps (s)	température (°C)	temps (s)
1- dénaturation	94	240	94	240
2- dénaturation	94	60	94	60
3- hybridation	60	30	52	30
4- élongation	72	40	72	40
5- 25 fois à 2-				
6- élongation	72	240	72	240
7- standby	4	0	4	0

La polymérisation de l'ADN codant des oléosines est ensuite vérifiée par électrophorèse des produits de la réaction en gel d'agarose (Appligène, qualité biologie moléculaire) 0,8 % (p / v), 0,004 % de bromure d'éthidium (BET) (v / v), 0,5 % de TAE (v / v) (solution stock de TAE : 40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA, pH 8). Les échantillons sont préparés comme suit : 2 µL de produit de PCR + 1 µL de « PCR loading buffer 6x » de la société Sigma, complétés à 6 µL avec de l'eau milli-Q. 4 µL de « PCR marker » de la société Sigma sont aussi déposés sur le gel. La migration se fait en tampon TAE 0,5 % à 80 V (l'intensité doit alors être inférieure à 25 mA) pendant environ 45 min. A la fin de la migration, le gel est observé sous un transilluminateur peu énergétique à 365 nm, ce qui provoque la fluorescence du BET, agent intercalant de l'ADN. Le gel est alors photographié.

#### **4.2.2. Insertion du gène dans des vecteurs de sous-clonage**

Les sous-clonages ont été réalisés dans des plasmides pET20 b (+) (Figure 40) de la société Novagen en vue de l'expression des protéines par *E. coli*. L'utilisation de ce plasmide permet l'ajout de 8 acides aminés, dont une queue de six histidine, à l'extrémité C-terminale des séquences codantes.

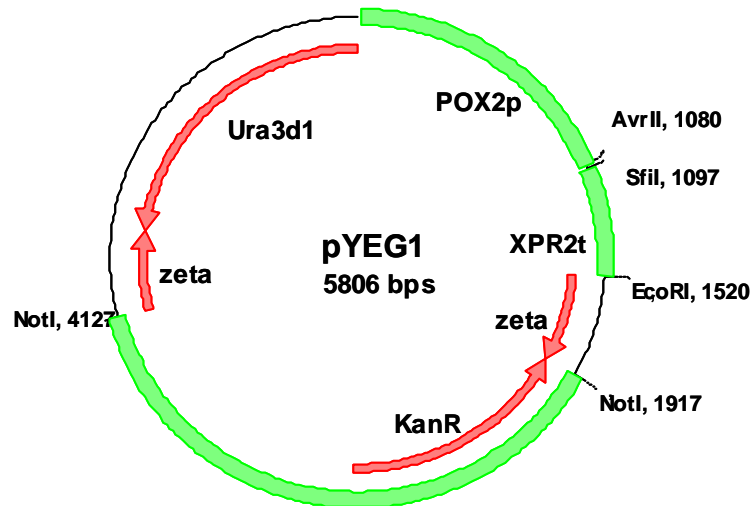
Pour les clonages dans *Y. lipolytica*, le sous-clonage a été réalisé directement dans le vecteur d'expression pYEG1 (1,22 µg.µL<sup>-1</sup>) (Figure 41), fourni par J.-M. Nicaud. Ce vecteur permet une intégration stable dans le génome de la levure.



Le vecteur pET-20b(+) contient le promoteur de T7, le départ de la transcription de T7, des sites multiples de clonage (NcoI-XhoI), le terminateur de T7, l'origine de pBR322, la séquence codant la  $\beta$ -lactamase, l'origine f1, la séquence signal N-terminale pelB pour des localisations périplasmiques potentielles ainsi que la séquence His-tag.

Figure 40 : Plasmide pET20b.





Ce vecteur navette permet l'intégration stable dans le génome de *Y. lipolytica* grâce aux éléments zéta (transposons). L'intégration se fait sans ajout de séquences bactériennes par l'insertion uniquement de la partie coupée par *NotI*. Les souches de levures Ura<sup>-</sup> sont complétées. La séquence XRP2 est un terminateur de transcription. Ce plasmide possède enfin le promoteur fort de l'Aox2, inductible à l'acide oléique.

**Figure 41 : Plasmide d'expression pYEG1.**

#### 4.2.2.1. Digestions de l'ADN

Les inserts et les vecteurs sont d'abord digérés par les enzymes de restriction avant d'être ligaturés. Pour éviter les mauvaises insertions des gènes dans les vecteurs, les digestions ont été effectuées avec deux enzymes différentes aux extrémités 3' et 5' terminales, générant des fragments non cohésifs. Les enzymes de restriction et leurs tampons proviennent de la société Promega, exceptée BlnI (appelée aussi AvrII) qui provient de chez Biolabs.

Les digestions sont réalisées dans le mélange réactionnel suivant :

- 500 ng à 1 µg du fragment de PCR ou du vecteur d'expression
- 3 µL de tampon commercial 10x, choisi pour une activité optimale du mélange des deux enzymes de restriction
- 0,1 µL de chaque enzyme
- H<sub>2</sub>O qsp 30 µL.

Les échantillons sont ensuite mis à incuber au moins deux heures à 37 °C dans un four à hybridation (Amersham). Pour les digestions réalisées par SfiI, qui doivent être conduites à 60 °C, SfiI est tout d'abord introduite dans le milieu et incubée à 60 °C pendant une heure, puis la deuxième enzyme est rajoutée et l'incubation se poursuit au moins deux heures à 37 °C.

La digestion des plasmides peut être vérifiée sur gel d'agarose 0,8 % en comparant des vecteurs digérés ou non et éventuellement, si le taux de digestion est inférieur à 50 %, la digestion à 37 °C est prolongée.

#### **4.2.2.2. Purification de l'ADN**

Une fois les fragments d'ADN digérés, ils sont purifiés, afin d'éliminer la matrice de PCR, les dNTP, les oligonucléotides et les enzymes de restriction, soit après électrophorèse sur gel à l'aide du nébuliseur de gel «Amicon bioseparations, Ultrafree-DA for DNA extraction from agarose» de la société Millipore, soit par purification directe avec le kit «Wizard PCR preps» de la société Promega.

Les fragments sont ainsi utilisables pour un sous-clonage dans un vecteur plasmidique.

#### **4.2.2.3. Ligature**

Le produit de PCR digéré, purifié est inséré par ligature dans le vecteur d'expression, lui-aussi digéré et purifié. Une ligature optimale est observée pour un rapport molaire insert / vecteur = 3, avec une quantité d'environ 50 ng de vecteur. Les vecteurs et inserts sont quantifiés sur gel par rapport à des quantités croissantes connues d'un plasmide commercial pBR322 (Promega, 1 µg.µL<sup>-1</sup>) déposées sur le même gel (100 à 400 ng).

On utilise l'équation suivante pour déterminer la quantité de chacun des composants :

$$\frac{(\text{ng de vecteur}) \cdot (\text{taille de l'insert en kb})}{(\text{taille du vecteur en kb})} \cdot (\text{rapport insert/vecteur}) = \text{ng d'insert}$$

Le mélange de ligature est alors le suivant :

- X ng du vecteur d'expression
- Y ng d'insert
- 10 µL de tampon de ligase 2x (fourni par la société Promega)
- 1 µL de T4 DNA ligase (fournie par la société Promega)
- H<sub>2</sub>O qsp 20 µL

Il est incubé pendant 1 h à 16 °C puis une nuit à 4 °C.

#### **4.2.2.4. Amplification de l'ADN plasmidique**

- *transformation de bactérie*

Des cellules compétentes chimiques *E. coli* JM109 (Promega) (100 µL) en microtube stérile sont décongelées sur de la glace. Après l'ajout de 10 à 100 ng d'ADN plasmidique, les tubes sont encore laissés sur de la glace pendant 30 min. Ils sont alors transférés dans un bain-marie à 42 °C exactement, pendant 1 à 2 min. Ce choc thermique permet l'introduction du plasmide

dans la bactérie via des membranes fragilisées. 900  $\mu\text{L}$  de milieu de Luria Bertani (LB) (1 % bactopeptone (p / v), 0,5 % extrait de levure (p / v), 1 % NaCl (p / v), pH 7) sont ajoutés stérilement et les tubes sont mis à incuber à 150 rpm, à 37 °C pendant 1 à 3 h. 100  $\mu\text{L}$  du mélange de transformation sont alors étalés sur une boîte LB agar (15 % (p / v)), contenant soit de l'ampicilline (Amp) (Amp sodium salt d'Euromedex) ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pour le plasmide pET20b, soit de la kanamycine (Kana) (sous forme de sulfate de Kana de la société USB) ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pour le plasmide pYEG1. Le reste des cellules est centrifugé, le surnageant jeté et le culot re-étalé sur une nouvelle boîte. Les boîtes sont incubées à 37 °C sur la nuit. Les colonies bactériennes sont alors dénombrées, afin de mesurer l'efficacité de la transformation.

- *Criblage des bactéries transformantes*

Une sélection a été réalisée par l'étalement sur un milieu contenant soit de l'ampicilline, car les plasmides pET20b expriment le gène de la  $\beta$ -lactamase qui confère la résistance à l'Amp, soit sur un milieu contenant de la kanamycine pour lequel le plasmide pYEG1 exprime un gène de résistance.

Les colonies qui se sont développées sont ensuite criblées par PCR afin de mettre en évidence la présence ou non de l'insert. Pour cela, nous reproduisons la PCR décrite dans le tableau 4 avec le milieu réactionnel suivant : 1 PCR bead, 24  $\mu\text{L}$  d'eau, 1 pointe de colonie prélevée avec un cône stérile et 0,2  $\mu\text{L}$  des 2 amorces correspondantes (tableau 3). Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose 0,8 %. Les colonies ne permettant pas l'amplification d'un fragment de la taille de l'insert sont rejetées.

Un deuxième criblage est effectué en redigérant les plasmides obtenus par les enzymes de restriction. Les clones négatifs seront ceux qui ne présentent pas après migration sur gel d'agarose une bande de la taille de l'insert.

- *Extraction de plasmide*

A partir des colonies qui se sont développées sur les boîtes, des cultures de 5 mL en milieu LBamp ou LBKana liquides sont mises en route à 250 rpm, 37 °C, sur la nuit, en tubes en verre. Le lendemain, les plasmides sont extraits sur résine selon le protocole du kit « Wizard plus miniprep » de Promega.

Les plasmides sont quantifiés sur gel d'agarose en les comparant à des dépôts de quantités croissantes, connues, du plasmide PBR322.

Afin de s'assurer complètement de la réussite du clonage, 2 à 5  $\mu\text{g}$  de plasmide et les amorces correspondantes sont envoyées pour séquençage à la société MWG Biotech AG.

### **4.3. Expression des oléosines par *E. coli***

#### **4.3.1. Transformation d'*E. coli* en vue de l'expression des oléosines**

Les cellules utilisées sont des bactéries BL21(DE3)pLysS compétentes de la société Promega. Le protocole de transformation des bactéries recombinantes, à partir des plasmides extraits ci-dessus, est le même que pour les cellules JM109. Le criblage consiste cette fois-ci à vérifier l'expression des oléosines par les colonies bactériennes.

#### **4.3.2. Criblage des bactéries**

5 mL de milieu LBamp en tube en verre sontensemencés avec une pointe de bactérie puis mis à 250 rpm, à 37 °C, sur la nuit. Le lendemain, l'expression des oléosines est induite dans la culture par l'ajout d'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Euromedex) 0,1 mM final (une fraction aliquote de 500  $\mu$ L de cultures non induites est conservée), les plasmides employés possédant le promoteur T7 inductible par l'IPTG. La culture est alors poursuivie pendant 3 h. L'absorbance à 600 nm est mesurée juste avant et à la fin de l'induction afin de se reporter à une quantité constante en bactéries pour l'électrophorèse. Ainsi, des volumes équivalents à une  $A_{600\text{ nm}} = 0,1$  sont prélevés dans chaque fraction aliquote et centrifugés 30 s à 12000 x g. Les surnageants sont jetés et les culots sont déposés sur gel d'électrophorèse (voir chapitre 2.2.2.1).

#### **4.3.3. Conservation des souches**

A 2 mL d'une préculture effectuée sur la nuit sont ajoutés 2 mL de glycérol stérile 50 % (p / v). Le mélange est fractionné par volumes aliquotes de 100  $\mu$ L en microtubes stériles afin d'éviter d'abîmer les souches par trop de cycles de congélations / décongélations successives puis mis dans un mélange carboglace - méthanol pour une congélation immédiate. Les souches sont alors conservées à - 80 °C. Les milieux de précultures seront par la suite soitensemencés avec un glaçon de ces souches, soitensemencés par des transformations faites extemporanément (sans étalement sur boîte de Pétri au préalable).

#### **4.3.4. Production d'oléosines recombinantes**

6 mL de milieu LBamp sontensemencés avec une pointe de colonie de BL21pLysS transformante à 250 rpm, 37 °C, sur la nuit en tube en verre. Le lendemain, la préculture, considérée comme saturée, est introduite dans un erlenmeyer à baffles de volume 500 mL contenant 250 mL de milieu LBamp autoclavé. Le suivi de la culture se fait par la mesure de

l' $A_{600nm}$  en microcuve à usage unique et au fur et à mesure de la culture, des fractions aliquotes de 500  $\mu$ L sont prélevées et conservées à 4 °C pour électrophorèse. Lorsqu'une  $A_{600nm}$  de 0,6 est atteinte, l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG 0,1 mM. Au bout de 3 h, les cellules sont récoltées par centrifugation à 5000 x g, 4 °C, 5 min dans une centrifugeuse Beckman J2-21M/E, équipée d'un rotor JA-14. Les culots de culture sont lavés avec 50 mL de NaCl 0,9 % (p / v) puis repris dans 8 mL de Triton X-100 à 0,1 % (p / v) et transvasés dans des tubes Falcon de capacité 50 mL avant d'être congelés à - 20 °C.

#### 4.3.5. Purification d'oléosines recombinantes

##### 4.3.5.1. Lyse

Les cellules sont tout d'abord lysées : un culot d'une culture de 250 mL, soit 8 mL dans du Triton X-100 0,1 %, est décongelé à 37 °C en présence d'un demi-comprimé d'antiprotéases EDTA-free (Roche) puis repris avec 25 mL de solution de lyse B (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 8, ajustement avec NaOH), avec ou sans imidazole selon le protocole (chapitre 4.3.5.3), et mis sous une agitation orbitale de 250 rpm, 30 °C, pendant 40 min. Le lysat, devenu fluide, est ensuite centrifugé à 9000 x g, 4 °C, pendant 20 min. Le surnageant est congelé pendant au moins une nuit à - 20 °C.

##### 4.3.5.2. Fixation et lavages

La purification est basée sur l'affinité des queues poly-histidine pour une colonne contenant du nickel (Ni-NTA agarose de QIAGEN) (Figure 42).

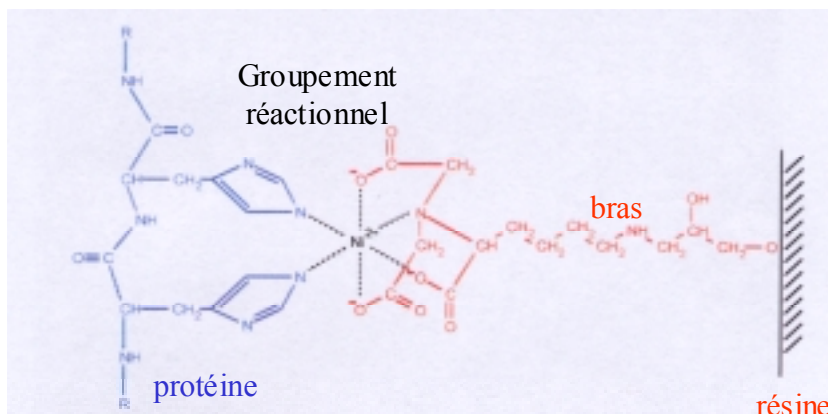


Figure 42 : Interactions entre la queue poly-histidine et la résine Ni-NTA (d'après « the QIAexpressionist » du 08/2002, disponible sur le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Deux protocoles de purification ont été retenus. Le premier consiste en un seul temps de contact résine / lysat et un enrichissement de toutes les solutions utilisées au cours de la

purification (B, D et E) à 10 mM en imidazole. Le deuxième protocole, sans imidazole, consiste à faire trois contacts successifs résine / lysat pour fixer le maximum de protéines.

La décongélation s'effectue rapidement par trempage dans un bécher rempli d'eau tiède. Le pH du lysat est alors contrôlé et éventuellement réajusté à 8. 6 mL de solution Ni-NTA 50 % est équilibrée avec de la solution B. La résine est alors ajoutée à 8 mL du surnageant de lyse ainsi que 1 mL d'éthanol en tube Falcon de 15 mL et le contact est réalisé en tube couché sur balancette (de marque Apelex) à 20 °C pendant 1 h. Au bout de ce temps, le mélange résine-lysate est centrifugé pendant 30 s à 1000 x *g* à l'aide d'une centrifugeuse 5804R de la société Eppendorf et le premier surnageant *n* est mis de côté. Le culot de résine est repris avec 10 mL d'une solution de lavage D (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 5,9), avec ou sans imidazole. Après 10 min de contact sur balancette, le mélange est à nouveau centrifugé brièvement et la solution de lavage éliminée (1 mL est conservé pour effectuer une mesure spectrophotométrique à 280 nm et un dépôt sur électrophorèse). 3 lavages sont ainsi effectués (jusqu'à obtenir une A<sub>280nm</sub> nulle dans le surnageant). Dans le cas de la purification avec fixations successives du lysate sur la résine, le surnageant *n* est à nouveau remis en contact avec la résine lavée pendant 1 h sur balancette. Au bout de ce temps, la résine est à nouveau lavée trois fois, avant d'être une dernière fois incubée une heure avec le surnageant *n+1*. Après une nouvelle série de lavage, on procède à l'élution.

#### **4.3.5.3. Élu**

L'élution des protéines comportant une queue poly-histidine peut être conduite de 2 manières. Soit en milieu natif, avec élution de la protéine par un gradient d'imidazole (l'imidazole va en effet être un compétiteur des noyaux des histidine pour la fixation sur le Ni, Figure 43), soit en présence d'urée, milieu dénaturant (Wetlaufer *et al.*, 1964). Dans ce dernier cas, l'élution de la protéine sera déclenchée par un abaissement du pH provoquant la protonation des noyaux des résidus d'histidine.

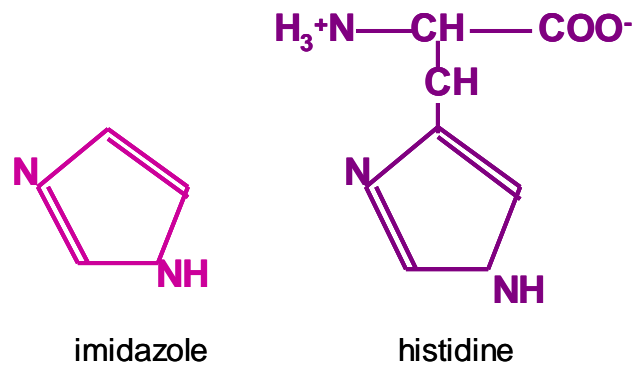


Figure 43 : Structures de l'imidazole et de l'histidine.

L'élution se fait selon le protocole suivant. Au dernier lavage, la résine est déposée dans une colonne en polypropylène (de diamètre 1 cm et de hauteur 5 cm). Les oléosines sont finalement éluées par une solution E (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 4,5, ajustement avec HCl, avec ou sans imidazole 10 mM) en 10 fractions de 0,5 mL. Le bilan des protocoles de purification est représenté sur le diagramme de la Figure 44.

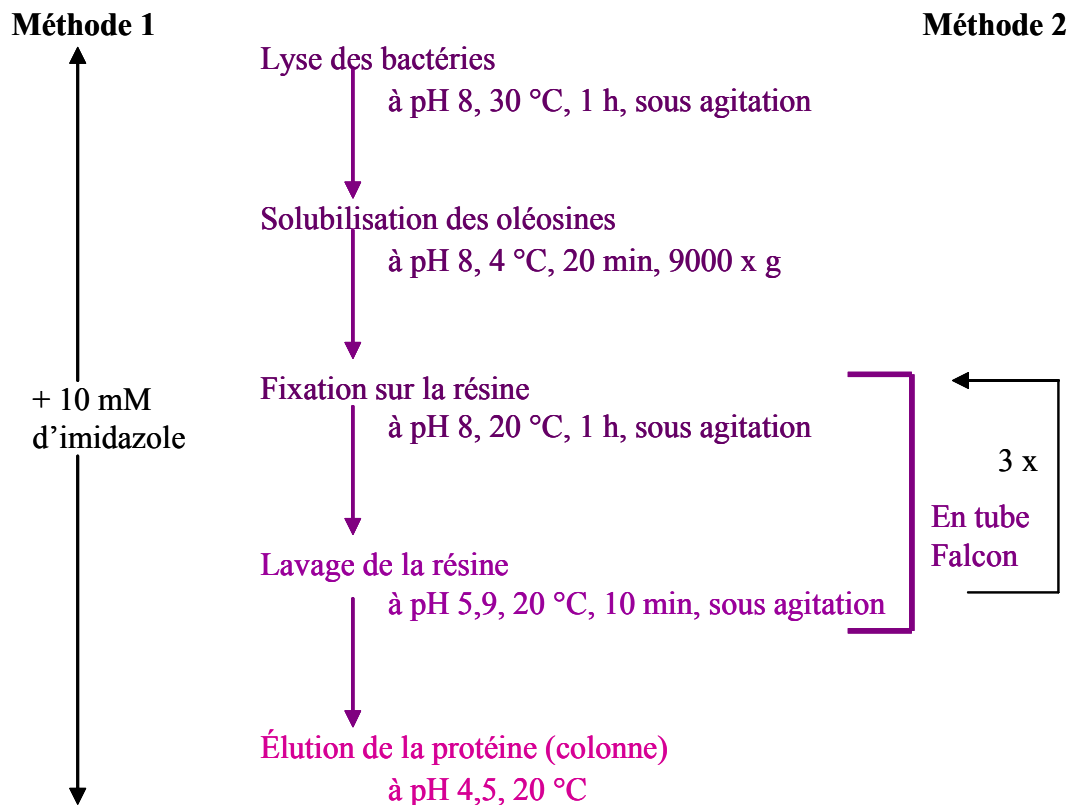


Figure 44 : Diagramme de purification en conditions dénaturantes (urée 8 M) par technologie Ni-NTA.

#### 4.3.6. Méthodes de caractérisation des oléosines

##### 4.3.6.1. Quantitative par spectrophotométrie

Il existe différentes méthodes de dosage des protéines (Delobette *et al.*, 1991). Nous avons choisi d'utiliser la plus simple : une mesure directe de l'absorbance de l'échantillon purifié. Connaissant l'absorbance, une estimation de la quantité d'oléosines récoltée après purification peut être faite par la loi de Beer-Lambert. La mesure de  $A_{280\text{ nm}}$  est réalisée en microcuve en quartz, dans un spectrophotomètre DU 640B de la société Beckman Coulter.

$$A_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \times l \times c$$

où -  $l$  en cm représente la longueur du trajet optique, ici, de 1 cm,

-  $\epsilon$  (coefficient d'extinction molaire en  $\text{L.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) est fonction de la teneur en noyaux aromatiques de la protéine et est calculé à partir de la séquence protéique grâce au logiciel ProtParamTool.

-  $A$  est l'absorbance lue dans la cuve et

-  $c$  la concentration de la protéine dans cet échantillon en  $\text{mol.L}^{-1}$ .

La purification peut aussi être suivie par analyse des échantillons par électrophorèse sur gel Tris-glycine.

##### 4.3.6.2. Qualitative par électrophorèse en milieu dénaturant et immunochimie

Les électrophorèses ont été conduites selon le protocole détaillé dans le chapitre 2.2.2.1. Après coloration au bleu de Coomassie, les colonies bactériennes dans lesquelles une bande est visible vers 20 kDa, plus fortement après l'induction, sont retenues pour l'expression des oléosines.

La détection des oléosines a été faite à l'aide d'anticorps spécifiques : anti-penta-histidine (Penta-His Antibody, SAB free, de la société QIAGEN), anti-oléosine S4 d'*A. thaliana* recombinante et anti-oléosines d'amande (selon le protocole du chapitre 2.2.2.2). Les anticorps anti-penta histidine sont obtenus chez la souris. Ils sont utilisés avec une dilution 1/200000. Les anticorps conjugués dirigés contre les anticorps de souris (Biosys) sont couplés à la phosphatase alcaline et ont une concentration de  $1\text{ mg.mL}^{-1}$ . Ils sont utilisés dilués au 1/800.



## **4.4. Expression d'oléosines par *Y. lipolytica***

### **4.4.1. Transformation des levures**

Les souches de *Y. lipolytica* nous ont été fournies par J.-M. Nicaud (Laboratoire de microbiologie et génétique moléculaire des microorganismes, INRA / INA P-G / CNRS, Grignon). La souche sauvage de référence est appelée PO1D.

#### **4.4.1.1. Préparation des cellules compétentes**

A partir de cellules PO1D auxotrophes pour la leucine (Leu-) et pour l'uracile (Ura-) étalées sur une boîte de Pétri, 2 mL de milieu YPD et citrate-acide citrique pH 4, 50 mM, sont ensemencés. Au bout de 6 h, 20 mL de milieu de culture sont inoculés en erlenmeyer à baffles de volume 50 mL. La culture est incubée sous une agitation orbitale de 250 rpm, à 28 °C, sur la nuit jusqu'à atteindre une concentration cellulaire comprise entre  $8.10^7$  et  $1,2.10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Cette détermination s'effectue par comptage des levures dans une cellule de Malassez, sous microscope.

Les cellules sont alors récoltées par centrifugation de 10 mL de culture à 1800 x g pendant 2 min. Le culot est lavé deux fois avec 10 mL de TE (10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA), puis resuspendu dans 20 mL d'une solution 100 mM acétate de lithium pH 6 dans un erlenmeyer de 250 mL et incubé 1 h à 28 °C sous une agitation douce (140 rpm). Après une centrifugation de 3 min à 1300 x g, les cellules sont resuspendues à  $5.10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup> dans une solution 100 mM acétate de lithium pH 6.

#### **4.4.1.2. Transformation (d'après Gaillardin et Heslot, 1988)**

Au fond d'un tube de 5 mL, 5 µL d'ADN porteur (ADN fragmenté de saumon, à  $5 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ , de la société Sigma), 5 µL de plasmides linéarisés (soit environ 5 µg) et 100 µL de cellules compétentes fraîches sont déposés. On ajoute alors 0,7 mL de polyéthylène glycol (PEG) 4000 40 % en solution dans de l'acétate de lithium 0,1 M pH 6. Le milieu est incubé 1 h à 28 °C, sous une agitation orbitale de 250 rpm puis un choc thermique de 10 min à 39 °C est appliqué. 1,2 mL d'acétate de lithium 0,1 M pH 6 sont alors ajoutés puis 100 µL et 300 µL du milieu de transformation sont étalés sur milieu sélectif YNB N5000 (de la société Difco) supplémenté en leucine  $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , mais pas en Ura du fait de la complémentation par le plasmide.

#### **4.4.1.3. Conservation des souches**

Les levures sont cultivées, en tube en verre, dans 5 mL de YPD pendant 20 h à 28 °C sous une agitation orbitale de 190 rpm. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 1800 x g

pendant 5 min puis le culot est resuspendu dans 1 mL de YEA glycérolé (0,5 % d'extrait de levure (p / v), 1 % de glucose (p / v) et 20 % de glycérol (v / v)). Les tubes sont congelés rapidement dans un mélange carboglace / méthanol puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.1.4. Extraction de l'ADN génomique de levure**

Ce protocole est dérivé de celui de Hoffman et Winston (1987). Des levures sont cultivées dans 10 mL de milieu riche (YPD et tampon phosphate) pendant 20 h. Les cellules sont récoltées par centrifugation  $5000 \times g$ , 5 min puis resuspendues dans 0,5 mL d'eau milli-Q stérile et transférées en microtube. Une nouvelle centrifugation de 1,5 mL à  $5000 \times g$  pendant 2 min est réalisée. Après élimination grossière du surnageant, les cellules sont resuspendues dans le surnageant résiduel auquel sont ajoutés 200  $\mu\text{L}$  du mélange suivant : 2 % de Triton X-100 (p / v), 1 % de SDS (p / v), 100 mM NaCl en tampon TE. 200  $\mu\text{L}$  de chloroforme / phénol (Appligene Oncor) (1 / 1) et 0,3 g de billes de verre (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Allemagne), de diamètre 0,45  $\mu\text{m}$ , lavées à l'acide sont additionnés. L'échantillon est vortexé 3 à 4 min à pleine puissance puis 200  $\mu\text{L}$  de TE sont à nouveau ajoutés et une nouvelle centrifugation est réalisée. La phase aqueuse est récupérée dans un tube Eppendorf propre. On lui ajoute 1 mL d'éthanol 100 % et l'on mélange doucement par retournement du tube. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant est jeté et le culot est repris dans 400  $\mu\text{L}$  de TE avec 30  $\mu\text{g}$  de RNAase. 5 min à  $37^{\circ}\text{C}$  sont nécessaires pour permettre l'activité enzymatique. Ensuite, 10  $\mu\text{L}$  d'acétate d'ammonium à 4 M et 1 mL d'éthanol 100 % sont additionnés. Le contenu du tube est à nouveau mélangé doucement puis centrifugé 2 min et le surnageant éliminé. Après une évaporation sous la hotte, une nuit, à bouchon ouvert, le culot d'ADN est resuspendu dans 50  $\mu\text{L}$  de TE puis est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . L'ADN obtenu est fragmenté en morceaux de 20000 à 30000 paires de bases.

#### **4.4.1.5. Dosage de l'ADN**

L'ADN est ensuite quantifié par mesure de  $A_{260 \text{ nm}}$  et la contamination en protéines par une mesure de  $A_{280 \text{ nm}}$ . Si le rapport  $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$  est compris entre 1,8 et 2, on peut amplifier le fragment par PCR, sachant qu'une unité d' $A_{260 \text{ nm}}$  représente  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'ADN double brin et qu'il en faut quelques nanogrammes pour effectuer une PCR. Le produit de PCR est déposé sur gel d'agarose et l'on vérifie ainsi que la souche de levure comporte bien le gène codant les oléosines.

## 4.4.2. Contrôle de l'expression des oléosines par la levure

### 4.4.2.1. Culture des levures

L'expression des protéines, qui ont été clonées dans *Y. lipolytica* via le plasmide pYEG1, est induite par ajout d'acide oléique (ou huile d'olive) dans le milieu de culture des levures.

Trois milieux ont été utilisés pour cultiver les souches de *Y. lipolytica* mutantes et sauvage : un milieu riche, un milieu minimum (chapitre 2.3.2) et un milieu riche enrichi à 5 % d'acide oléique. Comme les souches sont auxotrophes pour la Leu et que la complémentation pour l'Ura ne se fait pas toujours très bien, le milieu minimum a été enrichi à 200 mg.L<sup>-1</sup> en Leu et à 50 mg.L<sup>-1</sup> en Ura.

Dans les trois cas, les précultures sont réalisées en milieu riche, sur la nuit à partir de cellules fraîchement étalées sur boîte de Pétri YPD agar et le lendemain, le milieu de culture choisi est ensemencé avec 0,5 U.A<sub>600 nm</sub>.mL<sup>-1</sup> de milieu.

### 4.4.2.2. Lyse des cellules

Les levures peuvent être lysées de deux façons :

- Suite à une culture, 500 µL de levures sont récoltés par centrifugation 2 min à 14000 x g en microtubes à bouchon à vis et lavés 3 fois à l'eau milli-Q. Par ailleurs, le surnageant de culture est conservé. Le culot de cellules obtenu après les lavages, représentant 1 volume, est additionné de 1 volume de billes de verre de diamètre 0,45 µm, de 1 volume de solution B sans imidazole (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urée, pH 8) et de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de Pefabloc (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne). Le mélange est vortexé puis est vivement secoué dans un appareil Fastprep FP 120 à 6,5 m.s<sup>-1</sup> pendant 3 fois 10 s avec 2 min de refroidissement sur de la glace entre deux. L'échantillon est alors centrifugé 25 min, à 4 °C à 10000 x g. Le surnageant est conservé à -20 °C.

- On peut aussi employer de la zymolase (méthode utilisée dans le chapitre 2.3.8 pour extraire les globules lipidiques de la levure).

### 4.4.2.3. Analyse du contenu en protéines

- *Dans un extrait brut de culture*

Après lyse des cellules avec des billes de verre et centrifugation, les surnageants de culture et l'extrait des culots en urée sont précipités par l'acétone (voir chapitre 4.5.1.1) puis ils sont repris dans 50 µL de tampon d'échantillon pour électrophorèse SDS-PAGE.

- *Dans des corps lipidiques isolés*

La culture est réalisée en milieu minimum, enrichi en leucine, uracile et acide oléique, puis les corps lipidiques ont été isolés selon la méthode décrite dans le chapitre 2.3.8. Ensuite, les corps lipidiques sont délipidés et les protéines précipitées au TCA (chapitre 2.3.8.1) et nous avons déposé les échantillons sur gel d'électrophorèse. Après transfert sur membrane, nous avons fait un western blot en utilisant les anticorps anti-rS4 (chapitre 2.2.2.2).

## **4.5. Solubilité des oléosines**

### **4.5.1. Précipitation des oléosines**

#### **4.5.1.1. A l'acétone**

Les oléosines sont purifiées dans une solution concentrée en urée. La précipitation des protéines permet d'éliminer les sels pour des études ultérieures.

A 1 volume d'échantillon d'oléosines purifiées sont ajoutés 3 volumes d'acétone glacial 100 %. Le mélange est vortexé puis laissé au moins 2 h à - 20 °C. Au bout de ce temps, le mélange est centrifugé 5 min à 15000 x g à 4 °C dans un appareil Biofuge 15 de Heraeus Sepatech. Le surnageant est éliminé et le culot est repris avec au moins 5 volumes d'acétone 90 % glacial. Après passage au vortex, les échantillons sont remis 10 min à - 20 °C et à nouveau centrifugés. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot est laissé à sécher sous une sorbonne (bouchons ouverts) sur la nuit.

#### **4.5.1.2. Au TCA**

Les protéines sont précipitées au TCA selon le protocole suivant : un volume d'échantillon est additionné d'un volume de TCA 20 %. Après 30 min d'incubation sur de la glace, on centrifuge 10 min à 15000 x g à 4 °C. La phase supérieure est éliminée et le culot est lavé deux fois 5 min par de l'acétone 90 % glacial. Le culot est laissé à sécher sous une hotte (bouchons ouverts).

### **4.5.2. Re-solubilisation des oléosines**

#### **4.5.2.1. En milieu polaire**

Les culots de protéines précipitées à l'acétone sont repris dans le volume voulu d'un mélange contenant 1 % de TFA (v / v) et 50 % de TFE (v / v) par incubation sur la nuit à 4 °C.

#### **4.5.2.2. En milieu apolaire**

Dans un tube en verre, fermé par un bouchon à vis et comportant un joint de Téflon (Supelco), à un volume d'oléosine (compris entre 50 et 300  $\mu\text{L}$ ) est ajouté un volume d'un mélange chloroforme / méthanol (95 / 5, v / v). Le tube est vortexé puis incubé 30 min à 50 °C dans un four à hybridation / balancette Amersham sous agitation maximale. L'échantillon est transféré dans un microtube en polypropylène (Polylabo) pour une étape de centrifugation de 2 min, 14000 x g à la température du laboratoire. La phase aqueuse supérieure est aspirée et jetée et la phase inférieure chloroformique et l'interface sont re-transvasées dans un tube en verre et conservées à + 20 °C.

### **4.6. Méthodes d'étude de structure**

#### **4.6.1. Dichroïsme circulaire (DC)**

Les molécules chirales n'absorbent pas de la même façon la lumière polarisée droite et gauche. Bien que les acides aminés (exceptée la glycine) soient optiquement actifs, ils donnent un signal faible par DC. Au contraire, la structure tertiaire des protéines donne un signal par DC qui renseigne sur sa composition en hélices  $\alpha$ , feuillets et coudes  $\beta$ , chaque structure étant repérée à une longueur d'onde bien particulière.

Ces mesures ont été faites à l'université d'Orsay avec M. Desmadril (Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, CNRS / Université Paris-Sud, Orsay) sur un appareil Jasco J-810. Pour cela, nous avons utilisé 200  $\mu\text{L}$  d'une protéine à 5  $\mu\text{M}$  (équivalent à 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'oléosine) en solution dans du TFA / TFE (1 % / 50 %). Le spectre a été mesuré trois fois par bandes de 2 nm entre 250 et 190 nm à 5  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , 22 °C dans une cuve de 1 mm. Les hélices  $\alpha$  sont révélées par des pics à 222 et 210 nm et les feuillets  $\beta$  à 195 nm.

#### **4.6.2. Diffusion de la lumière**

##### **4.6.2.1. Mesures de viscosité**

La viscosité des milieux réactionnels utilisés dans cette étude a été déterminée. Pour cela, deux méthodes ont été utilisées. D'une part une mesure par cisaillement sur un appareil Low Shear 30 de Contraves avec G. Cuvelier (Laboratoire de biophysique des matériaux alimentaires, ENSIA, Massy) et d'autre part à l'aide d'un viscosimètre capillaire Prolabo certifié (Laboratoire de génie et microbiologie des procédés alimentaires, INRA / INA P-G, Grignon).

- *Mesure par cisaillement*

Le premier appareil est constitué d'une cellule de mesure de 1 mL, entourée d'une enceinte thermostatée reliée à un bain-marie. Dans la cellule de mesure, plonge un pendule. Lors de la rotation de la cellule de mesure à une vitesse connue, il s'exerce une torsion sur le fil du pendule. C'est cette force qui est mesurée. Nous avons utilisé cet appareil à deux températures : 15 et 30 °C. 1 mL de solution est versé dans la cellule de mesure. Il est alors nécessaire d'attendre 5 min que la température s'équilibre. Pour chaque échantillon, et à chaque température, la mesure est refaite trois fois (trois vitesses de rotation différentes). La viscosité en mPa.s est ensuite déterminée en appliquant au résultat lu sur l'appareil le coefficient multiplicateur donné dans une table de correspondance de l'appareil.

- *Viscosimètre capillaire*

La détermination de la viscosité par la méthode du tube viscosimétrique est basée sur le temps nécessaire à un liquide pour s'écouler dans un capillaire vertical (Prolabo), sous l'effet de la pesanteur, entre deux repères, à une température donnée. A chaque capillaire en verre est associé un certificat d'étalonnage qui permet de calculer la viscosité en fonction du temps d'écoulement et de la masse volumique du fluide à la même température.

$$\eta = K' \times \rho \times t'$$

avec  $\eta$  la viscosité en Pa.s,  $K'$  la constante d'étalonnage du tube ( $K' = 0,000002606$  sur notre appareil),  $\rho$  la masse volumique de la solution en  $\text{g.cm}^{-3}$  (1,1259 pour la solution E d'urée 8M et 1,2138 pour le TFA / TFE à 20 °C) et  $t'$  la durée de vidage en s entre deux repères fixes situés sur le tube.

Contrairement au premier appareil, il n'y a pas de régulation de température dans ce cas. Nous nous sommes donc placés soit sur une paillasse de laboratoire (température mesurée de 20 °C), soit dans une chambre maintenue à 14 °C. La mesure est faite après un temps d'attente pour équilibrer en température le tube et les solutions.

A partir des valeurs de viscosités à deux températures, la viscosité aux autres températures peut être extrapolée par la loi d'Arrhénius :  $\eta = ke^{-E/RT}$ , où  $\eta$  est la viscosité en Pa.s,  $E$  l'énergie d'activation molaire en  $\text{J.kM}^{-1}$ ,  $R$  la constante des gaz parfaits ( $8314,1 \text{ J.kM}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ) et  $T$  la température en K.

#### **4.6.2.2. Mesure de l'indice de réfraction**

L'indice de réfraction des solutions a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre universel de type ABBE, modèle standard adapté aux indices compris entre 1,3 et 1,7. La mesure a été réalisée à 20 °C.

#### **4.6.2.3. Mesure par diffusion de la lumière**

La mesure a été réalisée selon le protocole décrit dans le chapitre 2.1.3.3.

### **4.7. Méthodes d'étude des propriétés de surface aux interfaces**

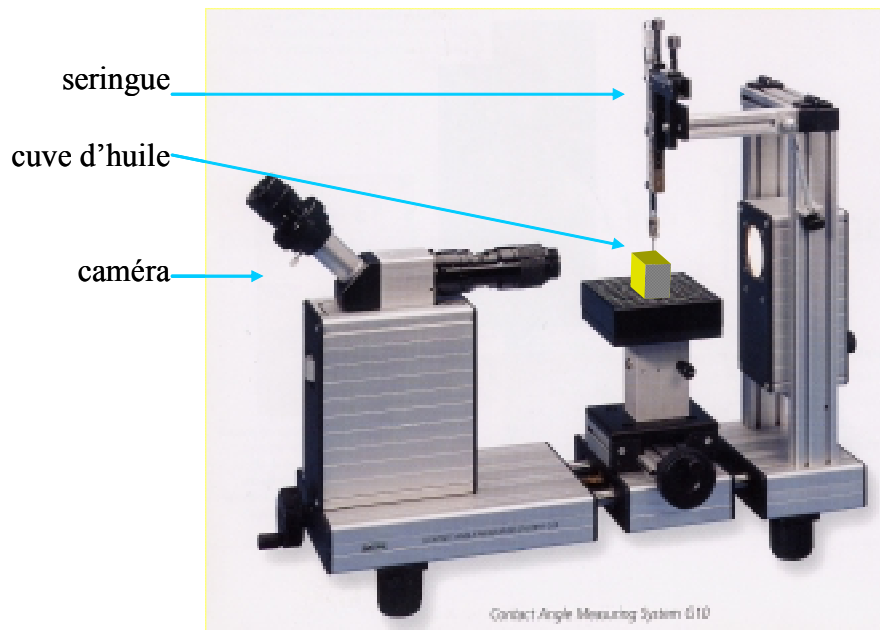
Chez les végétaux, les oléosines sont intégrées dans une monocouche de PLs à une interface eau / huile. Nous avons utilisé deux techniques expérimentales pour déterminer les propriétés de surface des oléosines aux interfaces.

#### **4.7.1. Mesures de tension de surface dans un plan**

A l'aide d'une balance de Langmuir, on peut mesurer la tension de surface d'une monocouche de tensioactifs et la surface du film est observée via un microscope à angle de Brewster (BAM) (chapitre 2.4). Les expériences ont été conduites de la manière suivante : la balance est remplie d'eau milli-Q. On dépose ensuite par-dessus, à l'aide d'une seringue, des PLs dilués à 1 g.L<sup>-1</sup> dans du chloroforme (lécithine de soja (PC) de la société Fluka. M = 790 g.mol<sup>-1</sup>. Pureté ≥ 99 % ou L- $\alpha$ -phosphatidylinositol de soja (Pi) de Sigma. Pureté > 98 % sous forme de sel d'ammonium) ou des oléosines ou un mélange PLs / oléosines (mélange effectué au préalable dans un tube de verre). Après un temps de repos ou un premier cycle de compression / décompression du film, on peut ajouter un deuxième constituant par-dessus le film : des oléosines sur un film de PLs ou des PLs sur un film d'oléosines. Un temps de repos de 30 min est à nouveau observé puis l'isocycle de compression / décompression commence. La vitesse de fermeture (ou réouverture) des barrières est de 50 cm<sup>2</sup>.min<sup>-1</sup>, la surface comprise entre les barrières évolue entre 694 et 51 cm<sup>2</sup>. Les oléosines sont apportées en solution, soit dans un mélange chloroforme / méthanol (95 / 5, v / v), soit en solution d'élution E.

#### **4.7.2. Mesures de tension de surface de goutte**

Les mesures de tension de surface (IFT) sont effectuées à l'aide d'un appareil à angle de contact DSA 10, Drop Shape Analysis system de la société Krüss (Hambourg, Allemagne) (Figure 45).



**Figure 45 : Appareil à angle de contact DSA10 (Krüss). Montage réalisé pour mesurer des tensions de surface en gouttes aqueuses pendantes dans un bain d'huile.**

Le principe de la mesure est le suivant : une goutte de liquide (ou une bulle d'air) est formée dans l'air ou dans un autre liquide, non miscible au premier. Une caméra filme la goutte. L'image obtenue est traduite en un profil de goutte à partir duquel, selon la loi de Laplace (Équation 1), une IFT est calculée par le logiciel Drop Shape Analysis DSA1, version 1.65 (Krüss). Pour cela, il est nécessaire de connaître les densités des solutions. Elles ont été mesurées par pesée dans des fioles jaugées de 10 mL, à 20 °C. Ainsi, l'huile de tournesol a une densité (D) de 0,912 et pour la solution d'éluion E des oléosines, D = 1,1259.

**Équation 1 : Équation de Young-Laplace.**

$$\Delta P = \sigma (1/r_1 + 1/r_2)$$

$\Delta P$  est la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte,  $\sigma$  la tension interfaciale et  $r_x$  les rayons principaux d'une section d'aire de la surface de la goutte.

Pour générer des gouttes pendantes, nous utilisons une seringue munie d'une aiguille de diamètre 1,54 mm dans laquelle sont introduites les solutions à tester (solution d'éluion E avec ou sans protéines). Nous comparons l'effet des caséines  $\beta$ , du lysozyme et des oléosines produites par *E. coli*, en solution dans E, sur l'IFT à l'interface de la goutte avec de l'air ou de l'huile. Dans ce dernier cas, l'aiguille est plongée dans une cuve de spectrophotométrie en verre (L \* l \* P, mm : 45 \* 10 \* 10) contenant 2 mL d'huile de tournesol de cuisine et la



goutte est formée dans l'huile. L'IFT est mesurée toutes les 10 minutes pendant 2 heures à 20 °C. A la fin d'une cinétique, la seringue et la cuve sont nettoyées au savon et à l'eau chaude puis à l'eau distillée et nous effectuons une mesure de contrôle sur de l'eau distillée à l'interface avec de l'air (IFT de référence =  $73 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Pour des mesures à l'interface eau / air, l'aiguille est aussi introduite dans une cuve de verre au fond de laquelle se trouve un peu d'eau. La cuve est fermée par un parafilm autour de l'aiguille. La goutte se trouve ainsi dans une atmosphère saturée en humidité afin de limiter l'évaporation.

## 5. Résultats et discussion

---

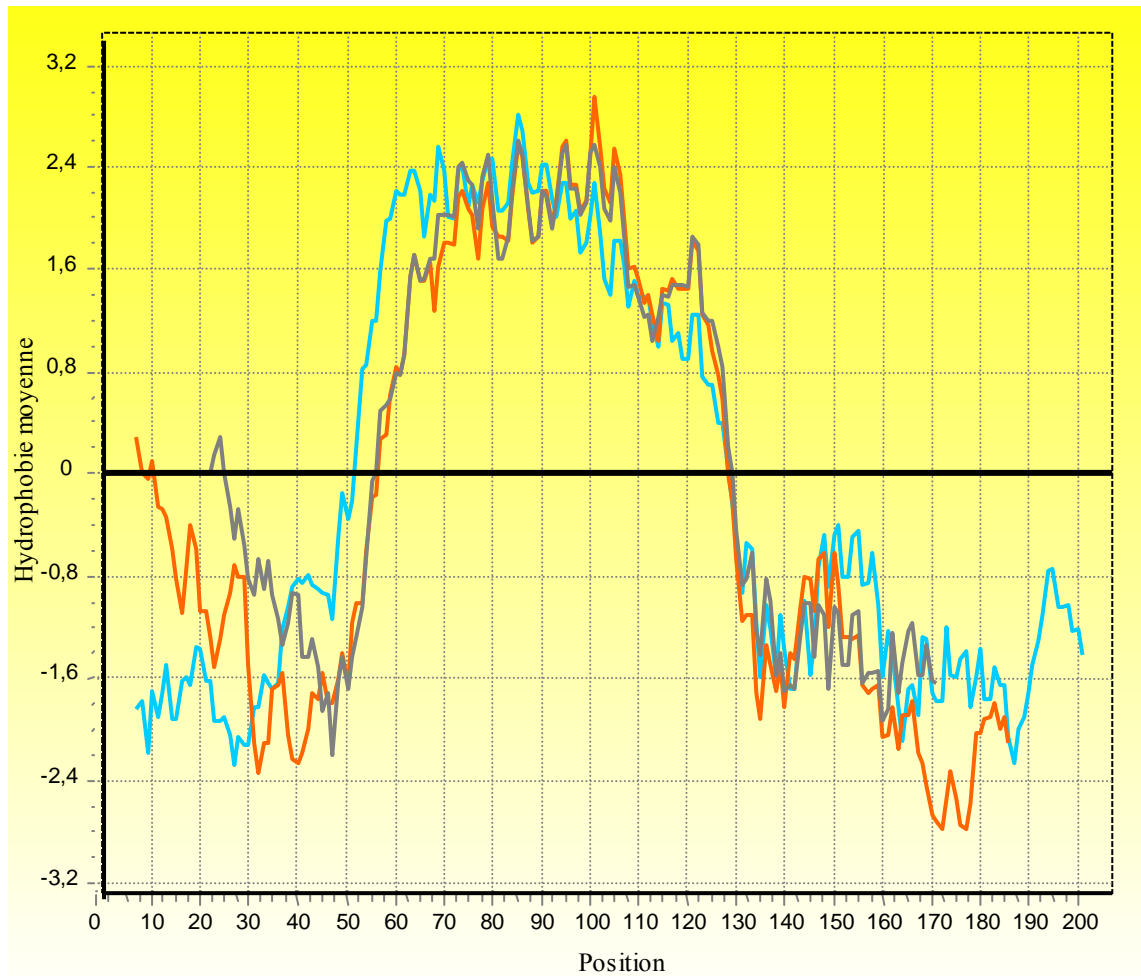
Nous avons tout d'abord déterminé *in silico* les caractéristiques d'hydrophobie et de charge des oléosines. Afin de vérifier *in vitro* les données de la littérature sur la structure des oléosines et d'élargir l'étude à leurs propriétés de surface aux interfaces, nous avons ensuite cloné, exprimé des isoformes d'oléosines d'*A. thaliana* chez une bactérie et une levure et purifié les oléosines recombinantes exprimées par les bactéries.

### 5.1. Étude *in silico* de séquences d'oléosines

#### 5.1.1. Structures primaires et caractéristiques hydrophobes

La quantification de l'hydrophobie d'une protéine est essentielle dans la prédiction de la fonctionnalité d'une protéine. Ainsi, des corrélations significatives ont été obtenues entre la capacité émulsifiante, la stabilité de l'émulsion, la capacité de fixation aux lipides de protéines dénaturées et leur hydrophobie de surface et leur solubilité (Nakai, 1983).

Sur la Figure 46, la conservation du segment central hydrophobe est mise en évidence entre deux isoformes natives d'arabette de 18 et 21 kDa et une oléosine d'amande de 16 kDa. Les extrémités N-terminales des trois isoformes sont peu différentes en taille, mais celle de l'oléosine d'amande est plus hydrophobe que celle de S3 et S4. En revanche, les extrémités C-terminales paraissent moins différentes en terme d'hydrophobie, S3 étant tout de même plus hydrophile, mais les longueurs de chaînes sont beaucoup plus variées, déterminant les masses moléculaires des oléosines.



**Figure 46 : Profil d'hydrophobie des oléosines d'amande (gris) et d'*A. thaliana* S3 (orange) et S4 (bleu). Profils obtenus sur Bioedit par la méthode de Kyte et Doolittle (1982) avec une fenêtre de 13 acides aminés.**

Des alignements de séquence d'oléosines de graine d'espèces telles que *A. thaliana*, colza, soja, riz, coton, sésame, amande, orge, maïs, tournesol, cacahuète sont représentés sur la Figure 47. Le segment central est très conservé intra et inter-espèces, notamment au niveau des trois proline centrales (en rouge sur la figure) alors que les extrémités N- et C- sont variables en taille et en composition en acides aminés.



A.th.(C016041\_17)169  
S3-A.th.(NP\_194244)1  
A.th.(NP\_189403)191a  
S4-A.th.(NP\_198858)1  
colza(S49448)157aa  
colza(S50195)165aa  
colza(P29111)175aa  
colza(P29526)183aa  
colza(228416)187aa  
colza(S22475)195aa  
Brassica oleracea(AA  
soja(S17936)223aa  
soja(T06378)226aa  
riz(T02070)148aa  
riz(T03380)172aa  
coton(T10784)154aa  
coton(T10788)168aa  
sesame(JC5703)144aa  
sesame(AAD42942)145a  
sesame(AF302807\_1)16  
amande(Q4380aa4)148a  
amande(S51940)149aa  
orge(S57801)135aa  
orge(S57779)158aa  
orge(S57778)184aa  
mais(S52029)156aa  
mais(S52030)175aa  
mais(A35040)187aa  
tournesol(P29529)181  
tournesol(CAA55348)1  
tournesol(S60482)184  
cacahuète(AAK13449)1  
carotte(AAB01098)168  
sarrasin(AAG01171)17  
Elaeis guineensis(AA  
Bromus secalinus(Q96  
Perilla frutescens(A  
Perilla frutescens(A

a v s w l y r y f k g m h p l r s d q v d y a r s r i h d t a a h v k d y a g g y f h g t l k d a a p g a  
i a a i t v f s w i y k y a t g e h p q g s d k l d s a r m k l g s k a q d l k d r a q y y g q q h t g g e h d r d r  
l t g l s s v s w v l n y l r g t s d t v p e q l d y a k r r m a d a v g y a g m k g k e m g q y v q d k a h e a r e  
l t g l s s i s w v m n y l r g t r t v p e q l e y a k r r m a d a v g y a g q k g k e m g q h v q n k a q d v k q  
a t a v t i i l w l y k q a t g k e p p a v l s k v l k k i i p g a a a a p r a a p a a a p a a a p a a a p a a p a  
i a a i t v f s w i y k y a t g e h p q g s d k l d s a r m k l g s k a q d l k d r a q y y g q q h t g g y g q q h t  
i a a i t v f s w i y k y a t g e h p q g s d k l d s a r m k l g g k v q d m k d r a q y y g q q q t g g e d d r d r  
l t g i g l i m g l v r t a g g v s l l q s p l r k i i v n r i k a r l g g g g g s r l a r l k k i l g l l n k l r  
i a a i t v f s w i y k y a t g e h p q g s d k l d s a r m k l g g k v q d m k d r a q y y g q q q t g g e h d r d r  
i a a i t v f s w i y k y a t g e h p q g s d k l d s a r m k l g s k a q d l k d r a q y y g q q h t g g y g q q h t  
l t g i g l i t g l v r t a g g v t l a e s p i r r i i n r i k a r l g g g g g s r l a m l k k i l g l i k k l r g  
l t a l s s f s w i l n y i r e t q p a s e n l a a a a k h h l a e a a e y v g q k t k e v g q k t k e v g q d i q s  
l t a l s s f s w i l n y i r e t q p a s e n l a a a a k h h l a e a a e y v g q k t k e v g q k t k e v g q d i q s  
v a a l s v f s w m y k y l t g k h p p g a d l d h t k a r v a s k l r d i k e a a h h l i d q a q a s  
l g g l s l t f l a n t a r q a f q r t p d y v e e a r r m a e a a a h a g h k t a q a a h a i q g r a d q a g t  
l g l s l s y v f n r f r q a t g t e q l d a d a k r g m q d m v g y v g q k t k e g q t i e n k a h e g g r  
l t g l s l s y v l n r l r y a t g t e q l d l d h a k r r v q d m t e y v g q k t k e v g q k i e n k a h e g q v  
i t a l s s i s w l l n y v r r m r g s l p e q l d h a r r r v q e t v g q k t r e a g r s q d v i r p  
v a a l s v l s w i y r y l t g k h p p g a d q l e s a k t k l a s k a r e m k d r a e q f s q q p v a g s q t s  
l t g l s l s w v l n s f r a t g q g p l e y a k r g v q e g t l y v g e k t k q a g e a i k s t a k e g g r e g  
v a a v t v l s w i y k y v t g k k p p g a d q l d q a r h k l a g k a r d i k d r a e q f g q q h v p s g q q q s s  
v a a v t v l s w i y k y v t g k k p p g a d q l d q a r h k l a g k a r d i k d r a e q f g q q h v p s g q q q g s  
l g g l s l t v l a n t a r q a f q r t p d y v e e a r r m a d a a a a a g h k t a q a g h i q s r a e e t r a  
v a a l s v f s w m y k y l t g k h p p g a d q l d h a k a r l a s k a r d i k d a a q t r i d q a q g a  
l g g l s l t v l a n t a r q a f q r t p d y v e e a r r m a d a a a a a g h k t a q a g h i q s r a e e t r a  
v a a l s v f s w m y k y l t g k h p p a a d q l d h a k a r l a s k a r d v k d a a q h r i d q a q g s  
l g g l s l t c l a n t a r q a f q r t p d y v e e a r r m a e a a a h a g h k t a q a g h i q s k a q e a g a  
l g g l s l t c l a n t a r q a f q r t p d y v e e a r r m a e a a a a q a g h k t a q a g q a i q g r a q e a g t  
l t g l s l s y l f n m v r q t a g s v p e s l d y v k g t l q d a g e y a g q k t k d l g q k i q s t a h e m g d  
l t g l s l s y l f n m v r r s t m s v p d q m d y v k g k l q d v g e y t g q k t k d l g q k i q h t a h e m g d  
l t g l s l s y l f n m v r r s t m s v p d q m d y v k g k l q d v g e y t g q k t k d l g q k i q h t a h e m g d  
l t g l m s l s w m i n f i r q v h g t t v p d q l d s v k r m a d m a d y v g q k t k d a g q q i q t k a q d v k  
h r a f v l f w m y r y t a g k h p i g a n q l d f a a t l r m r k e k g x i w g m s r f l r f r g v e v v r r x  
l t a l s a l s w m i s y i r q i r a s g g p g i m g e a r w r v a q g d l r g e k t k d l g r g i q d r a y d a r  
v a a l s v l s w l y k y l t g k r v p g s e q l e q a r a r l a s k a r d v k e s a q h r s e q a q t s  
v a a v s v f s w m y k y l a g k h p p g a d q l d h a k a r l a s k a r d i k d a a q v e t i r v e q a q g a  
l t g l s l s w v f n s f r q a t g q e p l d y a k r r m q e g t m y v g e k t k q v g e t i k s k a q e g g h d d  
l t g l s l s w v f n s f r q a t g q e p l d y a k r r m q e g t m y v g e k t k q v g e t i k s k a q e g g h d d

A.th.(C016041\_17)169  
S3-A.th.(NP\_194244)1  
A.th.(NP\_189403)191a  
S4-A.th.(NP\_198858)1  
colza(S49448)157aa  
colza(S50195)165aa  
colza(P29111)175aa  
colza(P29526)183aa  
colza(228416)187aa  
colza(S22475)195aa  
Brassica oleracea(AA  
soja(S17936)223aa  
soja(T06378)226aa  
riz(T02070)148aa  
riz(T03380)172aa  
coton(T10784)154aa  
coton(T10788)168aa  
sesame(JC5703)144aa  
sesame(AAD42942)145a  
sesame(AF302807\_1)16  
amande(Q4380aa4)148a  
amande(S51940)149aa  
orge(S57801)135aa  
orge(S57779)158aa  
orge(S57778)184aa  
mais(S52029)156aa  
mais(S52030)175aa  
mais(A35040)187aa  
tournesol(P29529)181  
tournesol(CAA55348)1  
tournesol(S60482)184  
cacahuète(AAK13449)1  
carotte(AAB01098)168  
sarrasin(AAG01171)17  
Elaeis guineensis(AA  
Bromus secalinus(Q96  
Perilla frutescens(A  
Perilla frutescens(A

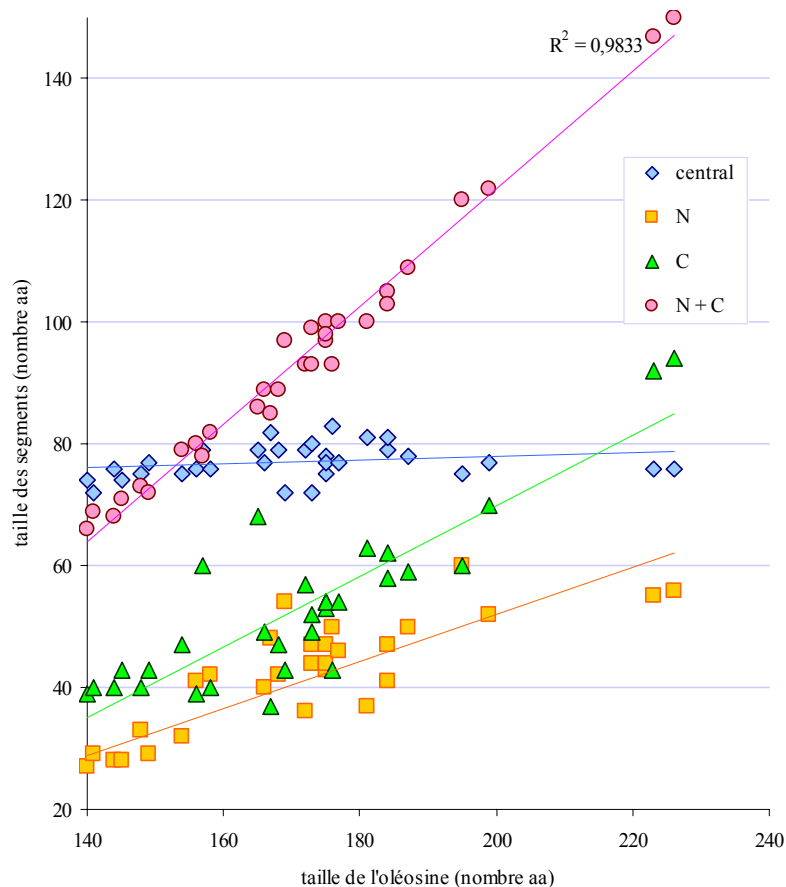
t r g g q h t t  
t e f m t e t h e p g k a r r g s  
y d i s k p h d t t t k g h e t q g r t t a a  
p k p a a a p a p k p a a p p a l  
a a p a a a p a p k p a a p p a p k p a a a p s i  
t r g t q h t t  
g m g a g g a a p a a e p a p a e e a p a a e a p a a a p a a a p a a a p  
t r g t q h t t  
g g e h d r d r t r g t q h t t  
m s s g g a a p a l k q h q l r p r m e l h p r h l h r p n k e r w f m l f q y v a h k n c v i i n l r i y d s e t k  
k a q d t r e a a a r d a r d a r e a a a r d a r d a k v e a r d v k r t t v t a t t a t a  
k a q d t r e a a a r d a r e a a a r d a r e a a a r d a k v e a r d v k r t t v t a t t a t a  
g a g a g g g a g t k t s s  
t  
g r t  
t a r t  
s  
g h t a g a g a g a g t r a s s  
g h t a g a g a g a g t r a s s  
g t g a g g g r t s s  
g g g a g a g a g g g g r a s s  
q g q v g v h a q v g g g k e g r k s g d r t  
q g q g q g g g k e g r k e g g k  
q g q g q g g g k e g r k e g g k  
r s s s  
g n d e g f l a v  
a h e v g r t t a  
r t t v l g g r t  
r t t v l g g r t

A.th.(C016041\_17)169  
S3-A.th.(NP\_194244)1  
A.th.(NP\_189403)191a  
S4-A.th.(NP\_198858)1  
colza(S49448)157aa  
colza(S50195)165aa  
colza(P29111)175aa  
colza(P29526)183aa  
colza(228416)187aa  
colza(S22475)195aa  
Brassica oleracea(AA  
soja(S17936)223aa

k k i a l l l s f i q y s f l c n n v

Figure 47 : Alignement de séquences d'acides aminés de 38 isoformes d'oléosines de graine (en rouge : proline, surligné : acide aminé conservé).

A partir de profils d'hydrophobie tels que ceux de la Figure 46, nous avons déterminé les tailles des fragments hydrophiles et hydrophobes de 31 isoformes d'oléosines de graines. On retrouve à nouveau sur la Figure 48 la grande conservation en taille du segment central hydrophobe (entre 70 et 80 acides aminés). Les droites correspondant à l'accroissement de taille des extrémités N- et C-terminales sont quasiment parallèles, la taille du fragment C-terminal étant plus grande que celle du N-terminal. L'augmentation en taille des oléosines se fait donc simultanément par les extrémités N- et C-terminales.



**Figure 48 : Évolution de la longueur des segments N- et C- terminaux et central hydrophobe en fonction de la taille de l'oléosine. La taille des fragments a été déterminée à partir des profils d'hydrophobie de Kyte et Doolittle (1982).**

Il est théoriquement admis que l'hydrophobie globale d'une oléosine est corrélée à sa taille. L'hypothèse de Beisson *et al.* (2001b) est que la taille du segment hydrophobe étant constante, l'oléosine grandit par ses extrémités hydrophiles. En effet, si l'on utilise le rapport : taille du segment central / longueur totale de la protéine, S4 ( $77 / 199 = 0,387$ ) semble effectivement plus hydrophile que S3 ( $73 / 183 = 0,399$ ). Quant à nous, pour quantifier l'hydrophobie, nous avons utilisé la proportion d'acides aminés hydrophobes contenus dans la

protéine. Dans ce cas, rS4 recombinante (ou S4 native), la plus grande, est plus hydrophobe que rS3 (ou S3) (Tableau 15).

**Tableau 15 : Analyse de la composition des oléosines recombinantes et natives d'arabette en acides aminés. L'hydrophobie a été calculée comme la proportion d'acides aminés hydrophobes contenus dans la protéine (d'après Nakai, 1983).**

	rS3	rS4	S3	S1	S4	S2
n° accession			CAA44225	AAF01542	BAB11599	CAA63011
MM (kDa)	19,6	22,4	18,6	19,7	21,3	20,3
ac. aminés	181	208	173	183	199	191
aa hydrophobes	89	112	88	101	110	108
aa hydrophiles	92	96	85	82	89	83
<b>hydrophobie</b>	<b>0,492</b>	<b>0,538</b>	<b>0,509</b>	<b>0,552</b>	<b>0,553</b>	<b>0,565</b>
aa basiques	30	30	24	25	24	23
aa acides	15	16	14	17	15	19
pI	9,2	9,1	9,4	7,1	9,4	6,9
$\epsilon(M^{-1}.cm^{-1})_{280nm}$	14650	15930	14650	9530	15930	15930

### 5.1.2. Charges des oléosines

Les pI des oléosines par segments de 20 acides aminés sont représentés dans la Figure 49. Si le segment central hydrophobe est non chargé et très conservé entre les différentes oléosines, en revanche, il existe une grande variabilité de charges au niveau des extrémités terminales, majoritairement basiques. Ces pI basiques des extrémités terminales des oléosines jouent certainement un rôle majeur dans l'association des oléosines avec les groupements polaires des PLs chargés négativement à la surface des globules (Tzen *et al.*, 1992). Il faut néanmoins noter que le pI basique n'est pas systématiquement retrouvé pour toutes les isoformes, ainsi S1 et S2 ont des pI neutres (Tableau 15). Kim *et al.* (2002) ont même trouvé un pI de 5,8 pour l'oléosine T8 du pollen d'*A. thaliana*.

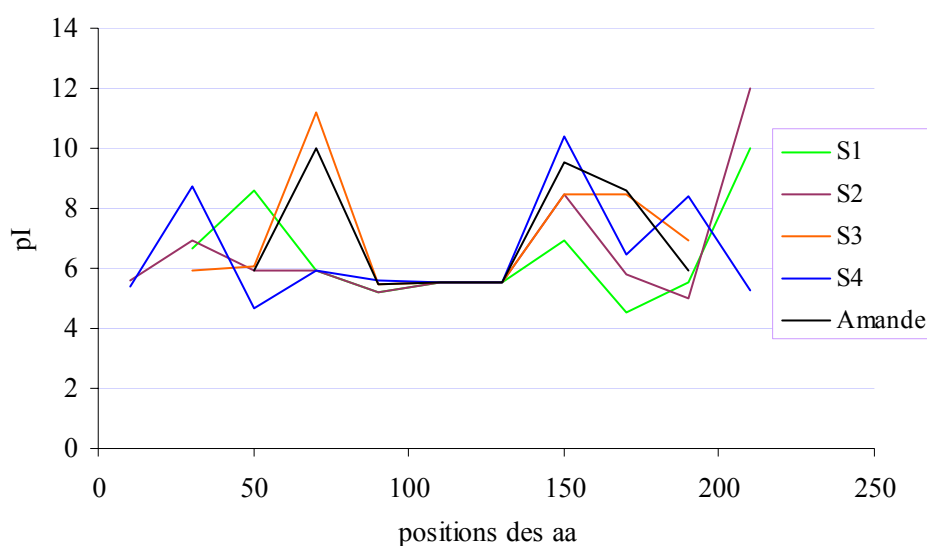


Figure 49 : pI d'oléosines (calculés par segment de 20 acides aminés).

### 5.1.3. Hydrolyses des oléosines par des protéases

#### 5.1.3.1. Effet de la trypsine

Lacey *et al.* (1998a) et Tzen et Huang (1992) avaient postulé que le segment central hydrophobe des oléosines est enchâssé dans le globule lipidique. Ils avaient appuyé leur hypothèse en montrant que le segment central hydrophobe restait intact lors de l'incubation d'oléosomes en présence de trypsine. Or, nous remarquons dans le Tableau 16 que les segments centraux de diverses oléosines ne présentent pas de sites de coupures potentiels à la trypsine. Leur expérience de protéolyse ne peut donc pas valider l'hypothèse d'insertion du segment central de l'oléosine dans l'oléosome.

Tableau 16 : Nombre de coupures tryptiques par segment d'oléosine (obtenu sur le site <http://www.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl> à partir des séquences protéiques).

oléosine	N-term	central	C-term
<i>A. thaliana</i> (173 aa)	7	1*	10
<i>A. thaliana</i> (199 aa)	6	0	11
amande	1	1*	8
maïs (156 aa)	3	1**	8
maïs (175 aa)	4	0	7
maïs (187 aa)	5	0	7

\* coupure au deuxième acide aminé du segment hydrophobe

\*\* coupure au sixième acide aminé du segment hydrophobe



### **5.1.3.2. Effet de la protéinase K**

L'oléosine S3 présente 81 sites potentiels de coupure à la protéinase K, répartis tout au long de la séquence d'acides aminés (respectivement 86 pour S4). Chen et Tzen (2001) ont mis en évidence la protection d'un fragment de 8 kDa d'une oléosine de sésame contre la protéinase K lorsque la protéine est incorporée dans une émulsion *in vitro*, alors qu'elle est dégradée entièrement en 20 min hors d'un environnement émulsionné. Cette protection du domaine central hydrophobe à la protéolyse par la protéinase K a été confirmée par Abell *et al.* (2000). Ceci montre la protection du domaine central hydrophobe dans le corps lipidique contre la digestion protéolytique et pourrait permettre de valider l'hypothèse émise par Tzen et Huang (1992). Néanmoins, bien qu'ayant une spécificité de résidus faible, les sites de coupure par la protéinase K sont très dépendants de la conformation des protéines (Juul *et al.*, 1995).

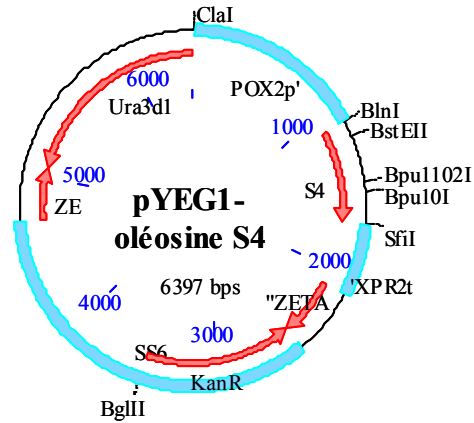
### **5.1.4. Autres caractéristiques des oléosines**

Les oléosines sont susceptibles de former des dimères (Tzen *et al.*, 1990). L'existence de motifs « leucine zipper » a été recherchée dans les séquences de S1, S2, S3 et S4 (à l'aide du site web ExPasy Prosite). Ce motif consiste en la répétition d'un heptapeptide « abcdefg », dans lequel a et d sont des résidus hydrophobes et e et g des acides aminés chargés (Harbury *et al.*, 1993). Il participe à l'interaction de protéines entre elles et ainsi à leur oligomérisation, ceci en fonction des conditions de pH jouant sur les charges des résidus d'acides aminés. Seule l'oléosine S3 possède deux sites éventuels de « leucine zipper » dans son segment central.

Toutes les isoformes d'oléosines sont amphiphiles avec une séquence primaire d'acides aminés « hydrophiles – hydrophobes – hydrophiles ». Elles présentent donc des caractéristiques d'émulsifiants. Naturellement, elles stabilisent des émulsions huile dans eau, mais du fait des variations de la taille des séquences hydrophiles par rapport à celle du segment central hydrophobe, elles pourraient avoir une gamme d'application plus large.

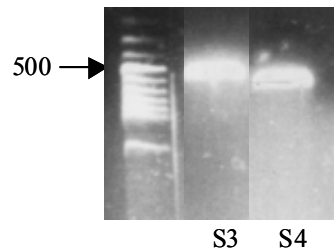
## **5.2. Clonage dans *Y. lipolytica***

La construction plasmidique est représentée sur la Figure 50 pour l'expression par *Y. lipolytica* de l'oléosine S4.



**Figure 50 : Plasmide d'expression par sécrétion de S4 d'*A. thaliana* dans *Y. lipolytica*.**

La séquence codant l'oléosine S4 a été amplifiée avec les amorces décrites dans le Tableau 11. Les produits de PCR sont vérifiés par migration sur gel d'agarose (Figure 51, l'oléosine S3 avait été amplifiée de la même manière, avec des amorces spécifiques, non décrites dans ce mémoire).



**Figure 51 : Produits de PCR sur la séquence codant S4.**

La séquence codant S4 a bien engendré un produit de PCR qui migre vers 600 paires de bases (celle codant S3 vers 500 paires de bases).

Le produit de PCR de S4 a donc été introduit dans le plasmide d'expression de la levure pYEG1 puis le plasmide a été multiplié dans des bactéries *E. coli* JM109.

L'insertion de la séquence codante dans le plasmide d'expression est alors contrôlée par extraction puis digestion par SfiI et BlnI du plasmide et dépôt sur gel d'agarose. Finalement, les plasmides ont été vérifiés par séquençage. La séquence obtenue correspond bien à celle de S4 (Figure 52).

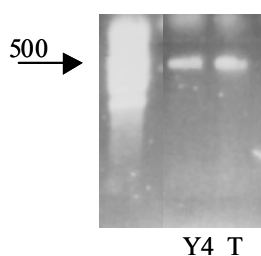
```

1      ATG GCG GAT ACA CAC CGT GTC GAC CGT ACT GAT AGA CAC TTT CAA   45
46     TTT CAG TCG CCC TAT GAA GGC GGC CGA GGT CAA GGT CAG TAT GAA   90
91     GGT GAC CGT GGT TAC GGT GGT GGC GGT TAC AAG AGC ATG ATG CCT  135
136    GAA AGT GGC CCA TCT AGT ACC CAA GTA TTG TCC CTG TTG ATT GGA  180
181    GTC CCT GTC GTC GGT TCG CTA CTT GCC TTG GCT GGA TTA CTT CTA  225
226    GCT GGT TCG GTG ATC GGC TTA ATG GTT GCT TTA CCA CTA TTT CTC  270
271    CTC TTC AGC CCG GTT ATA GTC CCA GCG GCT CTA ACT ATC GGG CTT  315
316    GCA ATG ACA GGC TTT TTA GCC TCG GGG ATG TTC GGT CTA ACC GGG  360
361    CTT AGC TCA ATC TCA TGG GTC ATG AAC TAT CTT CGT GGG ACA AGG  405
406    AGA ACT GTG CCT GAG CAA TTG GAG TAT GCT AAG AGG AGA ATG GCT  450
451    GAT GCG GTT GGC TAC GCA GGA CAA AAG GGC AAA GAA ATG GGC CAG  495
496    CAT GTG CAG AAC AAG GCC CAA GAT GTT AAA CAA TAT GAT ATT TCT  540
541    AAG CCA CAT GAC ACT ACC ACT AAG GGT CAT GAG ACT CAG GGG GGG  585
586    ACG ACG GCT GCA TGA GGC CCC GCG GGC C-- --- --- --- --- ---  630

```

**Figure 52 : Séquence codante de l'oléosine S4 après digestion du plasmide pYEG1-S4 (ATG = méthionine et TGA = codon stop).**

Après transformation de la levure avec ce plasmide, la présence du gène codant les oléosines a été vérifiée après l'extraction de l'ADN génomique de levure et PCR par migration sur gel d'agarose (Figure 53 ).



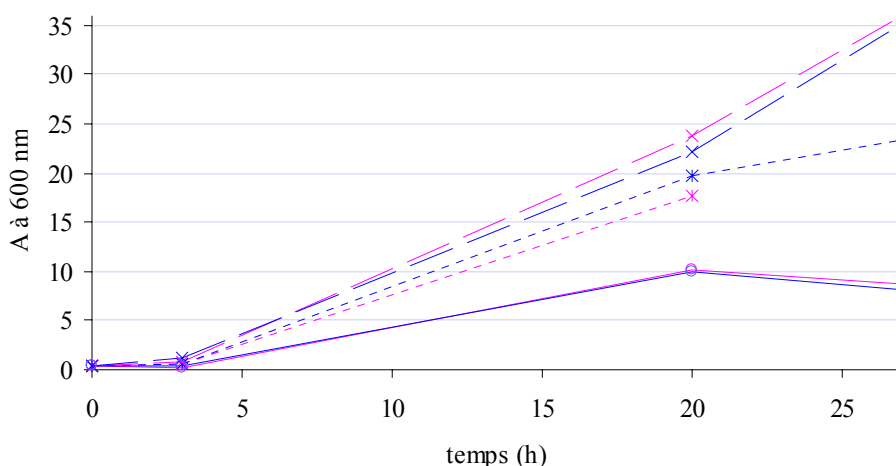
**Figure 53 : Contrôle de la souche d'expression de S4 dans la levure par PCR sur de l'ADN génomique extrait (T : vérification de la PCR sur le plasmide pYEG1 contenant la séquence codant S4).**

La souche de levure Y4 a donc bien intégré la séquence codant l'oléosine S4.

## 5.2.1. Expression des oléosines par la levure

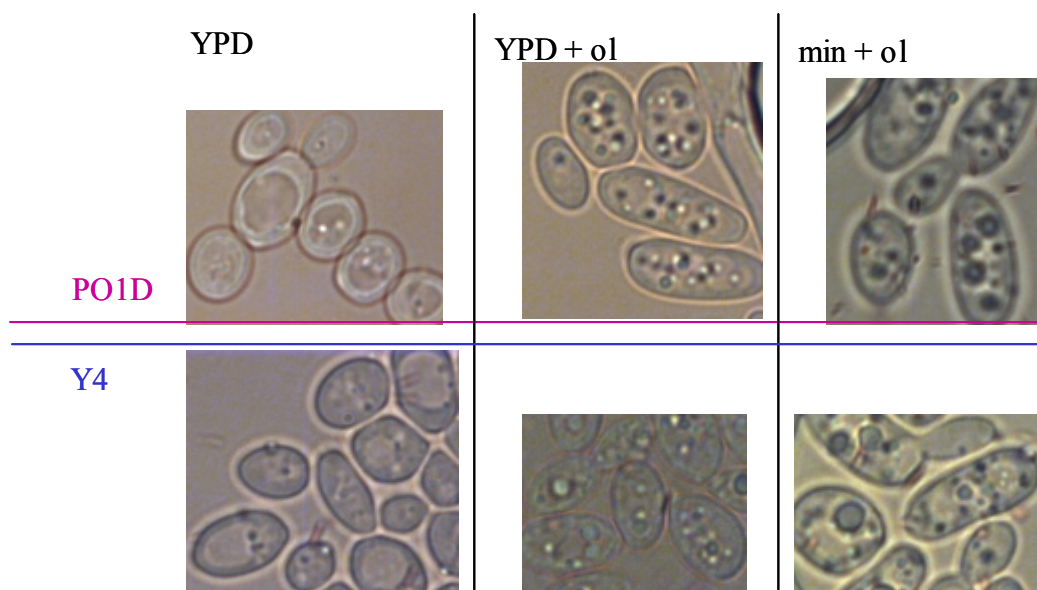
### 5.2.1.1. Culture

L'expression des oléosines par *Y. lipolytica* a été testée dans trois milieux de culture : YPD seul, YPD avec 5 % d'acide oléique et un milieu minimum enrichi à 5 % d'acide oléique. Le témoin est la souche PO1D Leu-, Ura- non transformée avec le plasmide pYEG1.



**Figure 54 : Cultures de *Y. lipolytica* sauvage (PO1D, en rose) et exprimant l'oléosine S4 (Y4, en bleu) dans 5 mL de milieu YPD (---), YPD + 5 % d'acide oléique (-.) et milieu minimum + 5 % d'acide oléique (—) en tubes en verre.**

La meilleure croissance est obtenue avec le milieu de culture le plus riche, glucidique et lipidique et le moins bon taux de croissance sur le milieu minimum. Les souches sont toutes viables et la présence du gène d'expression des oléosines ne modifie pas la croissance des souches de *Y. lipolytica* (Figure 54). Par microscopie optique, nous voyons que les morphologies des deux souches sont identiques sur un même milieu de culture, avec apparition de petits globules lipidiques dans les cellules cultivées en présence d'acide oléique (Figure 55).

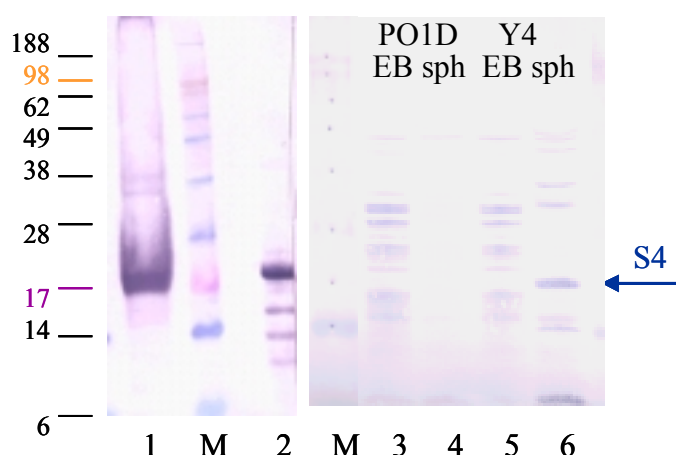


**Figure 55 : Photographies de microscopie (x 100) de levures *Y. lipolytica* cultivées pendant 20 h sur différents milieux (ol = acide oléique).**

### 5.2.1.2. Caractérisation immunochimique

Lorsque les cellules Y4 ont été lysées avec des billes de verre, nous n'avons pas pu mettre en évidence, par électrophorèse sur gel coloré au bleu de Coomassie ou par Western blot avec les anticorps anti-rS4, la présence d'oléosines S4 dans l'extrait total.

Après isolement de leurs corps lipidiques, 1  $\mu$ L d'extrait brut de levure et 250  $\mu$ L de corps lipidiques isolés délipidés à l'éther ont été déposés sur gel d'électrophorèse. Tous les échantillons ont été précipités au TCA avant dépôt (sauf pour le témoin positif rS4, utilisé dans l'urée). La protéine reconnue déposée dans le puits 2 correspond à la rS4 recombinante (22,4 kDa), celle de la piste 1 est une oléosine native de corps lipidiques d'*A. thaliana* isolés, certainement S4 native (21,3 kDa). La différence de hauteur de migration entre rS4 et S4 sur le gel est due à l'ajout des 8 acides aminés lors de l'expression dans la bactérie. Les anticorps reconnaissent aussi une protéine de la même taille que S4 native dans les corps lipidiques de levure génétiquement modifiée (Figure 56, puits 6). Il y a donc bien expression des oléosines par la levure, mais en faible quantité.



**Figure 56 : Western blot sur des corps lipidiques isolés de souches PO1D et Y4. Révélation à l'aide des anticorps anti-rS4. Dépôts : M = marqueur, 1 = graines d'*A. thaliana*, 2 = rS4 pure (0,36  $\mu$ g), 3 et 4 = souche PO1D, 5 et 6 = souche Y4. 3 et 5 = extraits bruts (EB), 4 et 6 = corps lipidiques (sph).**

L'oléosine S4 n'est pas observable dans les extraits bruts du fait de sa présence minoritaire par rapport aux protéines totales. L'isolement des corps lipidiques constitue une phase d'enrichissement en oléosines d'où leur visualisation par western blot dans ces extraits. Les oléosines sont donc dirigées vers les corps lipidiques de la levure *Y. lipolytica*, en faible quantité.

Des résultats similaires avaient été obtenus chez une levure qui stocke peu de lipides, *Saccharomyces cerevisiae*, par Ting *et al.* (1997) puis Beaudoin (1999). En 1997, Ting *et al.*

ont exprimé une oléosine de maïs dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'oléosine s'accumule de façon concomitante aux corps lipidiques lors de la croissance des levures recombinantes. L'oléosine est restreinte aux corps lipidiques, plus précisément à leur périphérie (techniques d'immunocytochimie). Sa présence ne modifie pas leur composition lipidique, mais elle remplace certaines protéines liées à l'organite.

### 5.2.1.3. Taille des globules lipidiques

Le diamètre hydrodynamique de corps lipidiques a été déterminé par diffusion de la lumière (Figure 57). Deux populations sont visibles dans la souche sauvage, la plus petite (120 nm) provenant certainement d'une contamination. Le diamètre moyen des globules lipidiques est d'environ 1400 nm pour les deux souches. Ainsi, la présence des oléosines dans les corps lipidiques ne modifie pas de façon significative leur taille. Cette taille est proche de celle d'oléosomes végétaux. Par ailleurs, les mesures qui avaient été réalisées après 20 min de stockage à 20 °C, ont été répétées au bout de 9 h, il y a alors peu d'évolution des tailles des globules au cours du temps. Ils semblent donc stables.

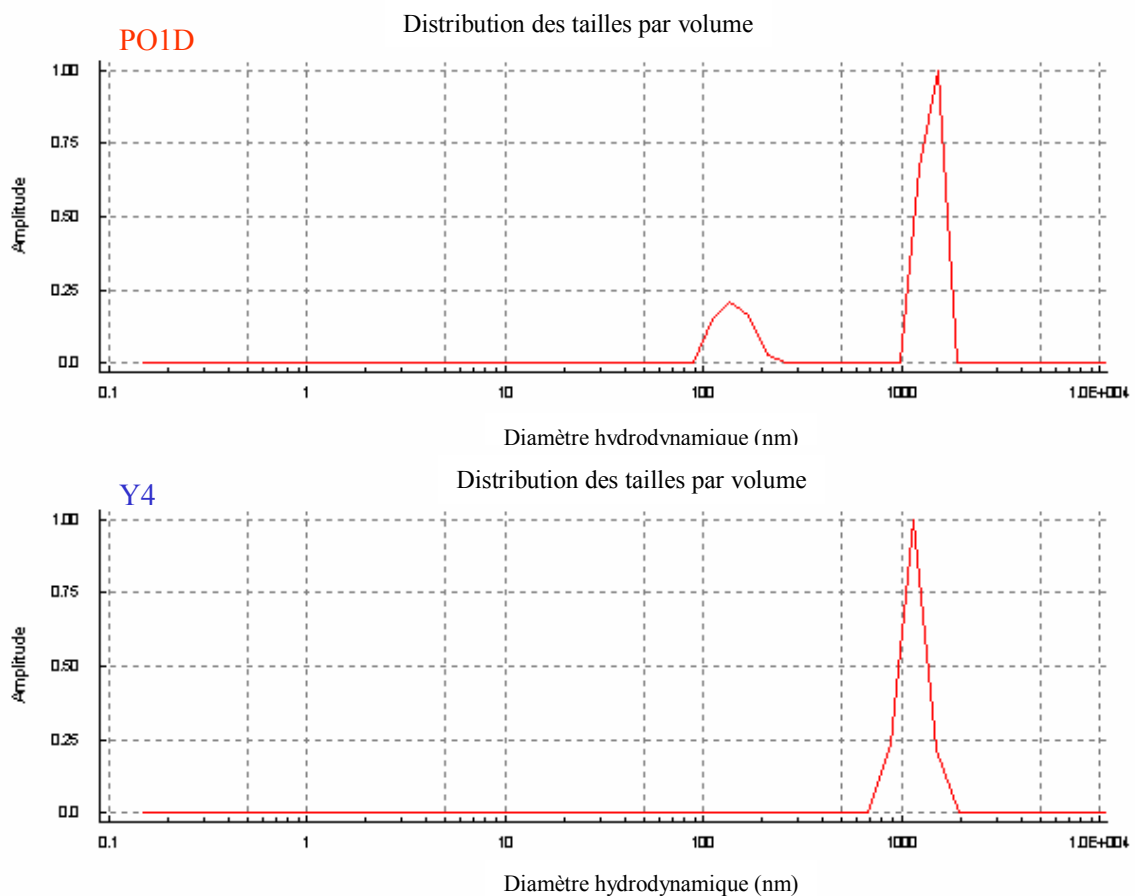


Figure 57 : Mesure des diamètres hydrodynamiques des globules lipidiques des souches Y4 et PO1D à 20 °C.

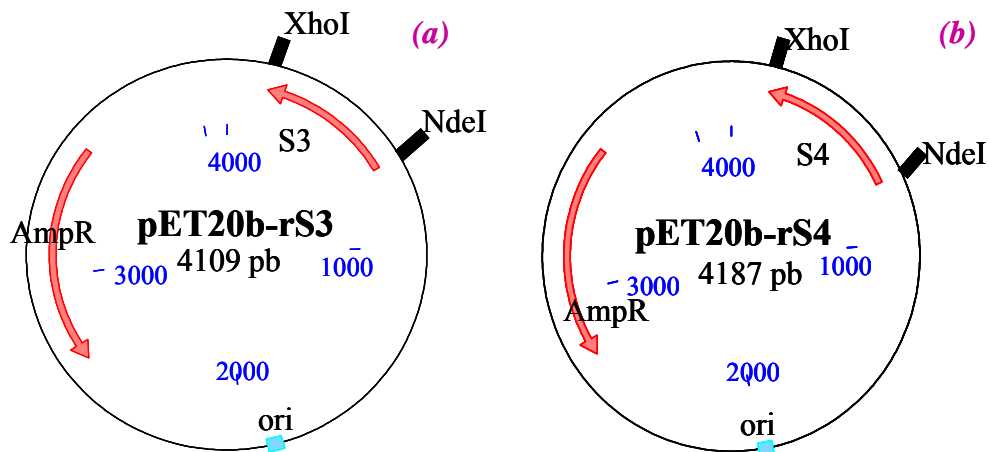
#### 5.2.1.4. Conclusion

Le génôme de *Y. lipolytica* étant disponible depuis peu de temps, il n'existe pas encore de marqueurs spécifiques des globules lipidiques. De plus, les anticorps réagissant avec des protéines du corps lipidique de *S. cerevisiae*, tel que l'Erg6 (méthyltransférase stérol  $\Delta^{24}$ , Athenstaedt *et al.*, 1999) ne réagissent pas avec les protéines des corps lipidiques de *Y. lipolytica* (2.3.8). En attendant le développement de marqueurs spécifiques, les oléosines S4 qui sont dirigées spécifiquement vers le corps lipidique pourraient donc nous servir de marqueurs des globules lipidiques dans des souches de *Y. lipolytica* génétiquement modifiées par introduction de S4. En effet, nous avons vu que la transformation des levures avec ce gène n'affectait pas leur croissance. La production des oléosines dans la levure restant faible, nous avons utilisé un autre organisme pour exprimer et purifier des oléosines recombinantes.

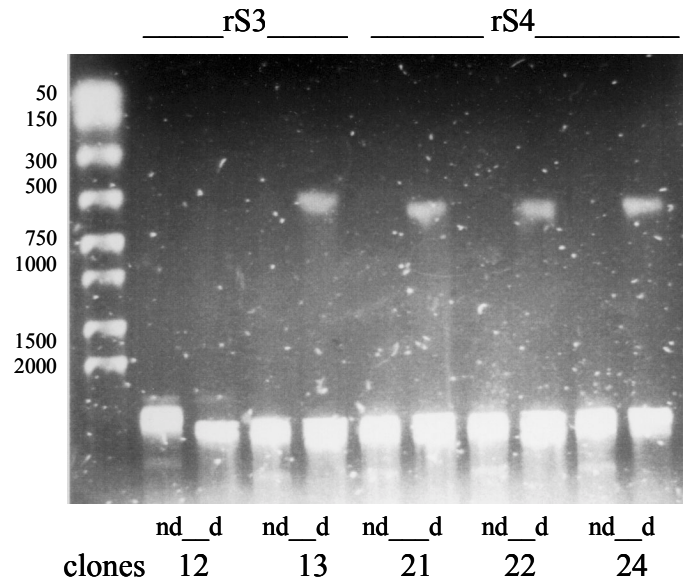
### 5.3. Production d'oléosines par *E. coli*

#### 5.3.1. Clonage des oléosines dans *E. coli*

Les plasmides d'expression ont été construits selon les modèles présentés sur la Figure 58, avec ajout d'une queue poly-histidine à l'extrémité C-terminale des protéines d'*A. thaliana*.



L'insertion du gène codant les oléosines a été vérifiée par dépôt sur gel d'agarose (Figure 59) après extraction et digestion des plasmides par les enzymes de restriction *XhoI* et *NdeI*. Les plasmides non digérés n'ont pas migré. Les plasmides digérés présentent bien deux bandes visibles sur le gel : le plasmide vide qui a peu migré et l'insert de 500 paires de bases pour rS3 et 600 paires de bases pour rS4.



**Figure 59 : Dépôt des plasmides pET20b transformés avec rS3 et rS4 et re-digérés avec les enzymes NdeI et XhoI sur gel d'agarose (d : digérés, nd : non digérés).**

Le plasmide 12 a été écarté, il ne présente pas d'insert de la taille attendue. Tous les autres plasmides, 13 pour l'oléosine S3 et 21, 22 et 24 pour S4, présentent bien un insert de bonne taille. De plus, les inserts ont été vérifiés après digestion des plasmides. Les séquences correspondent bien à celles de S3 et S4 avec l'ajout de la queue L E R H H H H H à l'extrémité C-terminale (Figure 60). Les quelques différences observées par rapport à la banque (Figure 47) proviennent de l'ADNc utilisé. Nous avons décidé de garder les clones 13 pour exprimer rS3 et 22 pour rS4.

rS4 :

```

1      ATG GCG GAT ACA CAC CGT GTC GAC CGT ACT GAT AGA CAC TTT CAA 45
1      M  A  D  T  H  R  V  D  R  T  D  R  H  F  Q 15
46     TTT CAG TCG CCC TAT GAA GGC GGC CGA GGT CAA GGT CAG TAT GAA 90
16     F  Q  S  P  Y  E  G  G  R  G  Q  G  Q  Y  E 30
91     GGT GAC CGT GGT TAC GGT GGT GGC GGT TAC AAG AGC ATG ATG CCT 135
31     G  D  R  G  Y  G  G  G  G  Y  K  S  M  M  P 45
136    GAA AGT GGC CCA TCT AGT ACC CAA GTA TTG TCC CTG TTG ATT GGA 180
46     E  S  G  P  S  S  T  Q  V  L  S  L  L  I  G 60
181    GTC CCT GTC GTC GGT TCG CTA CTT GCC TTG GCT GGA TTA CTT CTA 225
61     V  P  V  V  G  S  L  L  A  L  A  G  L  L  L 75
226    GCT GGT TCG GTG ATC GGC TTA ATG GTT GCT TTA CCA CTA TTT CTC 270
76     A  G  S  V  I  G  L  M  V  A  L  P  L  F  L 90
271    CTC TTC AGC CCG GTT ATA GTC CCA GCG GCT CTA ACT ATC GGG CTT 315
91     L  F  S  P  V  I  V  P  A  A  L  T  I  G  L 105
316    GCA ATG ACA GGC TTT TTA GCC TCG GGG ATG TTC GGT CTA ACC GGG 360
106    A  M  T  G  F  L  A  S  G  M  F  G  L  T  G 120
361    CTT AGC TCA ATC TCA TGG GTC ATG AAC TAT CTT CGT GGG ACA AGG 405
121    L  S  S  I  S  W  V  M  N  Y  L  R  G  T  R 135
406    AGA ACT GTG CCT GAG CAA TTG GAG TAT GCT AAG AGG AGA ATG GCT 450
136    R  T  V  P  E  Q  L  E  Y  A  K  R  R  M  A 150
451    GAT GCG GTT GGC TAC GCA GGA CAA AAG GGC AAA GAA ATG GGC CAG 495
151    D  A  V  G  Y  A  G  Q  K  G  K  E  M  G  Q 165
496    CAT GTG CAG AAC AAG GCC CAA GAT GTT AAA CAA TAT GAT ATT TCT 540
166    H  V  Q  N  K  A  Q  D  V  K  Q  Y  D  I  S 180
541    AAG CCA CAT GAC ACT ACC ACT AAG GGT CAT GAA ACT CAG GGG GGG 585
181    K  P  H  D  T  T  T  K  G  H  E  T  Q  G  G 195
586    ACG ACG GCT GCA CTC GAG CGG CAC CAC CAC CAC TGA --- --- ---
196    T  T  A  A  L  E  R  H  H  H  H  H  *  -  -  -  -

```



		<u>rS3 :</u>															
1		ATG	GCG	GAT	ACA	GCT	AGA	GGA	ACC	CAT	CAC	GAT	ATC	ATC	GGC	AGA	45
1		M	A	D	T	A	R	G	T	H	H	D	I	I	G	R	15
46		GAC	CAG	TAC	CCG	ATG	ATG	GAC	GAC	CGA	GAC	CAG	TAC	CAG	ATG	90	
16		D	Q	Y	P	M	M	G	R	D	R	D	Q	Y	Q	M	30
91		TCC	GGA	CGA	GGA	TCT	GAC	TAC	TCC	AAG	TCT	AGG	CAG	ATT	GCT	AAA	135
31		S	G	R	G	S	D	Y	S	K	S	R	Q	I	A	K	45
136		GCT	GCA	ACT	GCT	GTC	ACA	GCT	GGT	GGT	TCC	CTC	CTT	GTT	CTC	TCC	180
46		A	A	T	A	V	T	A	G	G	S	L	L	V	L	S	60
181		AGC	CTT	ACC	CTT	GTT	GGA	ACT	GTC	ATA	GCT	TTG	ACT	GTT	GCA	ACA	225
61		S	L	T	L	V	G	T	V	I	A	L	T	V	A	T	75
226		CCT	CTG	CTC	GTT	ATC	TTC	AGC	CCA	ATC	CTT	GTC	CCG	GCT	CTC	ATC	270
76		P	L	L	V	I	F	S	P	I	L	V	P	A	L	I	90
271		ACA	GTT	GCA	CTC	CTC	ATC	ACC	GGT	TTT	CTT	TCC	TCT	GGA	GGG	TTT	315
91		T	V	A	L	L	I	T	G	F	L	S	S	G	G	F	105
316		GGC	ATT	GCC	GCT	ATA	ACC	GTT	TTC	TCT	TGG	ATT	TAC	AAG	TAC	GCA	360
106		G	I	A	A	I	T	V	F	S	W	I	Y	K	Y	A	120
361		ACG	GGA	GAG	CAC	CCA	CAG	GGA	TCA	GAC	AAG	TTG	GAC	AGT	GCA	AGG	405
121		T	G	E	H	P	Q	G	S	D	K	L	D	S	A	R	135
406		ATG	AAG	TTG	GGA	AGC	AAA	GCT	CAG	GAT	CTG	AAA	GAC	AGA	GCT	CAG	450
136		M	K	L	G	S	K	A	Q	D	L	K	D	R	A	Q	150
451		TAC	TAC	GGA	CAG	CAA	CAT	ACT	GGT	GGG	GAA	CAT	GAC	CGT	GAC	CGT	495
151		Y	Y	G	Q	Q	H	T	G	G	E	H	D	R	D	R	165
496		ACT	CGT	GGT	GGC	CAG	CAC	ACT	ACT	CTC	GAG	CGG	CAC	CAC	CAC	CAC	540
166		T	R	G	G	Q	H	T	T	L	E	R	H	H	H	H	180
541		CAC	TGA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	546
181		H	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 60 : Séquences nucléotidiques (en rouge) et protéiques (en noir) de rS3 et rS4 clonées dans *E. coli*.

### 5.3.2. Expression des oléosines

Les oléosines comportent la plus longue séquence d'acides aminés hydrophobes connus. Par ces caractéristiques d'hydrophobie uniques, nous pouvions craindre une insertion létale des oléosines dans la bactérie. Néanmoins, les souches transformées se développent correctement, il n'y a pas d'arrêt de la croissance après l'ajout d'IPTG dans le milieu de culture (Figure 61).

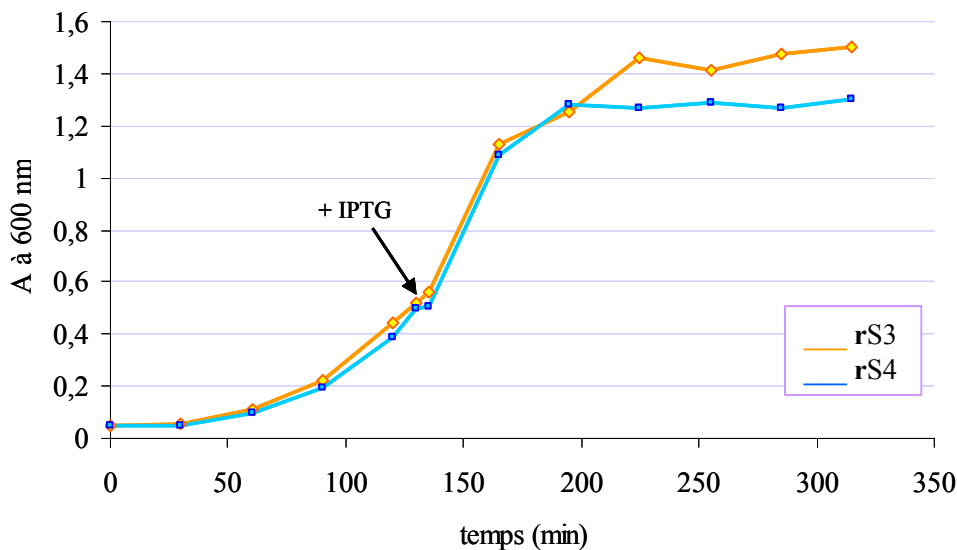
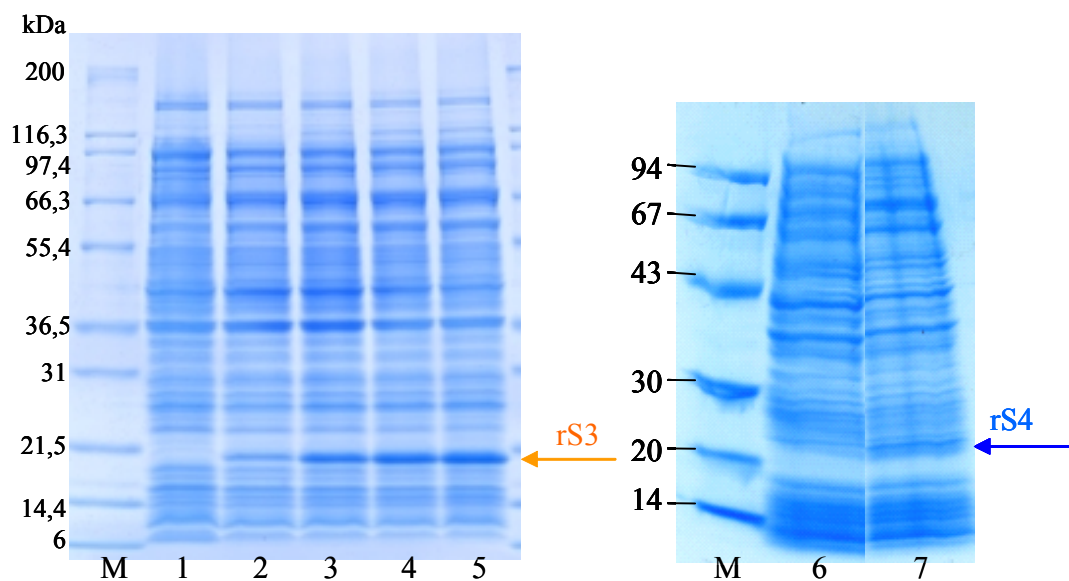


Figure 61 : Suivi par mesure de l' $A_{600\text{ nm}}$  de l'expression des oléosines par *E. coli* en milieu LBamp à 37 °C. Induction de la synthèse des protéines à  $A_{600\text{ nm}} = 0,6$  par ajout d'IPTG 0,1 mM final.

Elles contiennent bien les gènes codant les oléosines (vu grâce au séquençage des plasmides amplifiés dans les cellules JM109, Figure 60), de plus, il y a bien augmentation de l'expression d'une protéine lors de l'induction à l'IPTG et ces protéines ont bien des tailles correspondantes aux oléosines (vu sur gel d'électrophorèse, Figure 62). En effet, les oléosines ne contiennent pas de cystéine et leurs tailles ne sont donc pas réduites par le  $\beta$ -mercaptoéthanol (Lin et Huang, 1984). Bien que nous ayons chauffé nos échantillons protéiques avant de les déposer sur gel d'électrophorèse, nous n'avons pas observé l'agrégation irréversible des oléosines décrite par Beisson *et al.* (2001a) lors du chauffage des oléosines en SDS.

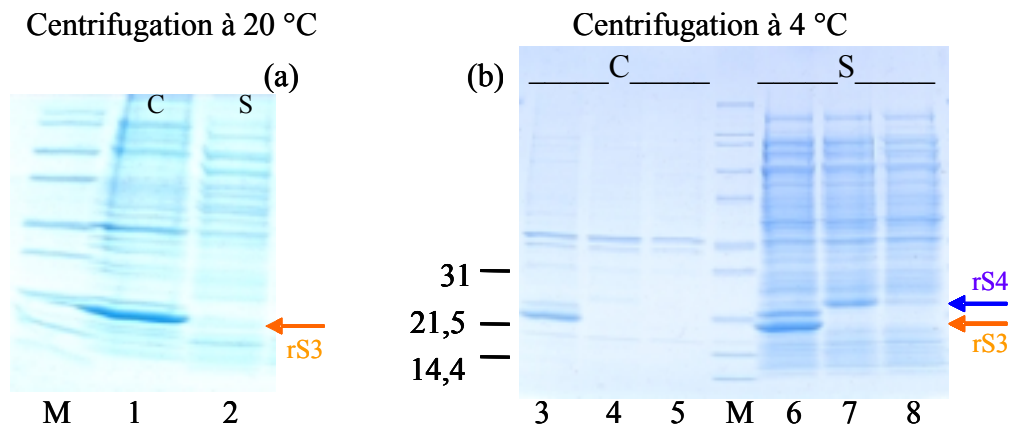


**Figure 62 : Suivi par électrophorèse en condition dénaturante sur gel Tris-glycine 4-20 % de la production de rS3 et rS4 par *E. coli*. Coloration au bleu de Coomassie. De 1 à 5 = rS3 ; 6 et 7 = rS4 ; 1 et 6 = avant induction de la synthèse des oléosines à l'IPTG, 2 = 30 min après le début de l'induction, 3 = 60 min, 4 = 120 min, 5 et 7 = 180 min.**

### 5.3.3. Purification des oléosines exprimées dans *E. coli*

#### 5.3.3.1. Solubilisation des oléosines

Lors de premiers essais, les cellules ont été lysées en milieu natif tel que décrit dans le manuel QIAGEN (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl et 10 mM imidazole, pH ajusté à 8,0). On obtient alors, après centrifugation, un culot contenant les débris cellulaires mais aussi les oléosines (Figure 63 a). Les bactéries cherchent donc soit à intégrer les oléosines dans leurs membranes, mais sans empêcher la croissance bactérienne, soit à se débarrasser des oléosines en formant des corps d'inclusion.



**Figure 63 :** Gels d'électrophorèses : (a) culture d'*E. coli* exprimant les rS3, après centrifugation 9000 x g pendant 20 min à 20 °C en urée 8M. M = marqueur de taille, puits 1 = culot ; 2 = surnageant. (b) cultures exprimant rS3 et rS4, après centrifugation à 4 °C en urée 8 M. Puits 3 et 6 = rS3, 4 et 7 = rS4 et 5 et 8 = témoin BL21 transformées avec le plasmide vide ; 3, 4 et 5 = culots et 6, 7 et 8 = surnageants.

De même en milieu dénaturant, 8 M urée à pH 8 ou chlorure de guanidine 6M (Dubnovitsky *et al.*, 2000), les oléosines sont retrouvées dans le culot si les cellules sont centrifugées à 20 °C. En revanche, si la température de centrifugation est abaissée à 4 °C, en milieu dénaturant, la majorité des protéines, dont les oléosines, est solubilisée (Figure 63 b). L'effet de l'urée sur des composés peptidiques polaires diminue lorsque l'on augmente la température (Roseman et Jencks, 1974) et une diminution de température permet de minimiser les interactions hydrophobes. La purification a donc été conduite en conditions dénaturantes, telle que décrite dans le protocole du QIAexpressionist (fourni avec la résine Ni-NTA de QIAGEN) avec une modification de la température appliquée lors de l'étape de centrifugation : à 4 °C au lieu de la température normale préconisée.

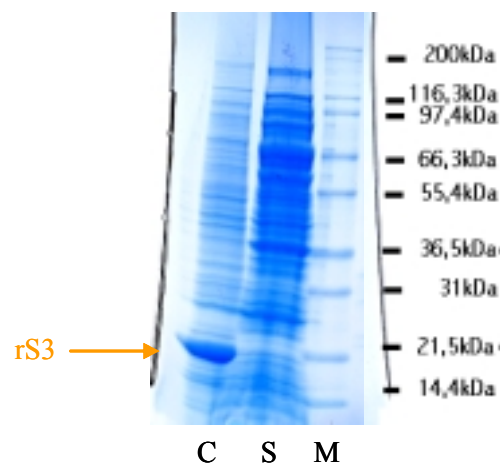
De plus, contrairement au protocole QIAGEN qui indiquait une température normale de laboratoire lors de l'étape préalable de lyse, nous opérons à 30-37 °C pour obtenir un lysat fluide. En effet, en dessous de cette température, les enzymes endogènes n'agissent pas suffisamment vite.

Nous avons donc montré que la température appliquée était essentielle lors de deux étapes de cette purification : la lyse enzymatique des bactéries et la solubilisation des protéines en jouant sur les interactions hydrophobes.

### 5.3.3.2. Établissement des liaisons Ni-His

Plusieurs méthodes peuvent permettre de favoriser l'établissement des liaisons entre les ions métalliques de la résine et les résidus His de la protéine.

- Ainsi, pour éviter les variations de pH des solutions utilisées, du fait de la dissociation de l'urée, elles ont toutes été préparées extemporanément,
- une petite quantité d'éthanol a aussi été ajoutée pour limiter la fixation de contaminants sur la résine (1 mL d'éthanol pour 3 mL de résine),
- de même, 10 mM d'imidazole dans la solution de fixation peuvent permettre de limiter la fixation de contaminants sur la résine.
- D'après le manuel de QIAGEN, 1 mL de résine peut fixer 5 à 10 mg de protéines en conditions dénaturantes. Mais, du fait des problèmes de fixation que nous avons rencontrés, des quantités de résine beaucoup plus importantes ont été nécessaires.
- D'après Higgins et Linton (2001), l' $\alpha$ -dodécyl-D-maltoside ( $\alpha$ -DDM) est un détergent efficace pour solubiliser les protéines membranaires. Des essais sur les oléosines n'ont donné aucune solubilisation. En revanche, par lavage des cellules lysés en  $\alpha$ -DDM, on obtient une bonne solubilisation des autres protéines et donc des culots très purs contenant les oléosines sous forme de corps d'inclusion (Figure 64).



**Figure 64 : Lavage de bactéries recombinantes lysées avec un tampon Tris à 1 % d' $\alpha$ -DDM. Centrifugation à 9000 x g pendant 30 min à 4 °C. Dépôt sur gel Tris-glycine de 15  $\mu$ L du surnageant (S) et de 15  $\mu$ L du culot (C) repris dans du tampon Tris.**

### 5.3.3.3. Purification des oléosines avec 3 cycles de fixation

Afin de limiter les pertes d'oléosines non fixées, des alternances de cycles de fixation et de lavage de la résine ont été réalisés. On procède alors de la manière suivante : le lysat est mis en contact une première fois avec la résine pendant 1 h, puis le surnageant, appelé premier flot  $n$  est mis de côté. Le culot de résine est lavé 3 fois par la solution D. Lorsque l' $A_{280\text{ nm}}$  de la solution de lavage est nulle, le flot  $n$  est remis en contact pendant 1 h avec la résine lavée et un flot  $n+1$  non fixé est obtenu après centrifugation. De nouveau, la résine est lavée. Un

dernier contact d'1 h entre la résine et le flot  $n+1$  a lieu. Le surnageant de centrifugation est enfin éliminé (seule une fraction aliquote est gardée pour électrophorèse). On obtient alors le profil de la Figure 65.

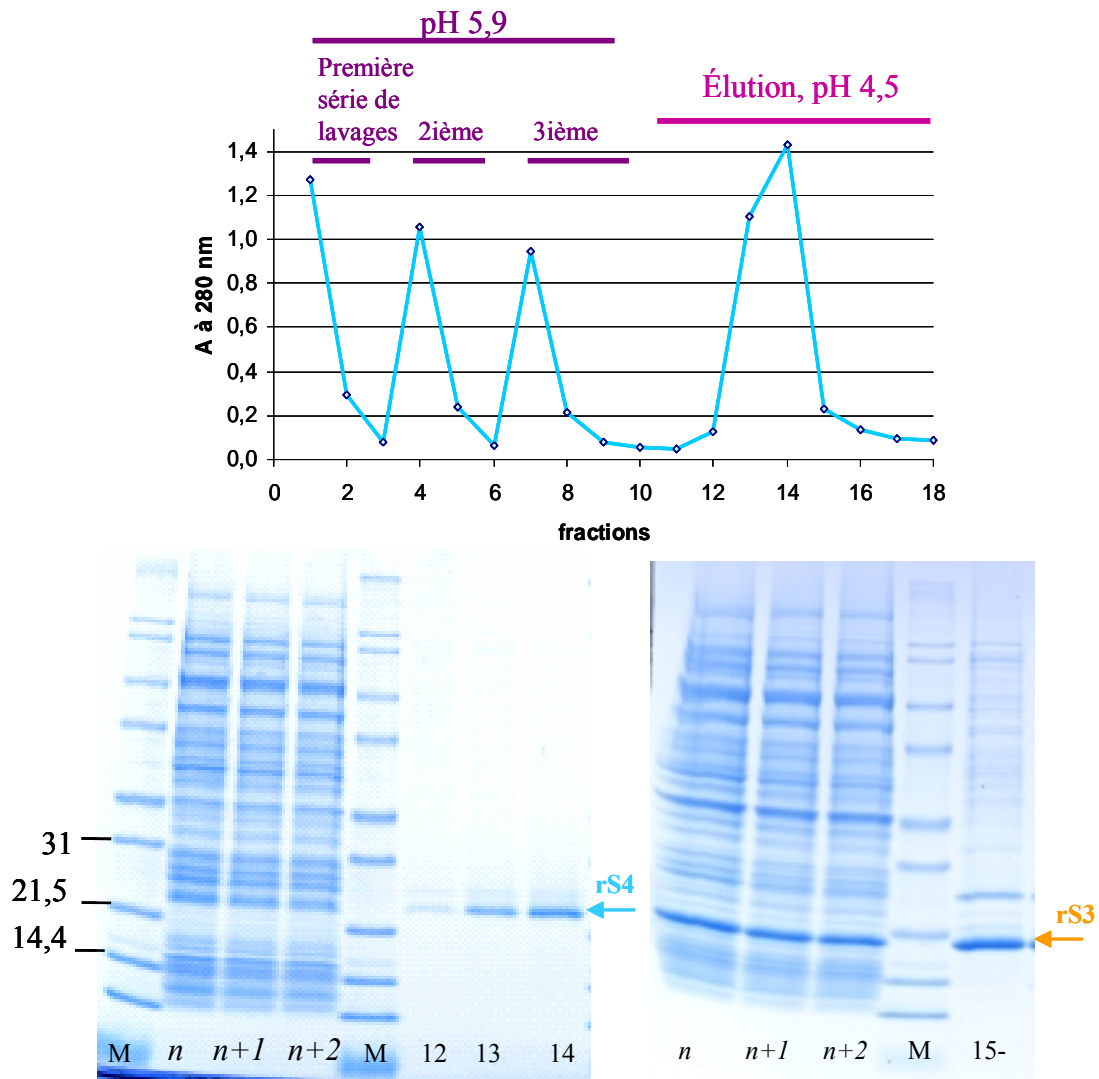


Figure 65 : Suivi par mesure de l' $A_{280\text{ nm}}$  de la purification de rS4 (et rS3, courbe non montrée ici) en condition dénaturante (les fractions de solution D pH 5,9 sont de 12 mL et celles de solution E pH 4,5 de 0,5 mL) et par électrophorèses en milieu dénaturant sur gel Tris-glycine 4-20 %, coloration au bleu de Coomassie ( $n, n+1, n+2$  : fractions résiduelles non fixées sur la résine ; 12-, 13-, 14-, 15- : fractions éluées).

La purification a été effectuée sur 120 mL de culture, avec 1,5 mL de résine.

Au final, 2 mg d'oléosines ont été récupérés à l'homogénéité (pureté supérieure à 90 % pour rS4 et supérieure à 80 % pour rS3). Le rendement est proche de 20 mg d'oléosines / L de culture. Les quantités d'oléosines pures ont été estimées par mesure directe de l'absorbance de l'échantillon à 280 nm. En effet, la méthode de Bradford (1976) n'est pas utilisable du fait des interférences dues à l'urée à la longueur d'onde utilisée (595 nm). Une méthode de dosage alternative est la méthode de Lowry, développée dans le paragraphe 2.3.8.1.

#### 5.3.3.4. Purification en présence d'imidazole

L'élution des protéines en gradient d'imidazole et conditions dénaturantes a été testée. Ainsi, l'échantillon a été lysé dans une solution B enrichie à 10 mM d'imidazole, lavé dans une solution D à 20 mM d'imidazole, puis les oléosines ont été éluées par une solution d'élution E à 250 mM d'imidazole. On obtient alors un profil d'élution en forme de colline (Figure 66). La quantité d'oléosines récupérée est élevée (2 mg au total), mais les échantillons sont moins concentrés en protéines et ils contiennent 250 mM d'imidazole, ce qui peut être gênant pour un usage ultérieur.

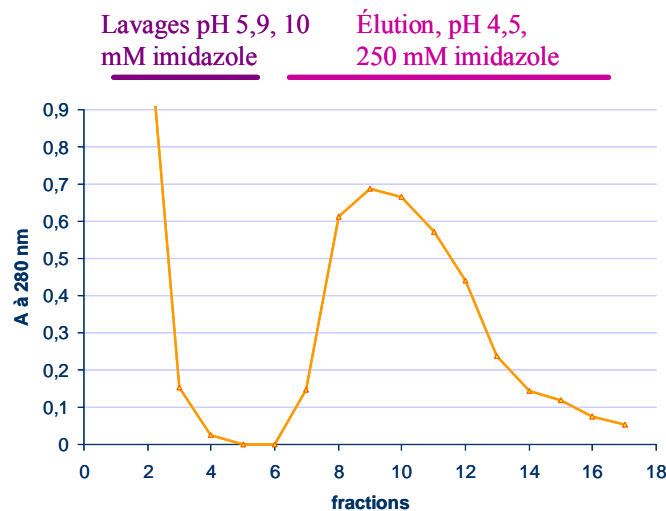


Figure 66 : Suivi par mesure de  $A_{280 \text{ nm}}$  de la purification de rS3 en condition dénaturante et en gradient d'imidazole. Les fractions à pH 5,9 sont de 20 mL, celles à pH 4,5 de 0,5 mL. La purification a été effectuée à partir d'une culture de 200 mL avec 1,5 mL de résine.

Pour conserver les avantages de l'imidazole (moins de fixation de protéines contaminantes et plus de protéines désorbées de la colonne), tout en limitant l'inconvénient d'une forte teneur en imidazole dans les échantillons purifiés, nous avons ajouté une faible concentration (10 mM) d'imidazole à toutes les solutions tout en conservant les conditions dénaturantes de QIAGEN (urée 8 M avec élution selon un gradient de pH). Ce protocole permet, en un seul temps de contact, une relativement bonne fixation des oléosines sur la résine. Mais la désorption des protéines traîne sur plusieurs fractions (non montré ici).

#### 5.3.3.5. Conclusions sur la purification

L'étape limitante de la purification était l'étape de fixation de la protéine sur la résine. Ceci provient certainement à la fois du milieu dénaturant et de la conformation de la protéine recombinante et, du fait du grand nombre de facteurs à prendre en compte, les résultats

obtenus sur du matériel vivant sont très variables. Le taux d'expression des protéines dans la bactérie peut ainsi changer d'une culture à une autre. De même, la lyse et la solubilisation des oléosines varient. Les rendements de purification sont donc variables d'une fois à l'autre. Néanmoins, nous avons pu développer deux protocoles de purification efficaces des oléosines. Le premier protocole permet d'améliorer les rendements de purification, tout en s'affranchissant d'imidazole dans le milieu. On voit ainsi par la mesure de l'absorbance à 280 nm et sur le gel d'électrophorèse de la Figure 65, une diminution du taux de protéines présentes dans le liquide de lavage et donc une nouvelle fixation de protéines « His-tagged » sur la résine. Ce protocole a pour principal inconvénient d'être relativement long.

Les oléosines pures sont ensuite conservées dans la solution E (urée 8 M, pH 4,5), à -20 °C. En effet, en solution basique, l'urée se transforme en cyanate d'ammonium. A pH acide, il n'y a pas d'altérations des protéines en présence de cyanate, contrairement à des pH basiques ou neutre où il y a apparition de nouvelles bandes électrophorétiques traduisant la carbamylation de la protéine (Landry, 1979).

Une nouvelle amélioration du protocole a depuis été apportée au laboratoire. Elle consiste à lyser les bactéries en tampon natif puis à laver les corps d'inclusion avec un tampon contenant 1 % d' $\alpha$ -DDM. Les oléosines se retrouvent alors dans un culot très épuré. Elles sont ensuite resolubilisées dans la solution B (urée 8 M, pH 8) de lyse du protocole précédent, pour procéder à la suite de la purification. La purification mise au point peut maintenant être adaptée à une autre échelle pour permettre de récupérer de grande quantité de protéines (Schäfer *et al.*, 2000).

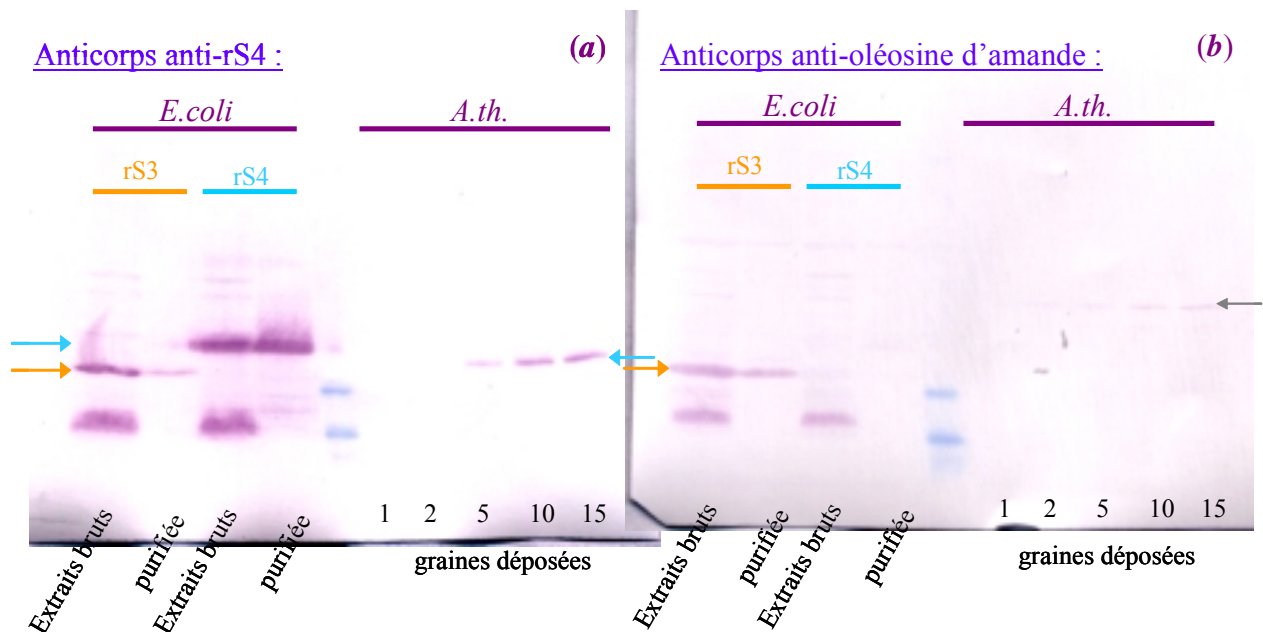
#### **5.3.3.6. Immuno-reconnaissance des oléosines**

Une dernière preuve confirmant que les protéines que nous avons purifiées sont des oléosines est apporté par des expériences d'immunochimie.

Des anticorps anti-rS4 ont été produits chez un lapin à partir des protéines exprimées dans *E. coli*, purifiées par chromatographie d'affinité au nickel. Le sérum pré-immun est bien vierge d'anticorps réagissant avec les oléosines (membrane non montrée ici) et les anticorps synthétisés reconnaissent aussi des protéines de tailles comparables aux oléosines dans des broyats de graines d'*A. thaliana* (Figure 67 a).

De plus, on voit sur la Figure 67 b que les anticorps anti-oléosine d'amande (protéine de 16 kDa) reconnaissent rS3, mais pas rS4. Les anticorps anti-rS4 reconnaissent eux plus fortement rS4 que rS3. Ceci pourrait être dû à la séparation des oléosines en deux groupes antigéniques : les oléosines de haute masse moléculaire, auxquelles appartient rS4 et celles de

basses masses moléculaires, dont rS3 et l'oléosine d'amande. Ceci a été décrit par Tzen *et al.* (1990) puis repris par Tai *et al.* (2002). Ainsi les parties antigéniques des oléosines seraient certainement situées sur les extrémités N- et C- terminales des protéines, et non dans le segment central hydrophobe, très conservé au sein de toutes les espèces et entre toutes les isoformes d'une même espèce (Pons *et al.*, 2002).

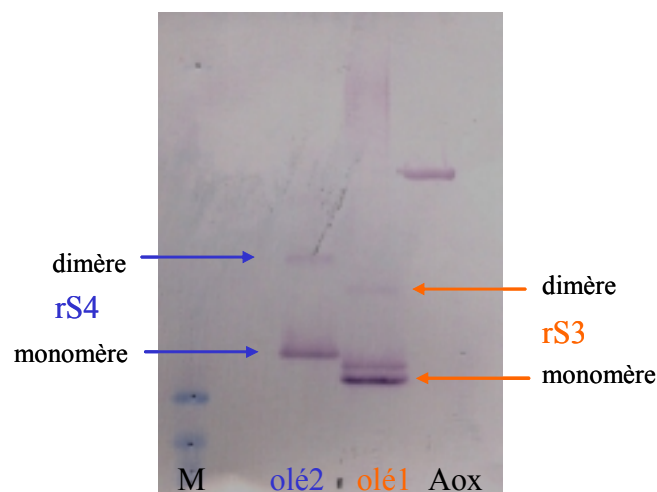


**Figure 67 : Révélation immunochimique d'oléosines dans des graines d'*A. thaliana* et dans des bactéries recombinantes à l'aide d'anticorps anti-rS4 et d'amande.**

Dans les graines d'*A. thaliana*, seule une bande protéique est reconnue par les anticorps anti-rS4. Cette protéine semble, sur le gel, avoir une taille intermédiaire entre rS3 et rS4. Néanmoins, rS4 comporte, en plus de la protéine native S4, une queue de 5 histidine et 3 acides aminés supplémentaires sur lesquels s'accroche cette queue. L'oléosine recombinante est donc plus grande que la native correspondante d'environ 1,1 kDa (Tableau 15). La protéine reconnue par l'anticorps dans les graines est donc certainement S4. L'anticorps a une spécificité très forte pour cette isoforme, les isoformes S1, S2 et S3 étant aussi présentes dans la graine, mais non reconnues (3.2.1). En revanche, la membrane contenant des extraits de graine d'*A. thaliana* et incubée avec des anticorps anti-oléosine d'amande n'a pas été révélée assez longtemps pour permettre de visualiser des oléosines de BMM, seul ce qui pourrait être un polymère d'oléosines est légèrement visible.

Les oléosines purifiées en urée 8 M sont présentes sous forme de monomères mais aussi sous forme de dimères, même après électrophorèse en conditions dénaturantes (Figure 68). Ceci avait déjà été suggéré par Tzen *et al.* (1990).





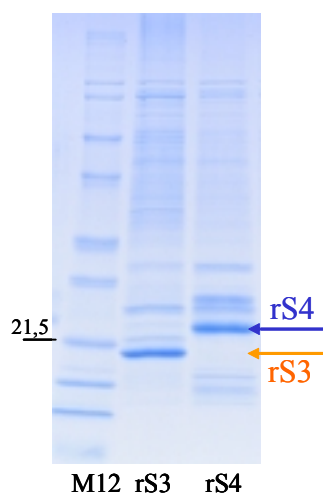
**Figure 68 : Révélation immunochimique d'oléosines recombinantes purifiées à l'aide d'anticorps anti-penta-histidine après électrophorèse SDS-PAGE. La colonne de droite (Acyl-coA-oxydase 2P, environ 80 kDa) est un témoin positif de protéine his-tagged.**

Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'existence d'oligomères d'oléosines, résistants au SDS, utilisé pour l'électrophorèse. La présence de motifs « leucine zipper », trouvés dans la séquence primaire de la protéine, pourrait permettre ces formations. Néanmoins, comme nous l'avons vu dans le chapitre 5.1.4, seule l'oléosine S3 comporte des séquences potentielles de « leucine-zipper », alors que S1, S2 et S4 en sont dépourvues. Nous avons vu sur la Figure 68 que S3 et S4 pouvaient former des dimères. Il existe donc d'autres modes d'association des oléosines entre elles. Une seconde explication serait la présence de motifs glycine répétés GxxxG (Senes *et al.*, 2000) ou plus généralement Zxxx(xxx)Z avec Z qui est un résidu glycine, alanine ou sérine (Liu *et al.*, 2002), nous trouvons cinq motifs de ce type dans la séquence protéique de S3 (respectivement neuf motifs dans S4). Enfin, il peut s'agir d'autres types d'interactions hydrophobes.

## **5.4. Étude du comportement des oléosines en solution**

### **5.4.1. Précipitation**

Les oléosines sont entièrement précipitées en présence d'acétone glacial 100 % (Figure 69) ou de TCA 20 % (non montré ici). Une précipitation des oléosines nous permet d'éliminer une partie de l'urée présente dans la solution d'élution de la protéine.



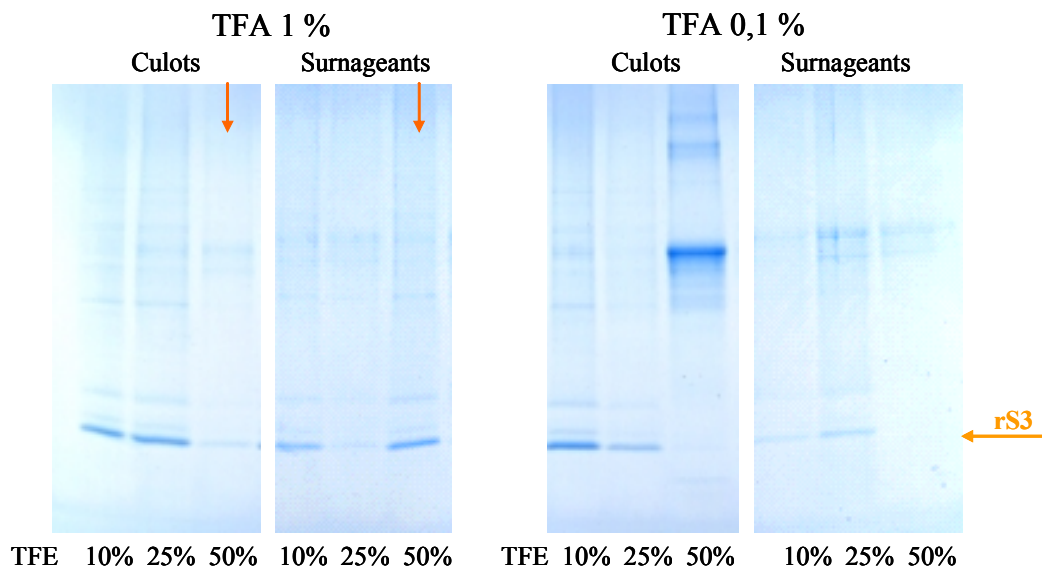
**Figure 69 : Précipitation à l'acétone de 10 µg de rS3 et de rS4. Reprise des culots secs avec 15 µL de tampon SDS puis électrophorèse sur gel Tris-glycine 4-20 % et coloration au bleu de Coomassie.**

Ainsi, lors de la première centrifugation de l'acétone glaciale et des oléosines, un gros culot blanc est obtenu, contenant probablement une forte concentration en urée. En revanche, après la deuxième centrifugation (acétone 90 %), seul un fin culot protéique est visible au fond des tubes. Il ne reste pratiquement plus d'urée qui s'est résolubilisée dans l'acétone 90 %.

## **5.4.2. Solubilisation des oléosines**

### **5.4.2.1. En TFA / TFE**

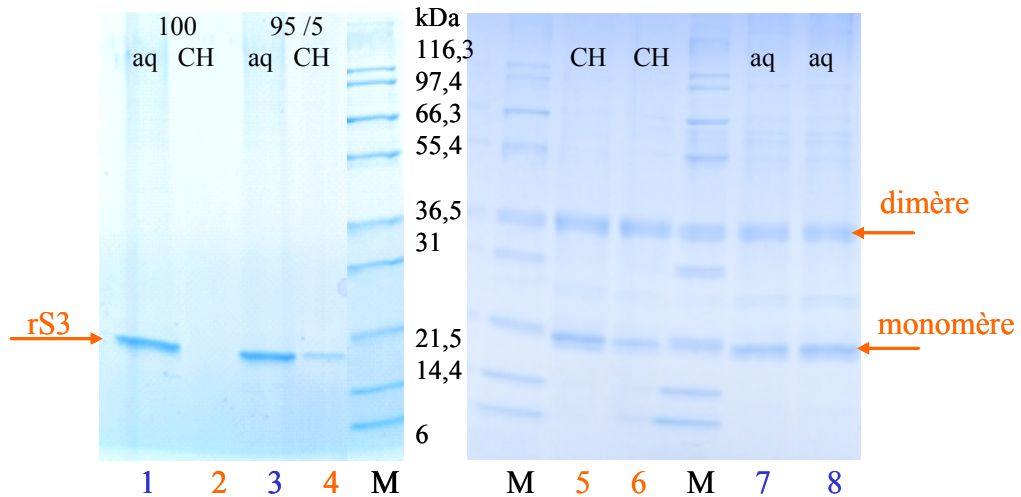
Les oléosines ayant été précipitées, il est intéressant de trouver de nouveaux solvants pour les reprendre en solution. Un premier solvant testé est un mélange TFA / TFE. Ce solvant est utilisé pour des protéines membranaires. Il présente l'intérêt de pouvoir être utilisé pour certaines mesures, interdites en présence d'urée, dont le DC à condition de ne pas faire les mesures en dessous de 200 nm (chapitre 5.5.1).



**Figure 70 :** Essais de resolubilisation des oléosines dans un mélange TFA / TFE après précipitation à l'acétone. 10 µg de rS3 ont été repris dans 20 µL de TFA / TFE, vortexés puis laissés la nuit à 4 °C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 15000 x g, 4 °C, 5 min et repris dans du tampon d'électrophorèse. Seul le mélange à 1 % de TFA et 50 % de TFE resolubilise les oléosines S3 recombinantes en quasi-totalité (Figure 70). Il en est de même pour S4 recombinante. Après une précipitation à l'acétone, c'est le seul moyen que nous ayons de remettre les oléosines en solution. Le TFA peut éventuellement être remplacé par de l'acide formique, mais il faut dans ce cas en mettre dix fois plus (10 % d'acide formique à la place de 1 % de TFA, non montré ici).

#### 5.4.2.2. Dans du chloroforme

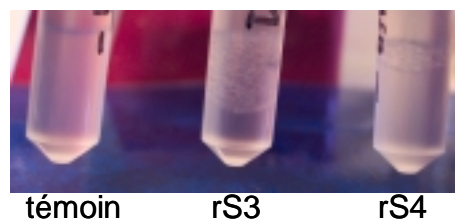
Des oléosines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5 ont été mises en contact avec un mélange chloroforme / méthanol (95 / 5, tel que préconisé par Beisson *et al.*, 2001b), à température élevée, pour favoriser les interactions hydrophobes. Après centrifugation, on obtient une répartition des oléosines entre la phase aqueuse et la phase organique (Figure 71). Pour améliorer le passage des oléosines du tampon urée vers le solvant organique, outre la température élevée, nous avons essayé de diluer la phase aqueuse par trois volumes d'eau, ce qui permet d'obtenir une concentration de 2 M urée. Une telle concentration en urée ne doit pas permettre la solubilisation des oléosines à 50 °C et devrait donc permettre de les exclure de la phase aqueuse. Néanmoins le résultat n'est pas significativement amélioré par cette méthode.



**Figure 71 : Solubilisation d'oléosines dans du chloroforme / méthanol. M = marqueur, 1 et 2 = 100 % de chloroforme, 3 et 4 = 95 % chloroforme / 5 % méthanol, 1, 3, 7 et 8 = phases supérieures aqueuses, 2, 4, 5 et 6 = phases inférieures organiques.**

Il est visible d'après cette Figure 71, que rS3 n'est pas soluble dans du chloroforme 100 % (puits 1 et 2). En revanche, lorsqu'un mélange chloroforme / méthanol (95 / 5) est utilisé, les résultats sont plus contrastés : une partie des oléosines va passer dans la phase organique alors que le reste sera toujours en phase aqueuse. Certaines fois (gels non montrés ici), nous avons même obtenu 100 % de protéines solubilisées dans le chloroforme. Nous ne savons pas expliquer ces variations expérimentales. Nous pouvons uniquement conclure que nous avons de la protéine en solution dans le chloroforme, mais sans en connaître précisément la quantité d'une fois sur l'autre. Par ailleurs, les oléosines solubilisées dans le chloroforme, solvant hydrophobe, sont présentes sous forme de monomères, mais aussi parfois de dimères.

Nous récupérons non seulement la phase organique inférieure, mais aussi l'interface à laquelle reste toujours associée un peu de phase aqueuse résiduelle. Les oléosines en solution dans le mélange chloroforme / méthanol ne forment donc pas un milieu homogène. Les échantillons ont l'aspect suivant après avoir été secoués (Figure 72) : le témoin (urée) est homogène et translucide alors que les tubes contenant rS3 et rS4 présente une partie supérieure sous forme de gouttelettes émulsionnées.



**Figure 72 : Oléosines en solution dans du chloroforme.**

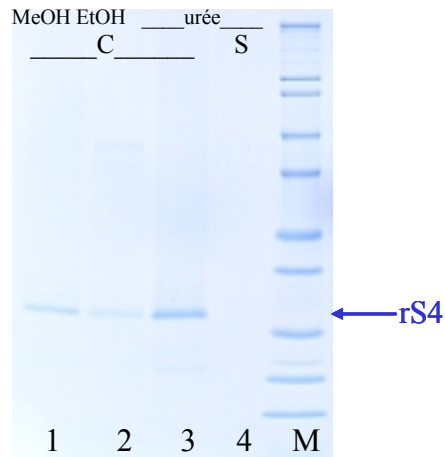
Les oléosines ont donc tendance à stabiliser des émulsions chloroforme / eau. En effet, les oléosines sont des protéines interfaciales et le meilleur moyen de les obtenir est certainement de les rechercher à une interface.

#### **5.4.2.3. En urée**

L'urée à des concentrations inférieures à 8 M ne permet pas de solubiliser convenablement les oléosines. Ainsi, des corps d'inclusion d'oléosines lavés dans un tampon contenant 1 % d' $\alpha$ -DDM ont été repris dans des solutions d'urée de molarités variables (S. D'Andrea, UMR Chimie Biologique, INRA Grignon, communication personnelle). En présence de 8 M d'urée, 70 % de rS3 (respectivement 80 % de rS4) sont resolubilisées. A 6 M, seules 50 % des rS3 sont reprises en solution (75 % de rS4) puis à 4 M, 20 % des rS3 (30 % des rS4). Ceci est aussi visible sur la Figure 73, où toutes les oléosines précipitent si la solution d'urée est diluée au dixième. Pourtant, Kim *et al.* (2002) expriment dans *E. coli* l'oléosine SM3 d'*A. thaliana* (22 kDa, taille proche de S4), la purifient avec la technologie Ni-NTA en conditions dénaturantes et ils dialysent ensuite l'échantillon purifié contre un tampon phosphate de potassium de pH 7,4. Tous nos essais de passage des oléosines en tampon phosphate, y compris par dialyse, ont été infructueux. De plus, si les oléosines ont été précipitées à l'acétone, on ne peut pas les re-solubiliser dans la solution d'élution E, même à 4 °C.

#### **5.4.2.4. Autres solvants**

- Des concentrations variables en alcools ont pu permettre une solubilisation partielle de rS4. Pour ce faire, 1 volume d'oléosine pure en urée 8 M a été additionné de 200 volumes d'alcool. Après centrifugation, le culot est déposé sur gel Tris-glycine. Le meilleur résultat a été obtenu avec de l'éthanol à 70 % (puits 2, Figure 73).



**Figure 73 : Dilution de 5 µg d'oléosines purifiées en urée 8 M avec de l'eau ou des alcools puis centrifugation. (1) méthanol 70 % culot, (2) éthanol 70 % culot, (3) urée 0,8 M final culot, (4) urée 0,8 M surnageant.**

De telles propriétés ne sont pas exceptionnelles. Ainsi, les protéines du gluten sont séparées selon leur solubilité dans l'alcool.

- Des essais ont été réalisés en mélangeant un volume d'oléosines purifiées en urée avec 10 volumes d'un solvant et 10 volumes d'eau. Après avoir bien vortexé les échantillons, les phases sont séparées par décantation. Les solvants utilisés étaient un mélange dichlorométhane / acétate d'éthyle (50 / 50, v / v) ou de l'acétate d'éthyle 100 % ou un mélange chloroforme / acétate d'éthyle (50 / 50, v / v) ou de l'éther 100 % ou encore du chloroforme pur avec 2 M de NaCl dans la phase aqueuse pour augmenter la force ionique et renforcer les interactions hydrophobes. Aucun de ces essais n'a donné de résultat satisfaisant.
- Des essais de resolubilisation après une précipitation à l'acétone n'ont pas fonctionné avec les solvants suivants : TFA 0,08 % en acétonitrile, eau / acétonitrile / isopropanol (1 / 3 / 6, en volumes) et eau / acétonitrile / isopropanol / TFE (0,8 / 2,4 / 4,8 / 2, en volumes) à 50 °C. Finalement, seul le mélange TFA / TFE (1 % / 50 %) est efficace pour reprendre un culot sec d'oléosines précipitées. Les trois mélanges comportant de l'acétonitrile sont pourtant préconisés pour l'étude de protéines membranaires par CLHP et spectrométrie de masse.

Nous voulions obtenir des protéines solubles dans différents solvants. Parmi les essais que nous avons effectués, nous avons deux méthodes qui nous permettent de solubiliser 100 % d'oléosines : l'urée 8 M et le TFA / TFE (1 % / 50 %) et d'autres méthodes qui permettent une solubilisation partielle des oléosines, c'est le cas du mélange chloroforme / méthanol (95 / 5) ou de l'éthanol 70 %. Le processus de formation d'agrégats (ou corps d'inclusion) est très dépendant non seulement de la concentration en protéines, mais aussi des conditions

environnementales (température, pH, conditions ioniques) (Mitraki et King, 1989). Les extrémités amphiphiles des oléosines étant variables en taille et en composition, il est probable que certaines oléosines très courtes soient solubles dans des solvants apolaires. C'est le cas de l'oléosine d'amande (14,9 kDa) soluble dans un mélange chloroforme / méthanol (95 /5) d'après Beisson *et al.* (2001b). Malheureusement, chez l'arabette, l'oléosine la plus courte retrouvée dans les graines, S1, a une hydrophobie supérieure à celle de S3, protéine sur laquelle nous avons effectué l'étude (Tableau 15), nous ne pourrions donc certainement pas accéder à une oléosine soluble à 100 % dans du chloroforme. Il existe néanmoins théoriquement une oléosine plus courte chez *A. thaliana*, S5. Cette oléosine a été découverte par analyse de séquences nucléotidiques, mais nous ne l'avons pas retrouvée dans les oléosomes de graines d'*A. thaliana*.

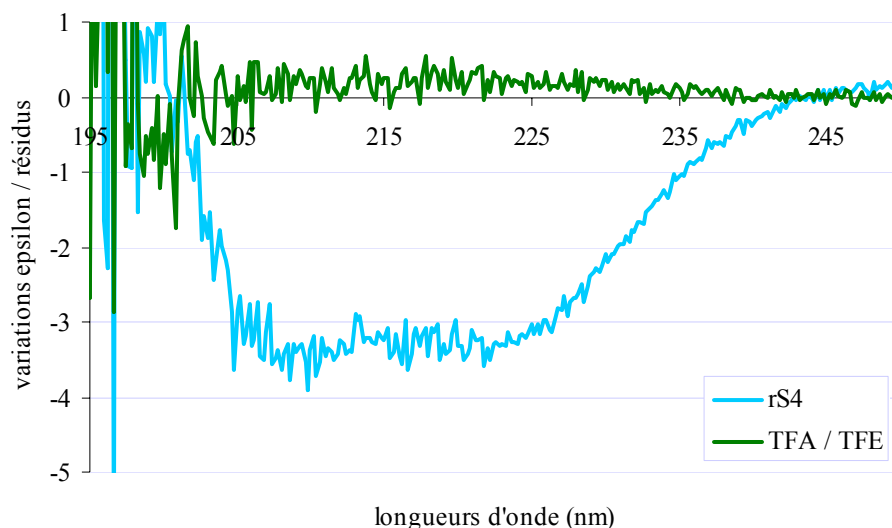
Cette connaissance de la solubilité des oléosines nous a permis d'utiliser des techniques variées pour analyser la structure secondaire de la protéine et ses propriétés tensioactives.

## **5.5. Étude de la structure des oléosines en solution**

Afin de mettre en évidence la présence de structure en hélices  $\alpha$  ou en feuillets  $\beta$  dans les oléosines recombinantes isolées, nous avons tout d'abord voulu faire les spectres des protéines par spectroscopie infrarouge (SIR) à transformée de Fourier. Les expériences ont été réalisées avec C. Dupont (Thermo Optek, Montigny-le-Bretonneux), en utilisant un accessoire de réflexion totale atténuée qui permet de déposer l'échantillon en goutte directement sur le cristal. Malheureusement, ni le tampon urée (Lacey *et al.*, 1998a), ni le mélange TFA / TFE ne sont adaptés à cette mesure. Dans les deux cas, le spectre du solvant masque totalement le spectre des protéines. Nous avons donc utilisé la technique suivante.

### **5.5.1. Dichroïsme circulaire (DC)**

Par mesure de spectres de DC d'oléosines en solution dans du TFA 1 % / TFE 50 %, nous avons obtenu le résultat présenté dans la Figure 74. Deux pics en « oreilles de lapin » sont présents à 210 et 222 nm sur le spectre de rS4. Ainsi, à 222 nm, l'ellipticité molaire obtenue est de  $-25400 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ . Sachant que pour un peptide ayant une ellipticité molaire de  $-22000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  cela correspond à environ 75 % d'hélices  $\alpha$  (Soulié *et al.*, 1998), rS4 en solution dans du TFA / TFE pourrait contenir 80 à 90 % d'hélices  $\alpha$ . En revanche, rS3 n'a pas donné de spectre différent du témoin lors de cette expérience ce qui peut provenir de la préparation de l'échantillon rS3 et sera donc revérifié prochainement.



**Figure 74 : Spectre de DC de rS4 en solution dans du TFA / TFE.**

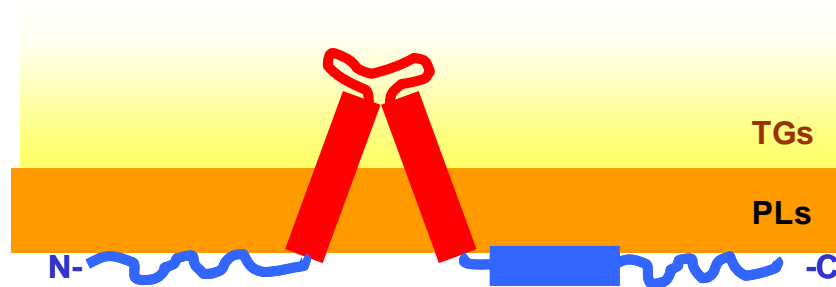
Le TFE est un solvant largement répandu dans l'étude de structure de protéines. Sa constante diélectrique faible renforce les liaisons intra-moléculaires et stabilise les structures secondaires. Bien qu'il favorise la formation d'hélices  $\alpha$ , il semble qu'il n'induit cette apparition d'hélices que lorsque la séquence protéique est favorable à cette formation (Millichip *et al.*, 1996). Malheureusement, le TFA masque le spectre de la protéine aux longueurs d'onde inférieures à 200 nm qui correspondent aux feuillets  $\beta$ . De plus, il s'agit là d'oléosines recombinantes isolées, sorties de leur contexte interfacial eau / huile (Lacey *et al.*, 1998). Il faut donc rester prudent quant à l'évaluation du degré de ressemblance (structures secondaires, tertiaires et formations d'oligomères) entre une protéine membranaire reconstituée et sa conformation native *in situ*. Mais, d'après Silvius (1992) les hélices  $\alpha$  transmembranaires purement hydrophobes sont des éléments structuraux très stables. Il est donc vraisemblable que les oléosines recombinantes purifiées S4 soient composées majoritairement d'hélices  $\alpha$ . Ces résultats sont cohérents avec la prédiction de structure donnée par le serveur « proteinpredict » du site web EMBL : 58 % d'hélices et 2 % de feuillets pour rS4, ce qui classe cette protéine en « tout alpha » (respectivement 55 % d'hélices et 5 % de feuillets pour rS3).

### **5.5.2. Hypothèse de structure d'une oléosine dans un corps lipidique**

A partir des données issues de la bibliographie (chapitre 1.4.2), du modèle de la structure de l'ABC transporteur (permettant la translocation de substrats variés - ions inorganiques, sucres ou même polypeptides - à travers les membranes cellulaires grâce à l'énergie d'hydrolyse de

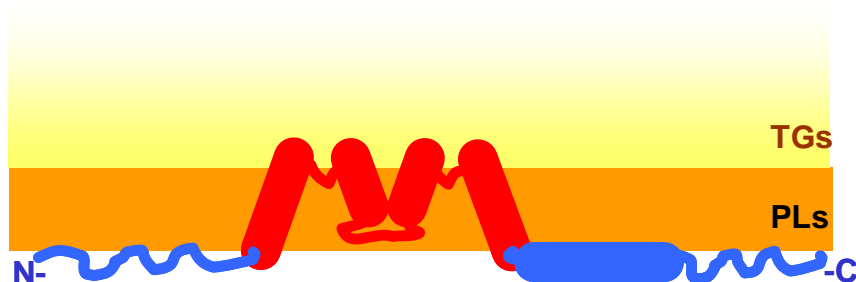


l'ATP, Higgins et Linton, 2001) et de nos données expérimentales, nous proposons un nouveau modèle (Figure 75). Nous nous appuyons aussi sur le fait qu'un segment protéique s'insère dans une couche de PLs en faisant un angle de 20° (pris en compte par Abell *et al.*, 2002) et sur Segrest *et al.* (2000) qui rappellent qu'un motif commun des protéines associées aux corps lipidiques de transport animaux est une hélice  $\alpha$  amphiphile qui stabilise la taille et la structure de ces particules lipoprotéiques. La monocouche de PLs a une épaisseur de l'ordre de 2 à 3 nm.



**Figure 75 : Hypothèse de structure de l'oléosine S4 au sein de l'oléosome.**

Cette structure peu organisée du fragment N-terminal est en accord avec la bibliographie (chapitre 1.4.2.1), de même, la présence d'une hélice  $\alpha$  dans le domaine C-terminal est acceptée par tous les auteurs. En revanche, l'organisation du segment central hydrophobe porte toujours à discussion. En nous appuyant sur nos mesures de DC et en accord avec les résultats de certaines équipes de recherche (chapitre 1.4.2.3), nous suggérons un fragment central transmembranaire enchassé dans la matrice de TGs. Néanmoins, la liaison peptidique est théoriquement intrinsèquement trop polaire pour pénétrer dans un cœur de lipides neutres. Bien que nous ayons solubilisé les oléosines partiellement dans du chloroforme, sous forme de monomères et de dimères, solvant de polarité comparable aux TGs, un autre modèle pourrait donc être proposé. Ce modèle tient compte de la polarité de la liaison peptidique et du fait qu'un segment transmembranaire n'est généralement jamais aussi long (Figure 76).



**Figure 76 : Deuxième hypothèse de structure secondaire de l'oléosine S4 au sein de l'oléosome.**

### 5.5.3. Diffusion de la lumière

Afin d'observer le comportement des oléosines en solution, nous avons mesuré leur diamètre hydrodynamique par diffusion de la lumière.

#### 5.5.3.1. Paramètres de viscosité

Les paramètres nécessaires aux calculs des diamètres hydrodynamiques par diffusion dynamique de la lumière sont la viscosité des solutions et les indices de réfraction.

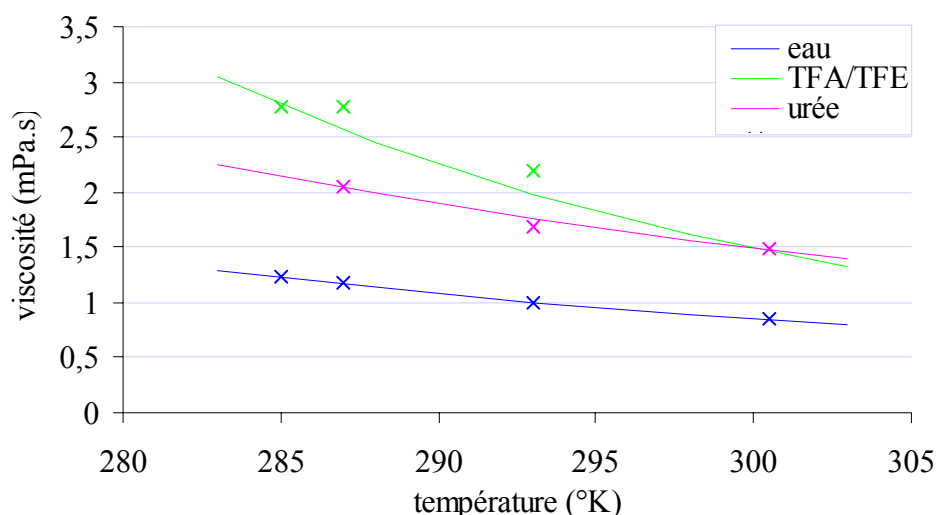
Nous avons obtenu pour les mesures de viscosités les résultats présentés dans le Tableau 17.

Lors de l'utilisation des deux appareils, une mesure de viscosité de l'eau distillée est réalisée. Grâce à cette valeur, et en utilisant les tables de viscosités de l'eau en fonction de la température (Handbook of Chemistry and Physics, 1962, annexe 1), la température est ré-estimée (température « tables »).

**Tableau 17 : Valeurs expérimentales de viscosités des solvants des oléosines (en mPa.s). Les valeurs en noir ont été déterminées à l'aide d'un tube viscosimétrique, celles en violet par cisaillement. Les températures « thermomètre » sont lues et les valeurs « tables » sont les températures recalculées à partir des tables de viscosité de l'eau distillée.**

thermomètre (°C)	tables (°C)	eau	TFA / TFE (1 % / 50 %)	urée 8 M
14	12	1,230	2,780	
<b>15</b>	<b>14</b>	<b>1,174</b>	<b>2,780</b>	<b>2,044</b>
23	20	1,004	2,188	1,678
<b>30</b>	<b>27,5</b>	<b>0,850</b>		<b>1,485</b>

A partir de ces valeurs et de la loi d'Arrhénius, nous avons extrapolé les valeurs de viscosité de ces deux solvants à d'autres températures (Figure 77). Les résultats obtenus avec le tube viscosimétrique à deux températures ont servi à déterminer les paramètres des équations d'Arrhénius.



**Figure 77 : Évolution des viscosités avec la température. Les courbes sont obtenues par la loi d'Arrhénius et les points correspondent aux valeurs expérimentales des deux méthodes.**

### 5.5.3.2. Indices de réfraction

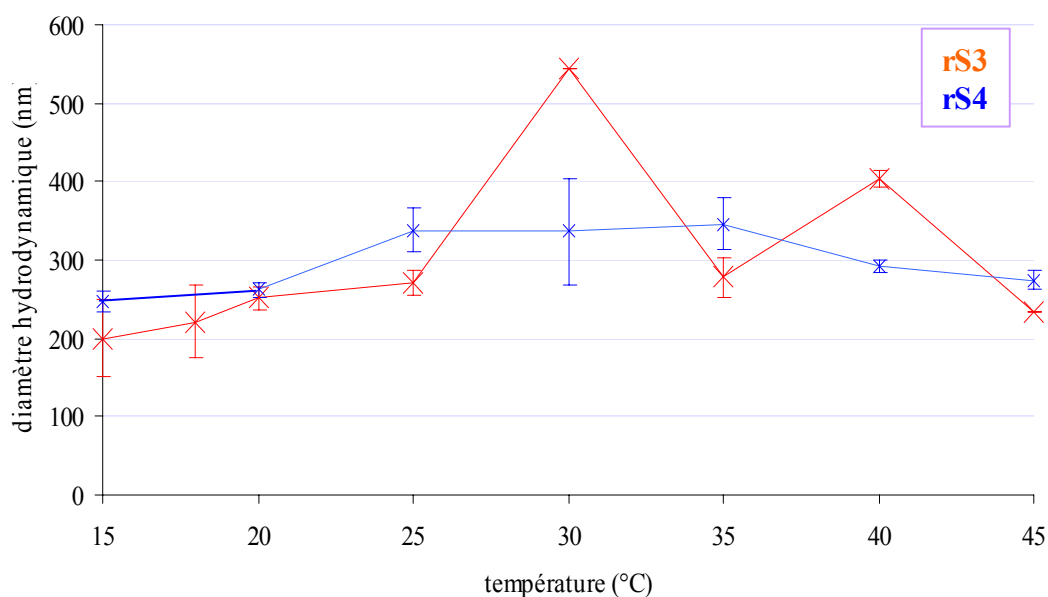
Les résultats pour les indices de réfraction sont ceux indiqués dans le Tableau 18.

**Tableau 18 : Indices de réfraction du mélange TFA 1 % / TFE 50 % et de la solution E d'éluion (urée 8 M, pH 4,5). L'indice de réfraction des protéines provient d'une notice de la société Malvern.**

	eau	TFA / TFE	urée 8 M	protéines
<b>n</b>	1,332	1,319	1,398	1,36

### 5.5.3.3. Résultats en diffusion de la lumière

Nous voulions déterminer la structure des oléosines en solution. Et comme nous avons observé, sur gels d'électrophorèse SDS-PAGE, des dimères d'oléosines, nous supposons que la composante hydrophobe des oléosines joue un rôle très important dans les interactions des protéines entre elles. La température jouant par ailleurs un rôle primordial dans la solubilité des oléosines, nous voulions savoir si la taille des agrégats d'oléosines évoluait en fonction de la température. C'est pourquoi, nous avons fait varier la température entre 15 et 45 °C et mesuré la taille des particules en suspension dans le TFA / TFE. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 78.



**Figure 78 : Diamètres hydrodynamiques d'oléosines solubilisées dans un mélange TFA / TFE (1 % / 50 %).**

D'après la figure précédente, les oléosines sont sous forme de particules ayant des diamètres hydrodynamiques de l'ordre de 300 nm. Par ailleurs, la taille des particules est stable pour rS4, avec des diamètres légèrement inférieurs à 15 et 20 °C, mais aussi pour des températures plus élevées de 40 et 45 °C. Les résultats obtenus avec rS3 sont moins réguliers mais la même tendance - diminution du diamètre hydrodynamique - est observée pour les faibles températures et les températures élevées. Globalement, nous pouvons en déduire que, même en solution dans un mélange TFA / TFE, les oléosines ne sont pas solubles sous forme de monomère. Néanmoins, par microscopie, quelques gouttelettes (rares) sont visibles dans la solution précédente (non montré ici). Ainsi, ces gouttelettes masqueraient en diffusion de la lumière les oléosines solubles. En effet, des caséines  $\beta$  en solution aqueuse, à 15 °C présentent des particules de diamètre hydrodynamique de 5 à 10 nm (S. Dauphas, Laboratoire d'Étude des Interactions des Molécules Alimentaires, Nantes, INRA, communication personnelle). De plus, la température semble avoir finalement peu d'influence sur la taille de ces agrégats, mais du fait des limites de l'effet Peltier, nous n'avons pas pu mesurer la taille des particules à des températures inférieures à 15 °C.

## 5.6. Étude des oléosines aux interfaces

Actuellement, peu de données sont disponibles sur les propriétés tensioactives des oléosines. Seule la stabilité d'oléosomes artificiels reconstitués à partir de TGs, PLs et oléosines a été

publiée, les autres recherches étant protégées par des brevets. La formation et la stabilisation d'émulsions relèvent d'une part des propriétés physiques des fluides et d'autre part de la présence d'espèces ayant une activité de surface à l'interface entre les fluides. Des propriétés importantes des fluides sont les viscosités des phases continue et dispersée, leurs densités, leurs puretés, leurs polarités et le pH et la force ionique de la phase continue. Les aspects importants concernant les molécules tensioactives sont leur capacité à diminuer la tension interfaciale, la vitesse de diminution de la tension, le taux de molécules adsorbées, leur capacité à se désorber, la possibilité de changer de conformation pendant et après l'adsorption, l'épaisseur de la phase adsorbée, les interactions entre les molécules adsorbées et leur mobilité latérale (Bos et Van Vliet, 2001).

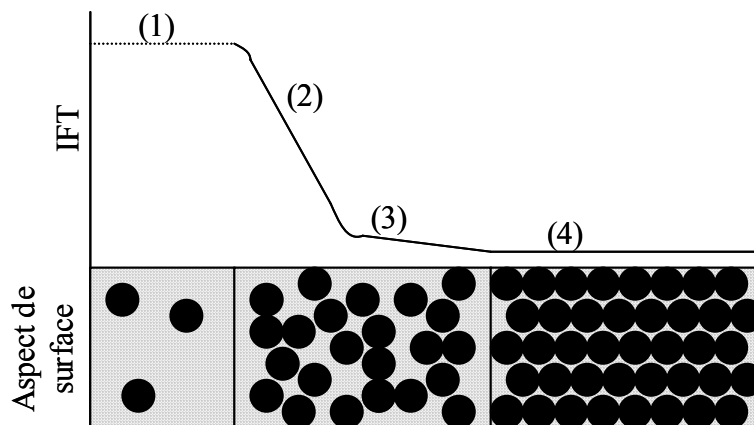
Afin d'étudier les propriétés de surface aux interfaces des oléosines, nous avons fait des études d'une part de profil de goutte à deux interfaces air / eau et huile / eau et d'autre part sur une balance de Langmuir, à une interface eau / air simple et sur une monocouche de PLs disposée à cette même interface.

### **5.6.1. Étude du comportement des oléosines aux interfaces air / eau et huile / eau**

Une première méthode utilisée pour étudier les propriétés de surface aux interfaces des oléosines a été la génération de gouttes pendantes de protéine dans l'air ou dans un bain d'huile. Nous pouvons ainsi déterminer les paramètres qui permettent de mesurer l'efficacité d'un tensioactif : la valeur minimale d'IFT atteinte et la CMC (Fiechter, 1992).

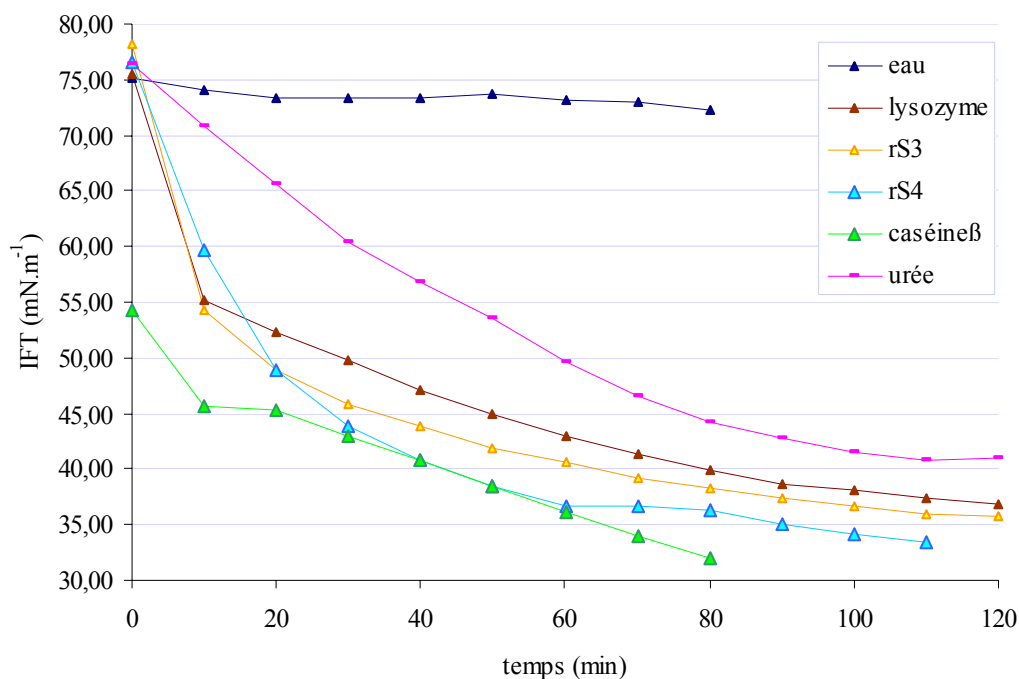
#### **5.6.1.1. Interface air / eau**

L'interface air / eau est un très bon modèle de surface hydrophobe pour étudier l'adsorption des protéines. En effet, elle est homogène et facilement reproductible (Harzallah *et al.*, 1998). Tripp et ses collaborateurs (1995) ont étudié le comportement de huit protéines à l'interface air / eau par mesure de l'IFT de gouttes pendantes de protéine (en tampon phosphate de sodium pH 7,4, concentrations de 0,01 à 1 mg.mL<sup>-1</sup>). Il décrit le phénomène en trois phases : tout d'abord la diffusion des molécules solubilisées vers la périphérie de la goutte, ensuite l'adsorption des molécules de la périphérie à l'interface air / eau, enfin, des réarrangements de conformation des protéines adsorbées. Il représente ceci par le schéma de la Figure 79.



**Figure 79 : Relation schématique de l'IFT avec la couverture de l'interface par les molécules (en ronds noirs). (1) temps d'induction (plus ou moins long selon la concentration en émulsifiant), (2) Remplissage de la surface, rapide diminution de l'IFT, (3) méso-équilibre de l'IFT, changement de conformation des molécules, (4) équilibre de l'IFT.**

L'hydrophobie effective de surface à l'interface air / eau est la meilleure pour la caséine  $\beta$ , puis pour le lysozyme. La caséine  $\beta$  est polaire, elle possède 4 ou 5 groupements phosphates. Elle est très flexible, du fait d'un repliement aléatoire. La caséine  $\beta$  a une masse moléculaire de 23-24 kDa (209 résidus d'acides aminés). Elle forme peu de structures secondaires en solution aqueuse et, tout comme les oléosines, ne comporte pas de pont disulfure. Son pI est de 4,9 à 5,2. La plupart des cinquante premiers acides aminés porte une charge négative à pH 7, ce qui rend cette partie de la molécule hydrophile, alors que le reste de la protéine est majoritairement constitué de résidus hydrophobes. Cette nature amphiphile de la molécule lui confère une grande activité de surface, contribuant à stabiliser les mousses et les émulsions (Rosario Rodriguez Nino *et al.*, 1999). Elle a un effet similaire à des détergents sur l'IFT. Le phénomène est réversible. En revanche, le lysozyme est très rigide. Il s'adsorbe lentement à l'interface, de façon irréversible. Nous avons donc choisi ces deux protéines pour témoins.



**Figure 80 : Gouttes pendantes de protéines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5 à 0,05 g.L<sup>-1</sup> à l'interface avec l'air. Mesure de l'IFT pendant 2 h.**

La goutte d'eau dans l'air présente bien une IFT constante de 73 mN.m<sup>-1</sup> à 20 °C. En revanche, le témoin solution E (urée 8 M, pH 4,5, sans imidazole) a une IFT qui chute fortement au cours du temps (Figure 80). Ceci pourrait être dû à la présence d'impuretés contenues dans la solution ou encore à la solubilisation dans l'urée de molécules présentes dans l'atmosphère. Une filtration, à 0,2 µm, de la solution d'urée au préalable n'a pas permis d'améliorer la ligne de base. Néanmoins, les protéines solubilisées dans cette solution d'urée diminuent la tension de surface plus fortement que le témoin (Tableau 19). La caséine β a un effet quasi immédiat : dès la première minute, l'IFT est déjà inférieure à 55 mN.m<sup>-1</sup> alors que pour toutes les autres protéines, elle est comparable à celle du témoin à 73 mN.m<sup>-1</sup>. Après 30 min, il n'y a plus d'effet marqué des protéines sur l'IFT, l'évolution est parallèle à celle du témoin urée. Les oléosines ont la capacité de se placer à l'interface air / eau et possèdent un faible pouvoir abaisseur d'IFT à cette interface. La diminution de l'IFT reste, après 2 h, inférieure à celle engendrée par la caséine β. La diminution de l'IFT est plus tardive en présence d'oléosines qu'avec la caséine β. Ceci provient certainement d'une diffusion des oléosines vers l'interface air / eau plus lente que celle des caséines et du rôle d'émulsifiant huile dans eau des oléosines *in vivo*.

**Tableau 19 : Diminution, après 2 h, de l'IFT à l'interface air / eau par les protéines, par rapport au témoin urée au temps 2 h (en %). (\*) = au temps 80 min.**

	rS3	rS4	lysozyme	caséine $\beta$ (*)
IFT <sub>2hprot</sub> /IFT <sub>2hurée</sub>	13	18	10	22

### 5.6.1.2. Interface huile / eau

Cette fois-ci, les mesures ont été réalisées à l'interface eau / huile. Les mesures ont tout d'abord été faites dans de l'huile d'olive lavée selon la méthode décrite dans le chapitre 2.1.1.2. En effet, cette huile est couramment utilisée au laboratoire (cinétiques de lipases, induction de la synthèse de protéines dans la levure *Y. lipolytica*, ...). Néanmoins, même de qualité de laboratoire (huile d'olive provenant de chez Sigma), cette source végétale est très riche en émulsifiants endogènes, et les lavages étaient longs. Nous avons donc décidé de nous orienter vers une huile beaucoup plus raffinée : l'huile de tournesol commerciale. En effet, l'étape préliminaire au raffinage de toute huile est l'élimination des PLs qui, par leurs propriétés émulsifiantes, gênent le raffinage de l'huile. L'huile de tournesol, bien que moins contaminée par des PLs que l'huile d'olive, n'est pas non plus indemne de molécules tensioactives (vu dans le chapitre 3.1.1). Avec du recul, nous pensons maintenant qu'il aurait été intéressant de faire des mesures en utilisant de l'huile de colza. Cette huile présente l'avantage, tout comme le tournesol d'être une huile commerciale très raffinée et de plus, elle s'apparente à l'arabette (famille des crucifères) (Tableau 20). L'huile d'olive fait partie des huiles riches en acides gras saturés et en acide oléique, l'huile de tournesol est riche en acides polyinsaturés et l'huile de colza est une huile intermédiaire (Linden et Lorient, 1994). Nous avons vu dans l'introduction (chapitre 1.3.4.2) qu'en effet, la composition des oléosomes est fortement liée à l'espèce végétale étudiée et que cette composition est similaire entre deux plantes appartenant à une même famille végétale (colza et moutarde pour les crucifères). Pour améliorer le raffinage de l'huile et donc la pureté des TGs de l'huile, il existe aussi des petites colonnes de silice sur lesquelles on peut filtrer l'huile. Nous avons utilisé ce système pour toutes les expériences réalisées avec la balance de Langmuir en présence de TGs (chapitre 2.4).



**Tableau 20 : Composition en acides gras d'huiles végétales commerciales (en %), d'après Linden et Lorient, 1994.**

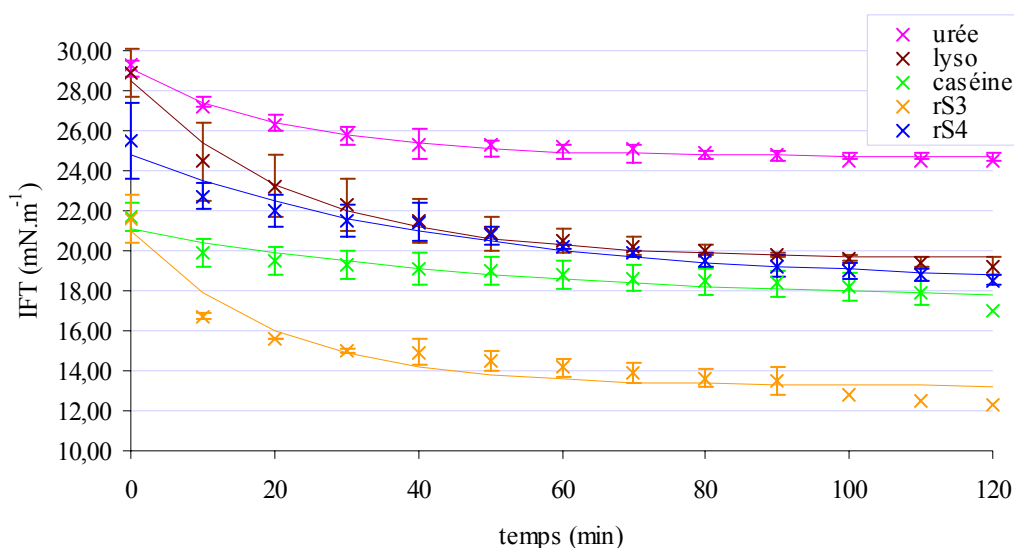
	C16 :0	C18 :0	C18 :1	C18 :2	C18 :3	température solidification
olive	10	4	75	10	1	-6 °C
tournesol	8	5	20	65	1	-17 °C
colza	6	2	58	23	9	-10 °C

Des gouttes d'urée contenant des protéines à 0,05 g.L<sup>-1</sup> ont été formées dans une cuve d'huile de tournesol. Après 2 h de mesure, nous avons obtenu les points de la Figure 81. Les valeurs expérimentales ont ensuite été ajustées selon l'Équation 2, ce qui correspond aux courbes pleines sur la Figure 81.

**Équation 2 : Modélisation de l'IFT en fonction du temps.**

$$\text{IFT} = a + b.\exp^{-t/c}$$

a,b et c sont des constantes, t est le temps en min.



**Figure 81 : Gouttes pendantes de protéines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5 à 0,05 g.L<sup>-1</sup> à l'interface avec de l'huile de tournesol. Mesure de l'IFT pendant 2 h. Points expérimentaux (x) et courbes ajustées (—).**

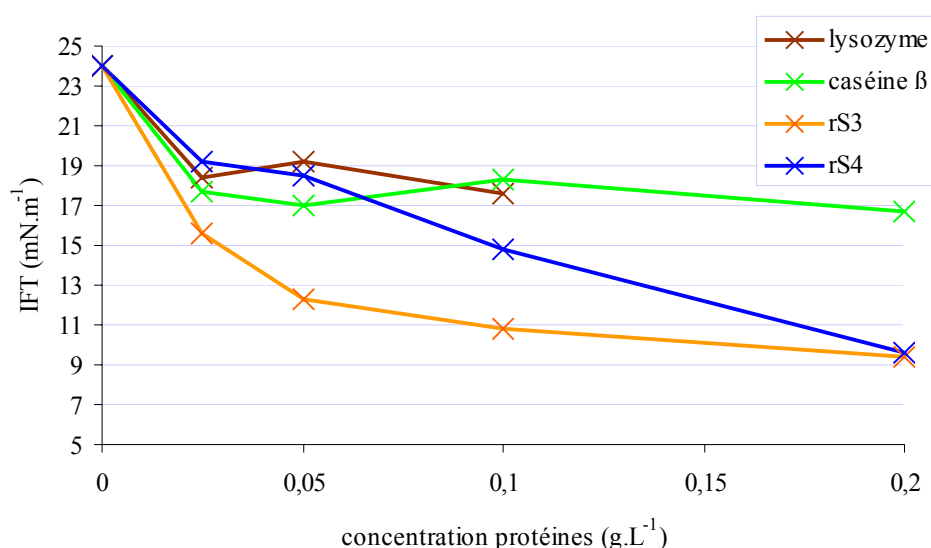
Il y a toujours une dérive du témoin urée au cours du temps, mais cette dérive est minime comparée aux effets des protéines (Tableau 21). La caséine β a encore un effet immédiat. En revanche, les oléosines ont toujours peu d'effet au temps zéro, mais après 10 min pour rS3 (respectivement 70 min pour rS4), le pouvoir abaisseur de tension de surface des oléosines

devient supérieur à celui de la caséine  $\beta$ . Nos résultats sont en accord avec ceux de Tai *et al.* (2002) qui ont trouvé une meilleure stabilisation d'émulsion huile dans eau avec les isoformes de BMM d'oléosine (rS3) qu'avec ceux de HMM (rS4).

**Tableau 21 : Diminution de l'IFT à l'interface eau / huile par des protéines après 2 heures (en % du témoin urée à 2 h).**

	rS3	rS4	lysozyme	caséine $\beta$
$IFT_{2hprot}/IFT_{2hurée}$	38,2	11,6	8,3	21,7

Nous avons ensuite fait varier la concentration de protéines en solution dans l'urée. Les résultats obtenus (IFT à 2 h en fonction de la concentration en protéines) sont représentés sur la Figure 82. Ce type de courbes peut théoriquement permettre de déterminer la CMC d'un émulsifiant. La CMC est atteinte lorsque l'IFT ne varie plus avec l'augmentation de la concentration. Dès la plus petite concentration protéique étudiée ( $0,025 \text{ g.L}^{-1}$ ) en urée, la caséine  $\beta$  atteint un pouvoir abaisseur tension de surface maximal. Cette concentration est donc supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). En revanche, les oléosines ont des CMC supérieures à  $0,025 \text{ g.L}^{-1}$  (et même supérieure à  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  pour rS4). La CMC ainsi déterminée est certainement surestimée car la CMC et la solubilité des détergents augmentent à concentration élevée en urée. L'urée est le seul soluté à augmenter la CMC car l'urée diminue le coefficient de partition huile / eau et augmente les solubilités des composés non polaires dans l'eau (Walter *et al.*, 2000).



**Figure 82 : Gouttes pendantes de protéines en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5 à l'interface avec de l'huile de tournesol. L'IFT à l'équilibre (après 2 h) est donnée en fonction des concentrations protéiques (variables de 0 à  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ).**

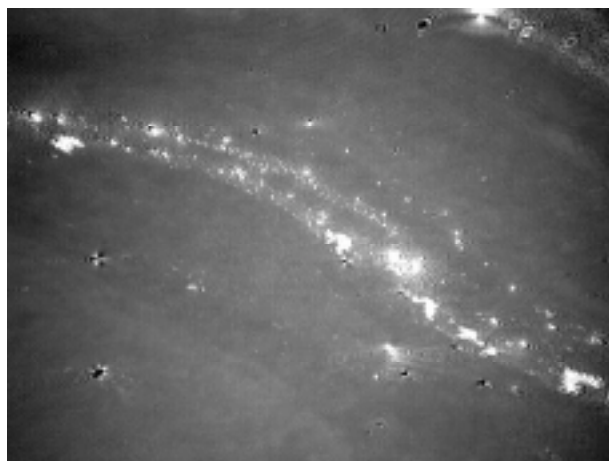
Nos mesures d'IIFT sur des gouttes pendantes ont été limitées à 2 h car au-delà de ce temps, soit la goutte tombait sous l'effet de la gravité, soit elle s'était évaporée car il y avait certainement des fuites au niveau du piston de la seringue, malgré toutes les précautions prises.

## 5.6.2. Insertion des oléosines dans des couches de phospholipides

### 5.6.2.1. Oléosines à l'interface air / eau

Nous avons utilisé l'oléosine de BMM rS3 qui devrait être plus susceptible de stabiliser des émulsions huile dans eau (d'après les résultats précédents et Tai *et al.*, 2002).

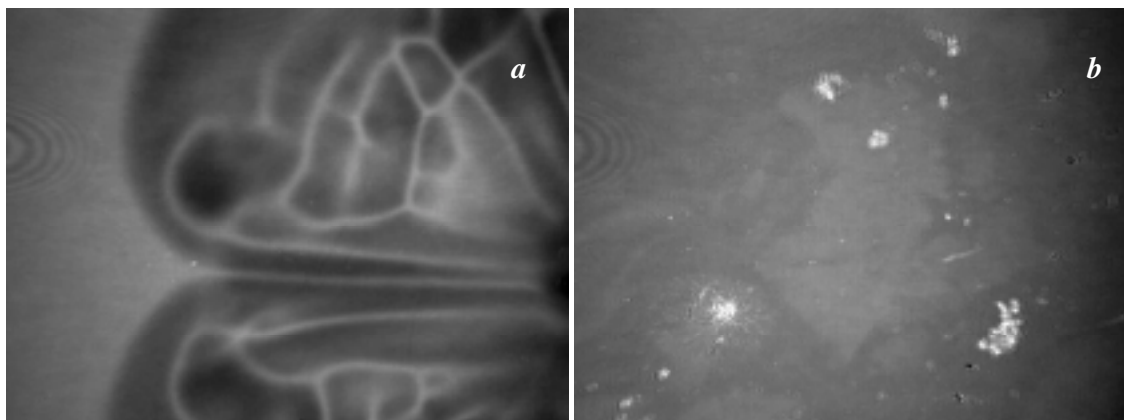
- Sur la balance de Langmuir, des oléosines S3, en solution dans de l'urée 8 M à pH 4,5, déposées par-dessus un film d'eau ont donné les images de la Figure 83. Une photographie représente 4 x 5 mm de la surface de la balance. Les parties grisées représentent une surface homogène alors que les points blancs sont des poussières ou des agrégats. Sur cette photographie, de gros agrégats de protéines sont visibles sur l'eau.



**Figure 83 : Balance de Langmuir. Dépôt de 35 µg de rS3 en solution dans l'urée sur un film d'eau de 350 cm<sup>2</sup>. Image du BAM après 15 min de repos.**

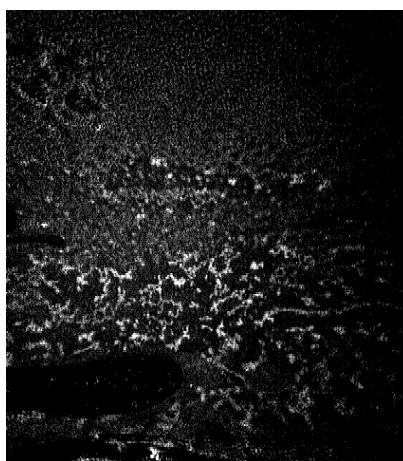
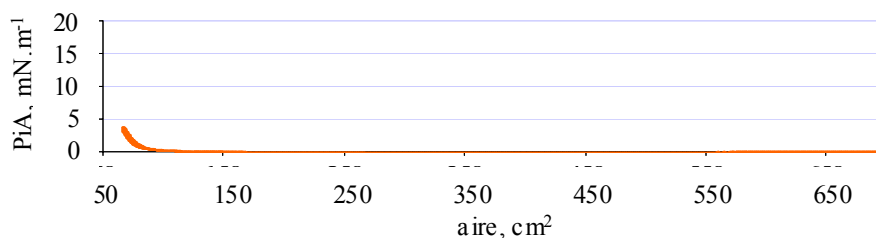
Si au contraire, des gouttes d'eau sont déposées sur un film d'oléosines en solution dans l'urée, pour de faibles quantités d'eau ajoutées, on obtient la formation transitoire d'auréoles qui disparaissent instantanément (Figure 84 *a*). Mais si l'eau est ajoutée en quantité massive (une dizaine de mL) sur ce même film, les images obtenues au BAM sont représentées sur la Figure 84 *b*. Ainsi, lorsque l'urée 8 M n'est diluée que localement, il y a une légère agrégation des oléosines. L'équilibre en concentration en urée se faisant rapidement à la surface de la balance, la concentration est à nouveau à 8 M en urée et l'agréation des oléosines dans ces conditions est transitoire et réversible. En revanche, une réelle dilution du solvant provoque

l'agrégation rapide et irréversible des protéines. Les oléosines S3 sont effectivement insolubles dans l'eau à 20 °C (voir chapitre 4.5.2).



**Figure 84 : Balance de Langmuir à 350 cm<sup>2</sup>. Dépôt d'une (a) ou plusieurs (b) gouttes d'eau sur un film de 45 µg de rS3 en solution dans l'urée. Les photographies ont été prises au BAM.**

- Nous n'avons pas utilisé les oléosines solubilisées dans le mélange TFA / TFE du fait des propriétés tensioactives de ce solvant (S. Dauphas, Laboratoire d'Étude des Interactions des Molécules Alimentaires, INRA, Nantes).
- Lorsque les oléosines sont solubilisées dans le chloroforme, et qu'elles sont déposées sur un film d'eau, l'isotherme obtenu est représenté sur la Figure 85. Dans ces conditions, les oléosines forment des agrégats moins gros sur l'eau. L'agrégation est sous forme de réseau, plus homogène qu'en urée. Un léger effet sur l'IFT est mesuré lorsque la couche est fortement comprimée, mais cet effet reste très faible et une partie des protéines agrégées a certainement disparu de la surface.



**Figure 85 : Balance de Langmuir. Isocycle sur un film d'eau de 700 cm<sup>2</sup> initial par-dessus lequel, 100  $\mu$ L de rS3 à 1 g.L<sup>-1</sup> en solution dans du chloroforme ont été déposés. La photographie a été prise au BAM lors de la compression à 150 cm<sup>2</sup>.**

#### **5.6.2.2. PLs à l'interface air / eau**

- Des PLs sont déposés à une interface air / eau sur la balance de Langmuir, puis la surface est comprimée par la fermeture des barrières. Nous obtenons alors un isotherme en quatre parties que l'on peut définir de la manière suivante (Figure 86, d'après Maget-Dana, 1999) : lorsque l'ouverture des barrières est maximale, la pression est nulle, l'état des molécules à la surface peut être assimilé à un gaz. En refermant les barrières, on passe ensuite à un état « liquide » où les molécules forment un film continu, c'est la phase douce de montée en pression. Puis vient une étape qualifiée de « solide » où toutes les molécules sont arrangées les unes contre les autres et ne peuvent plus se réorganiser. C'est le « mur » de montée en pression. Enfin, lorsque la pression devient trop importante (supérieure à 40 mN.m<sup>-1</sup>), on atteint une phase de collapse où certaines molécules vont passer sous la monocouche.

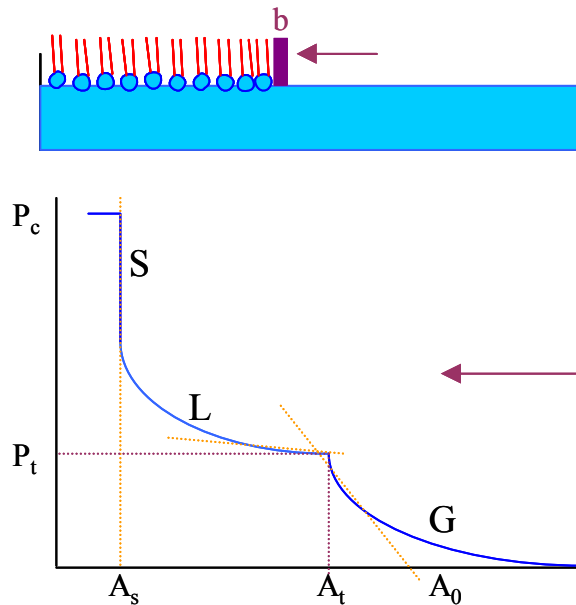


Figure 86 : Représentation schématique d'une balance de Langmuir (b = barrière mobile) et isotherme de compression d'une monocouche (G = état de liquide expansé, L = liquide condensé, S = solide ;  $P_c$  = pression de collapsé,  $P_t$  = pression de transition ;  $A_0$  = aire limitante,  $A_t$  = aire de transition et  $A_s$  = aire dans la phase solide).

La PC seule déposée sur un film d'eau donne ainsi un isotherme représenté sur la Figure 87. Nous avons observé, en contrôle, l'effet de 70  $\mu\text{L}$  du solvant des oléosines,  $\text{CHCl}_3$  / méthanol (95 / 5) déposés sur ce même film de PC comprimé sous forme « liquide » à  $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . L'ajout du solvant provoque un léger saut de pression (+  $1,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

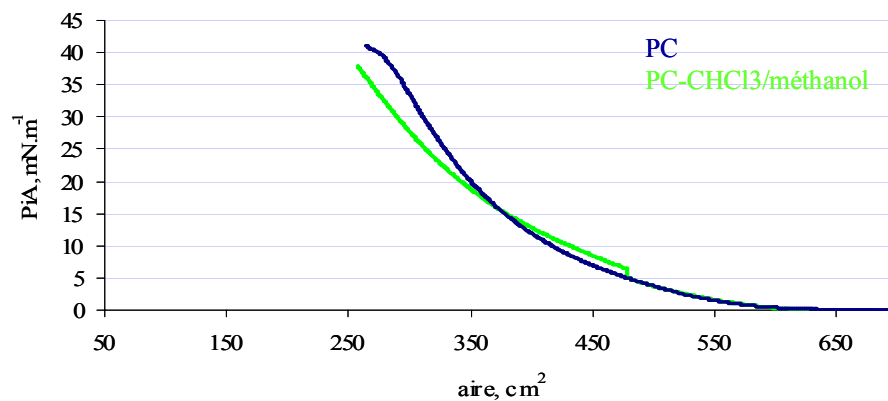
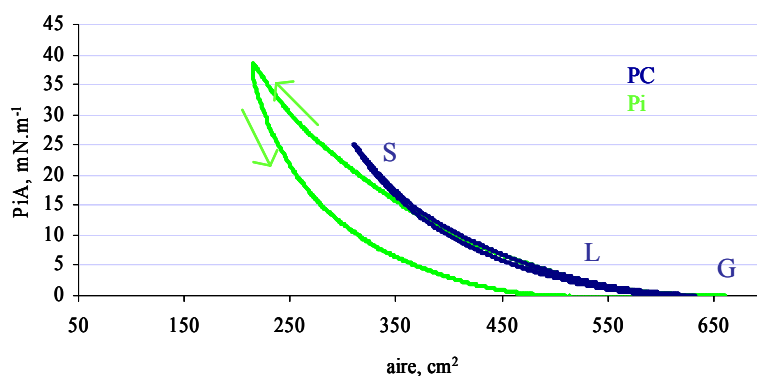


Figure 87 : Balance de Langmuir. Dépôt de 70  $\mu\text{L}$  de PC à  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sur un film d'eau de  $700 \text{ cm}^2$ . Compression du film à  $50 \text{ cm}^2\cdot\text{min}^{-1}$ . Dépôt de 70  $\mu\text{L}$  de chloroforme / méthanol par-dessus le film de PC comprimé à  $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

- L'isotherme obtenu avec la PC a été comparé à celui obtenu avec la même quantité de  $P_i$ , qui est un PL chargé négativement à pH neutre (Figure 88). Nos mesures ont à nouveau été

effectuées sur de l'eau (pH 5,6). Il y a peu de différences entre les deux isothermes lors de la compression, en revanche, la réouverture des barrières montre deux comportements différents des monocouches lors de la décompression.



**Figure 88 : Balance de Langmuir. Dépôt de 70  $\mu\text{L}$  de PLs à 1  $\text{g.L}^{-1}$  (Pi en vert, PC en bleu) sur un film d'eau de 700  $\text{cm}^2$ . Compression du film à 50  $\text{cm}^2.\text{min}^{-1}$  (G = phase « gaz », L = « liquide » et S = « solide ») puis réouverture des barrières à la même vitesse.**

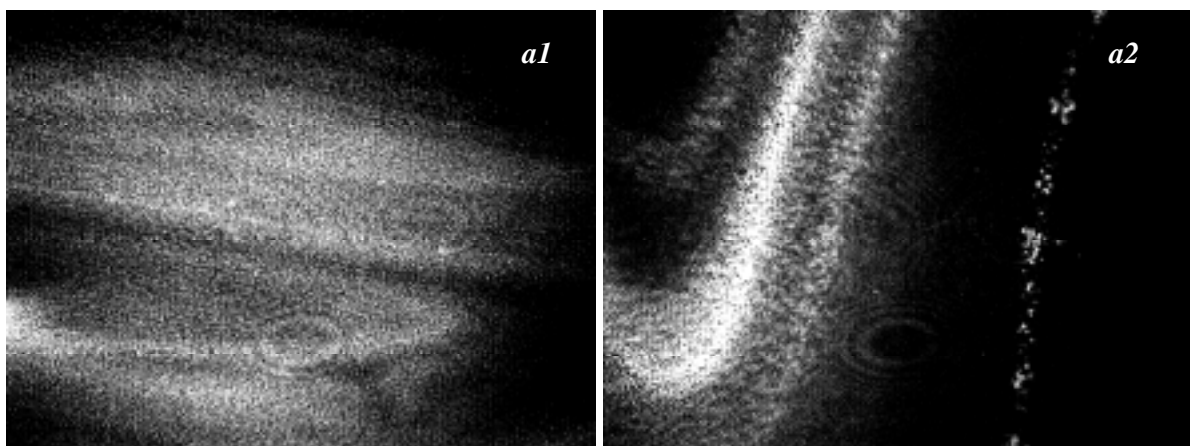
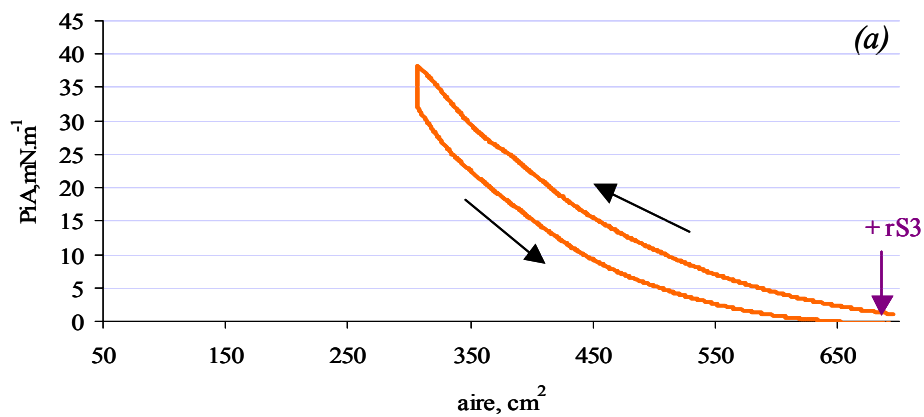
Les images du BAM de film de PLs purs sont toujours uniformément grisées, les PLs (PC ou Pi) sont donc répartis de façon homogène dans la monocouche.

### 5.6.2.3. Oléosines sur une monocouche de PLs

- *rS3 sur une monocouche de PC*

Nous avons déposé des oléosines par-dessus (pour éviter l'agrégation en solution aqueuse) le film de PC (voir Figure 89), soit en phase « gazeuse », on a alors une IFT = 0  $\text{mN.m}^{-1}$  (Figure 89 a), soit après que le film de PC a été comprimé à 5  $\text{mN.m}^{-1}$  (phase liquide, Figure 89 b), soit à 20  $\text{mN.m}^{-1}$  (début de la phase solide, Figure 89 c). Le BAM montre une surface homogène, grise, pendant tout le cycle lorsque les oléosines sont introduites en phases condensées liquides ou solides, mais pas en phase gazeuse. Si la monocouche de PC est dense, les oléosines s'insèrent dedans et ne s'agrègent plus. En revanche, si la monocouche de PC n'est pas bien formée, l'eau est apparente à la surface de la balance. La surface reste donc hydrophile et les oléosines s'agrègent au contact du film d'eau. Les agrégats sont néanmoins plus fins que lorsque les oléosines étaient introduites sur un simple film d'eau (photographies a1 et a2). Les agrégats sont répartis de façon homogène sur la surface pour des pressions faibles (photographie a1), puis se regroupent lorsque la compression augmente (photographie a2). Si l'on ajoute des oléosines sur la phase « gazeuse » d'un film de PC, la pression augmente immédiatement, l'isotherme est décalé. La surface est donc plus rapidement

occupée par les oléosines. On remarque de plus la présence d'un point d'inflexion à  $26 \text{ mN.m}^{-1}$  qui traduit une phase supplémentaire de réorganisation du film superficiel. Dans tous les cas (phases « gaz », « liquide » ou « solide »), on retrouve le point d'inflexion entre 26 et  $36 \text{ mN.m}^{-1}$  et la pression augmente brusquement de  $7 \text{ mN.m}^{-1}$  lors de l'ajout des protéines, ceci est très supérieur à l'effet du témoin solvant seul. Ce saut de pression est 2 fois plus important si la quantité de protéines introduite est double (Figure 90). Les oléosines, si elles sont ajoutées sur un film de PLs ne forment pas d'agrégats (ou uniquement des petits) qui ne coulent donc pas au fond de la cuve. En effet, si l'on refait plusieurs isocycles les uns derrière les autres ou même après une nuit de repos du film, les isothermes sont superposables les uns aux autres. Les oléosines peuvent donc s'incorporer dans un film de PLs situé à une interface eau / air et modifier les propriétés mécaniques de cette monocouche.





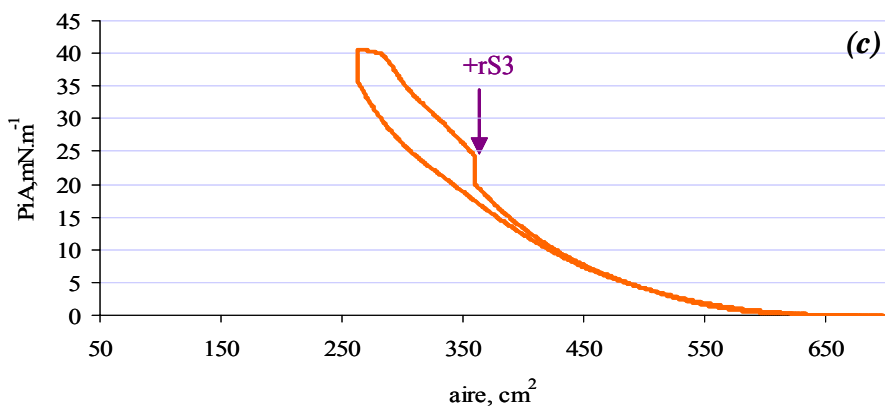
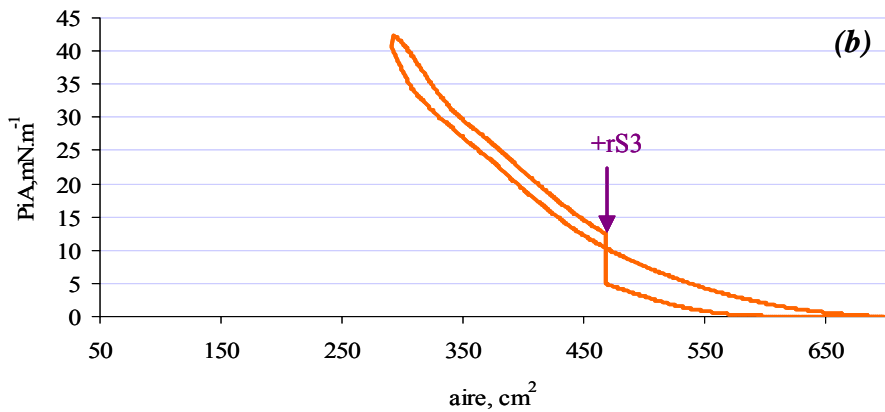


Figure 89 : Balance de Langmuir. Dépôt de 70  $\mu\text{g}$  de PC sur de l'eau à 700  $\text{cm}^2$ . Compression du film jusqu'à 5  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (b) ou 20  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (c). 50  $\mu\text{g}$  de rS3 sont déposés sur le film de PC non comprimé (a) ou sur les films comprimés après 30 min de repos. Poursuite de l'isocycle. La photographie a1 a été prise au BAM lors de la compression à 38  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  et la photographie a2 à 15  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  lors de la réouverture.

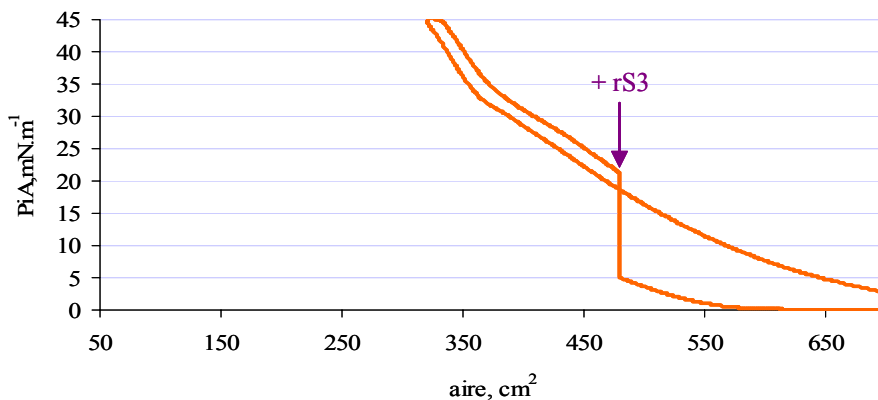


Figure 90 : Balance de Langmuir. Dépôt de 70  $\mu\text{g}$  de PC sur de l'eau à 700  $\text{cm}^2$ . Compression du film jusqu'à 5  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . 100  $\mu\text{g}$  de rS3 sont déposés sur le film de PC après 30 min de repos. Poursuite de l'isocycle.

Pour savoir si l'ordre de dépôt sur la surface de la balance est important et si les interactions entre les PLs et les protéines sont lentes à se mettre en place, la PC et la rS3 sont ensuite incubés ensemble dans du chloroforme pendant une nuit avant d'être déposés sur le film d'eau. L'isotherme de compression est représenté dans la Figure 91. Quelques agrégats sont visibles lorsque la pression est faible, puis disparaissent lorsque la pression augmente. De plus, l'isotherme présente la même allure que celui de la Figure 89. Ainsi, les oléosines s'agrègent à nouveau au contact du film d'eau lors du dépôt puis ont le même effet que sur une monocouche de PLs. Le prémélange dans du chloroforme ne permet donc pas de mettre en place des interactions entre les oléosines et les PLs. Il faut certainement être à une interface hydrophile / hydrophobe (eau / huile ou eau / air) pour que les molécules puissent s'organiser.

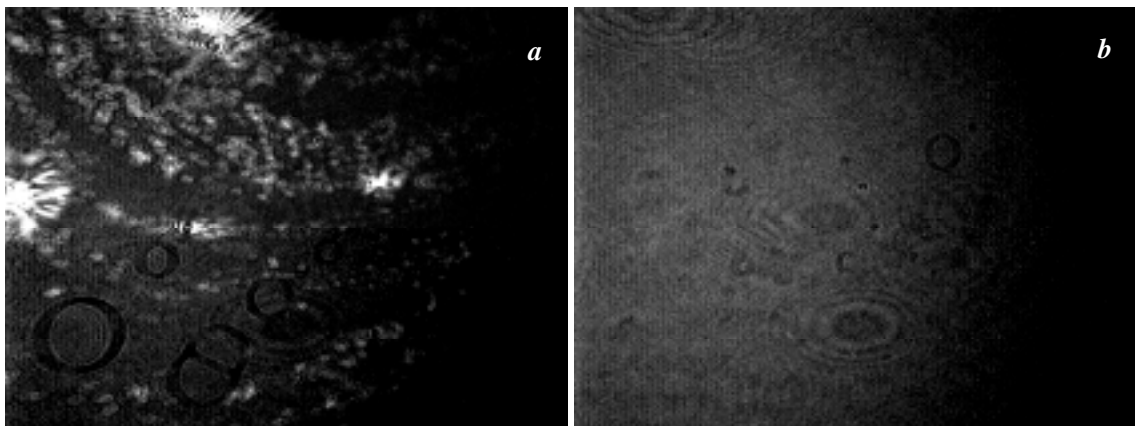
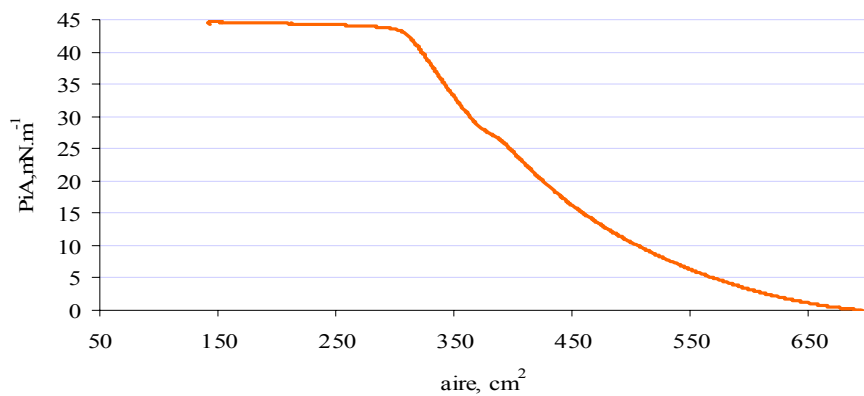
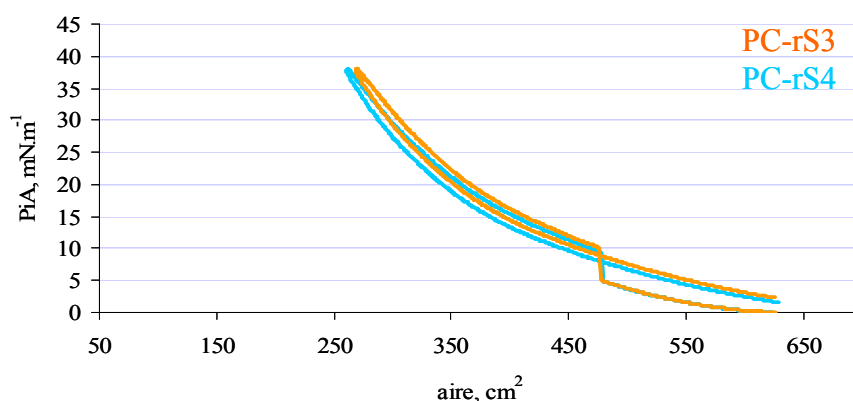


Figure 91 : Balance de Langmuir. Dépôt d'un mélange, pré incubé sur la nuit, de PC ( $70 \mu\text{L}$  à  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) et de rS3 ( $100 \mu\text{L}$  à  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) sur un film d'eau de  $700 \text{ cm}^2$ . Compression du film à  $50 \text{ cm}^2.\text{min}^{-1}$ . La photographie (a) a été prise au BAM à  $10 \text{ mN.m}^{-1}$  et (b) à  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ .

- *rS3 et rS4 sur une monocouche de PC*

Enfin, nous avons voulu comparer l'effet des deux isoformes d'oléosines sur la tension de surface d'une monocouche de PC (Figure 92). Nous avons, en effet, trouvé une différence de comportement des oléosines 1 et 2 à l'interface urée 8 M pH 4,5 / huile de tournesol par des mesures de tension de surface de gouttes (Figure 81). Sur la balance de Langmuir, pour les deux isoformes, la surface observée au BAM est homogène. Il n'y a pas de différence significative selon l'isoforme d'oléosine déposée sur la monocouche de PC.

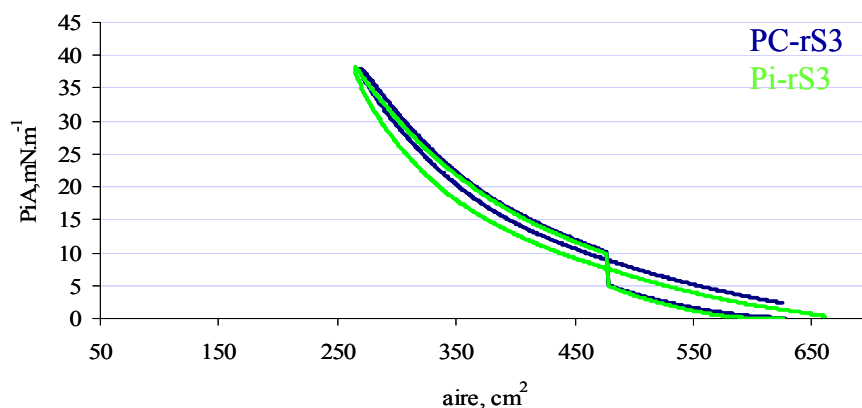


**Figure 92 : Balance de Langmuir. Dépôt de 70  $\mu\text{g}$  de PC sur de l'eau à 700  $\text{cm}^2$ . Compression du film jusqu'à 5  $\text{mN.m}^{-1}$ . 35  $\mu\text{g}$  d'oléosine (rS3 en orange, rS4 en bleu) sont déposés sur le film de PLs après 30 min de repos. Poursuite de l'isocycle.**

- *rS3 sur une monocouche de Pi*

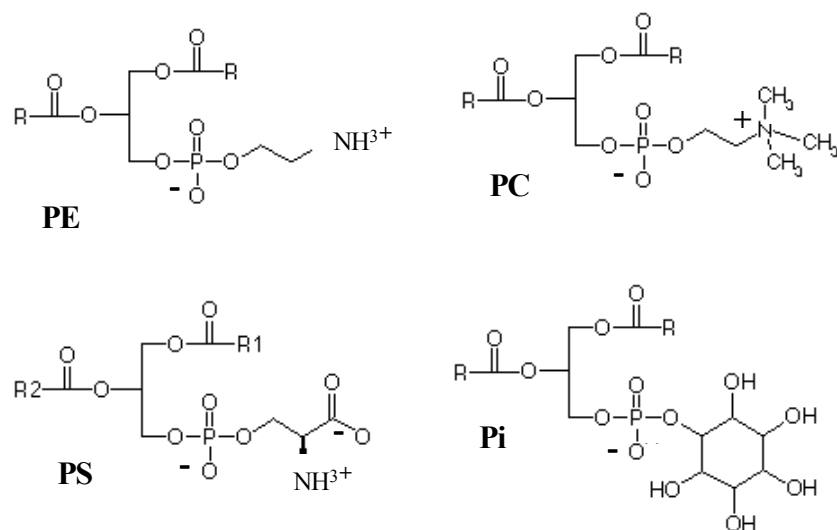
Du fait de leur caractère amphiphile, les PLs ont tendance à former des structures lamellaires (bicouches) ou des structures fermées sphériques ou ovales en solutions aqueuses, selon notamment la concentration des lipides dans l'eau (Lasic, 1988). L'enveloppe de l'oléosome de maïs contient une grande proportion, inhabituelle pour des tissus végétaux, de PLs chargés négativement : Pi et PS (Figure 94). Ces PLs chargés négativement, ainsi que quelques acides gras libres, pourraient théoriquement interagir avec les acides aminés basiques des oléosines à la surface de la monocouche de PLs pour stabiliser l'oléosome (Tzen *et al.*, 1992). Nous avons donc ensuite déposé rS3 sur une monocouche de Pi. Au vu des résultats précédents avec la PC, nous avons choisi de déposer l'oléosine sur une couche de Pi comprimée au préalable à 5  $\text{mN.m}^{-1}$  (Figure 93). Des quantités inférieures de rS3 ont été apportées à celles précédemment utilisées, ce qui peut expliquer l'absence d'un point d'inflexion marqué sur l'isotherme de pression vers 27  $\text{mN.m}^{-1}$ . L'apport de rS3 provoque une augmentation de tension immédiate de 6  $\text{mN.m}^{-1}$ . La surface est homogène (vu au BAM), il n'y a pas

formation d'agrégats d'oléosines. Dans les deux cas, les oléosines s'insèrent donc bien dans la monocouche de PLs comprimée en phase « liquide » et il n'y a pas de différences significatives d'interaction des oléosines avec la PC ou avec le Pi.



**Figure 93 : Balance de Langmuir. Dépôt de 70 µg de PLs (Pi en vert, PC en bleu) sur de l'eau à 700 cm<sup>2</sup>. Compression du film jusqu'à 5 mN.m<sup>-1</sup>. 35 µg de rS3 sont déposés sur le film de PLs après 30 min de repos. Poursuite de l'isocycle.**

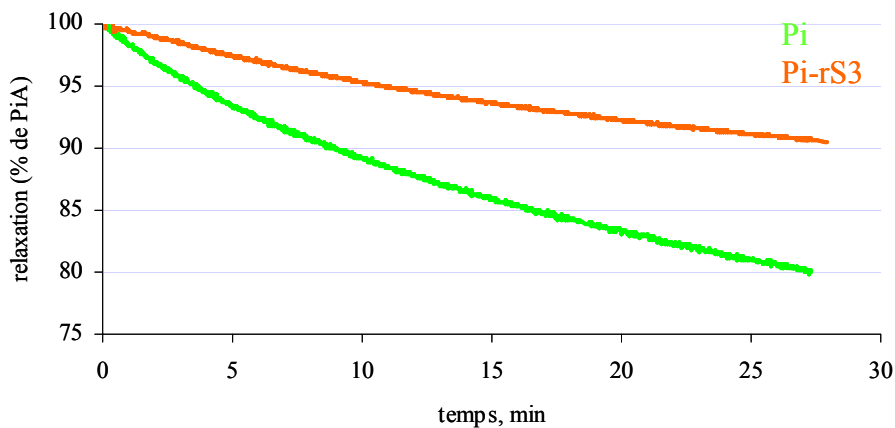
Contrairement à la littérature (voir chapitre 1.4.2), nous n'avons pas pu mettre en évidence ici de différence nette d'interaction des oléosines avec des phospholipides neutres (PC) ou chargés négativement (Pi), ni de différences entre les deux isoformes d'oléosine (Tzen *et al.*, 1998 ; Tai *et al.*, 2002). Ceci peut provenir à la fois de la conformation des oléosines dans le solvant d'apport (une dénaturation de la protéine préalablement à l'adsorption peut donner des propriétés d'émulsion complètement différentes (Rosenberg et Ron, 1999)), mais aussi du pH de la couche inférieure d'eau (pH 5,6). En effet, il est délicat de préparer des tampons suffisamment purs (par filtration) pour remplir toute la balance de Langmuir. Kim *et al.* (2002) n'avaient pas non plus pu mettre en évidence de différence nette de stabilisation des oléosomes artificiels à pH neutre par la PC ou la PS (chargé négativement).



**Figure 94 : Formules chimiques des PLs : PC, PE, Pi et PS à pH neutre.**

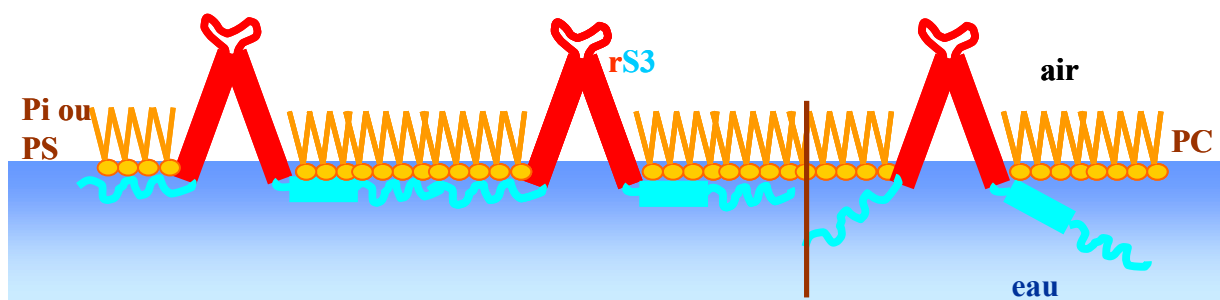
- *Relaxation de la surface*

Le suivi de l'IFT en fonction du temps, hors compressions, est rapporté sur la Figure 95. Ainsi, l'IFT de la monocouche de PLs en phase liquide (après compression à  $5 \text{ mN.m}^{-1}$ ) diminue de 20 % en 30 min. La monocouche se réorganise tout au long des 30 min de pause. Pour des raisons pratiques, nous n'attendons donc pas tout à fait assez longtemps pour avoir une bonne stabilisation de la première couche de PLs avant d'ajouter les protéines. A l'ajout des protéines, nous avons un saut immédiat de pression de  $+ 5 \text{ mN.m}^{-1}$ . Ensuite, l'IFT diminue de moins de 10 % en 30 min. L'effet des oléosines sur la monocouche de PLs semble donc rapide mais une réorganisation des molécules à l'interface a tout de même lieu après le dépôt (Figure 95).



**Figure 95 : Pourcentage de relaxation des couches déposées sur la balance de Langmuir. Dépôt de 70  $\mu\text{g}$  de Pi. Attente 30 min. Compression à  $50 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ . Arrêt à  $5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Début de l'isotherme de relaxation (en vert). Après 30 min, ajout de  $35 \mu\text{g}$  de rS3. Nouvel isotherme de relaxation (en orange sur le graphe) pendant 30 min.**

- Pour la monocouche sur la balance de Langmuir, nous proposons une organisation telle que celle représentée dans la Figure 96 (ou apparentée à la Figure 76 du chapitre 5.5.2). Les oléosines pourraient donc s'intégrer directement dans le globule lipidique (TGs + PLs) après leur biosynthèse. Nous considérons sur la gauche de cette figure que la couche de PLs est constituée de PLs ayant des têtes polaires chargées négativement, tels que Pi et PS. Ces PLs chargés pourraient interagir avec les acides aminés basiques chargés positivement. En présence de PC (partie droite de la figure), les extrémités amphiphiles des oléosines ne sont vraisemblablement pas collées aux PLs, mais plutôt en solution dans l'eau.



**Figure 96 : Hypothèse de l'organisation d'une monocouche de PLs et rS3 sur un film d'eau (balance de Langmuir).**

Actuellement, la composition du corps lipidique d'*A. thaliana* en PLs est mal connue. Il existe de plus d'autres molécules entrant dans la composition des oléosomes : des stérols, d'autres protéines, qui interagissent certainement avec les oléosines et les PLs pour donner les caractéristiques physico-chimiques de surface des oléosomes.

## **Conclusion et perspectives**

Les réserves lipidiques des animaux, des levures et des végétaux sont stockées sous la forme de globules, composés d'un cœur de lipides neutres, entouré d'une demi-membrane de PLs dans laquelle s'insèrent des protéines. Les globules lipidiques des plantes soumises à dessiccation sont résistants à la coalescence lors des cycles de déshydratation / réhydratation des graines. Les oléosines, protéines majoritaires de l'oléosome végétal, jouent certainement un rôle primordial dans cette protection.

Dans une première partie, afin de comparer des globules lipidiques de végétaux et de levures, nous avons isolé les particules lipidiques d'une levure riche en lipides, *Y. lipolytica*, cultivée en présence d'acide oléique et celles d'une plante modèle, *A. thaliana*. Des protocoles de purification des globules lipidiques ont été mis au point. Ils permettent d'obtenir des globules exempts de contamination extérieure à l'organite de réserve lipidique. Des points communs ont été trouvés entre les corps lipidiques des deux organismes. Ils ont des tailles proches de 2  $\mu\text{m}$ , une membrane de PLs composée essentiellement de PC et un cœur de TGs. En revanche, les profils protéiques divergent. Il s'agit majoritairement de quatre isoformes d'oléosines pour l'oléosome d'*A. thaliana*, alors que la composition en protéines de la levure est beaucoup plus complexe et la présence de protéines homologues aux oléosines n'a pas été mise en évidence.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux propriétés de surface aux interfaces des oléosines. Une isoforme d'oléosine d'*A. thaliana* a ainsi été clonée et exprimée chez *Y. lipolytica*. L'insertion du gène ne modifie pas la croissance de la levure et la protéine est correctement adressée au niveau des corps lipidiques de réserve, mais le niveau d'expression reste faible.

Deux oléosines d'*A. thaliana* ont aussi été clonées dans *E. coli*. Les colonies bactériennes sont viables et expriment bien les oléosines. Un protocole de purification a été développé, basé sur l'affinité d'une queue poly-histidine C-terminale de la protéine avec une résine contenant un métal complexé. Du fait des caractéristiques hydrophobes exceptionnelles des oléosines (72 acides aminés hydrophobes contigus dans leur région centrale), elles ont été purifiées en conditions dénaturantes avec de l'urée 8 M à froid (4 °C), à la quasi homogénéité.

Nous avons ensuite su trouver d'autres solvants des oléosines : un mélange TFA / TFE (1 % / 50 %) à froid, un mélange chloroforme / méthanol (95 / 5) à chaud ou encore de l'éthanol dilué à 70 %. Même dans le solvant le plus efficace, le mélange TFA / TFE, les oléosines existent sous la forme de polymères de très haute masse moléculaire.



La diversité des milieux de solubilisation des oléosines nous a permis d'utiliser des techniques variées pour analyser la structure et les propriétés tensioactives des protéines. En tenant compte de la littérature et de considérations telles qu'un segment transmembranaire protéique en hélice  $\alpha$  s'insère en faisant un angle de  $20^\circ$  dans une membrane (Branden et Tooze, 1999), nous proposons deux nouveaux modèles de structure de l'oléosine à la surface de l'oléosome.

Enfin, par des mesures de tension de surface à l'interface de gouttes aqueuses avec de l'huile, nous avons montré que l'une des deux isoformes d'oléosine s'inséraient à une interface eau / huile et qu'elles abaissaient la tension de la surface plus efficacement que la caséine  $\beta$  (protéine connue pour ses propriétés tensioactives). D'autres mesures, en surface plane comprimée, nous ont permis d'établir que les oléosines s'inséraient dans une monocouche de PLs à l'interface eau / air en augmentant significativement la tension de surface. Les oléosines ont donc des caractéristiques de molécules tensioactives et elles sont très efficaces compte-tenu de leur nature uniquement protéique.

D'autres techniques (RMN) vont être utilisées, en complément du DC, pour confirmer et affiner l'hypothèse de structure des oléosines en solution et la répartition des oléosines à une interface va être étudiée par suivi au microscope électronique à transmission d'émission de fluorescence X. Par ailleurs, d'autres isoformes d'oléosines d'*A. thaliana* sont maintenant clonées et exprimées au laboratoire. Il va ainsi être possible de jouer sur le rapport de masse des différentes isoformes entre elles aux interfaces. En effet, *in vivo*, il existe toujours au moins deux isoformes d'oléosines à la surface d'un oléosome, ceci impliquant peut-être la nécessité d'interactions entre les isoformes. Il sera intéressant d'étudier la manière dont les molécules s'agencent entre elles et l'étude de l'influence de la nature des PLs sur leurs interactions avec les oléosines va être poursuivie et élargie aux TGs.

Une modification génétique des plantes oléagineuses pour augmenter leur teneur en oléosines pourrait permettre d'accroître la capacité de stockage des lipides des graines. Cette hypothèse d'une relation entre la quantité d'oléosines et la quantité d'huile stockée devra être vérifiée avant d'être appliquée à la production d'huile végétale.

Les plantes oléagineuses sont des réservoirs de protéines fonctionnelles sous-exploitées. Aujourd'hui, les consommateurs sont à la recherche de produits dits naturels. Ainsi, les oléosines sont utilisées depuis peu dans les industries non alimentaires et pourraient bientôt être utilisées comme agents émulsifiants alimentaires après avoir contrôlé le caractère non allergénique des isoformes envisagées.

# **Bibliographie**

## **Ouvrages imprimés**

STAUFFER C.E., 1999. Emulsifiers. An Eagan press handbook. Practical guides for the food industry. 102 pages. St. Paul, Minnesota, USA.

SCHWEISGUTH B., 1997. La recherche à l'INRA dans la filière « oléagineux ». INRA. 109 pages. Paris, France.

## **Chapitre dans un ouvrage imprimé**

BARTH G. et GAILLARDIN C., 1996. *Yarrowia lipolytica*. p313-388. In : W.K. Wolf (eds), Non-conventional yeasts in biotechnology, vol. 1. Springer-Verlag. Berlin, Germany.

BRANDEN C. et TOOZE J., 1999. Membrane proteins. p223-250. In : Introduction to protein structure. 2<sup>nd</sup> edition. Garland, New York, USA.

BUSSARD L et FRON G., 1905. Tourteaux rares. p203-206. In : Tourteaux de graines oléagineuses. Amat éditeur, Paris, France.

DE GENNES P.-G., BROCHARD-WYART F. et QUÉRÉ D., 2002. Surfactants. p171-188. In : Gouttes, bulles, perles et ondes. Belin, Paris, France.

LINDEN G. et LORIENT D., 1994. Huiles et graisses végétales, composition. p90-91. In : Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole. Masson. Paris, France.

RAWN J.D., 1989. Lipids are transported with proteins as lipoproteins in plasma. p572-579. In : Biochemistry - international edition. Patterson eds. Burlington, North Carolina, USA.

## **Travaux universitaires**

BEAUDOIN F., 1999. Targeting of a sunflower seed oleosin to the endoplasmic reticulum and its implication in the oil body biogenesis. *Thèse de l'université de Paris XI*. 221 p.

BEISSON F., 1999. Étude des oléosomes de plantes et de leur lipolyse. Méthodes de dosage de l'activité des lipases. *Thèse de l'université de la méditerranée*. 154 p.

LANDRY J., 1979. Étude de la zéine, groupe des protéines de réserve du grain de maïs : caractérisation et accumulation. *Thèse du doctorat d'état, université de Paris VI*. 64 p.

## Articles de périodiques imprimés

- ABELL B.M., HOLBROOK L.A., ABENES M., MURPHY D.J., HILLS M.J. et MOLONEY M.M., 1997. Role of the proline knot motif in oleosin endoplasmic reticulum topology and oil body targeting. *Plant Cell*, **9** : 1481-1493.
- ABELL B.M., HIGH S. et MOLONEY M.M., 2002. Membrane protein topology of oleosin is constrained by its long hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.*, **277** : 8602-8610.
- ABENES M., HOLBROOK L. et MOLONEY M.M., 1997. Transient expression and oil body targeting of an *Arabidopsis* oleosin-GUS reporter fusion protein in a range of oilseed embryos. *Plant Cell Rep.*, **17** : 1-7.
- ADOGA G.I. et MATTEY M., 1979. Properties of an extracellular peptide with esterase activity produced by *Candida lipolytica*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **6** : 61-63.
- AGUEDO M., WACHE Y., MAZOYER V., SEQUEIRA-LE GRAND A. et BELIN J.-M., 2003. Increased electron donor and electron acceptor characters enhance the adhesion between oil droplets and cells of *Yarrowia lipolytica* as evaluated by a new cytometric assay. *J. Agric. Food Chem.*, **7** : 3007-3011.
- ALEXANDER L.G., SESSIONS R.B., CLARKE A.R., TATHAM A.S., SHEWRY P.R. et NAPIER J.A., 2002. Characterization and modelling of the hydrophobic domain of a sunflower oleosin. *Planta*, **214** : 546-551.
- ALVES FERREIRA M., DE ALMEIDA ENGLER J., MIGUENS F.C., VAN MONTAGU M., ENGLER G., DE OLIVEIRA D.E., 1997. Oleosin gene expression in *Arabidopsis thaliana* tapetum coincides with accumulation of lipids in plastids and cytoplasmic bodies. *Plant Physiol. Biochem.*, **35** : 729-739.
- ATHENSTAEDT K., ZWEYTICK D., JANDROSITZ A., KOHLWEIN S.D. et DAUM G., 1999. Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **181** : 6441-6448.
- ATTAIE R. et RICHER R.L., 2000. Size distribution of fat globules in goat milk. *J. Dairy Sci.*, **83** : 940-944.
- AU D.M.Y., KANG A.S. et MURPHY D.J., 1989. Low-resolution epitope characterisation in a family of seed apolipoproteins using polyclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1005** : 97-102.
- BANAS A., DAHLQVIST A., DEBSKI H., GUMMESON P.-O. et STYMNE S., 2000. Accumulation of storage products in oat during kernel development. *Biochem. Soc. Trans.*, **28** : 705-707.

BANAT I.M., 2000. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. *Biofutur*, **198** : 44-47.

BEAUDOIN F., LACEY D.J. et NAPIER J.A., 1999. The biogenesis of the plant seed oil body: oleosin protein is synthesised by ER-bound ribosomes. *Plant Physiol. Biochem.*, **37** : 481-490.

BEAUDOIN F. et NAPIER J.A., 2000. The targeting and accumulation of ectopically expressed oleosin in non-seed tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **210** : 439-445.

BEAUDOIN F., WILKINSON B.M., STIRLING C.J. et NAPIER J.A., 2000. In vivo targeting of a sunflower oil body protein in yeast secretory (sec) mutants. *Plant J.*, **23** : 159-170.

BEAUDOIN F. et NAPIER J.A., 2002. Targeting and membrane-insertion of a sunflower oleosin in vitro and *Saccharomyces cerevisiae*: the central hydrophobic domain contains more than one signal sequence, and directs oleosin insertion into the endoplasmic reticulum membrane using a signal anchor sequence mechanism. *Planta*, **215** : 293-303.

BEISSON F., FERTÉ N. et NOAT G., 1996. Oil-bodies from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Biochem. J.*, **317** : 955-958.

BEISSON F., FERTÉ N., BRULEY S., VOULTOURY R., VERGER R. et ARONDEL V., 2001 a. Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1531** : 47-58.

BEISSON F., FERTÉ N., VOULTOURY R. et ARONDEL V., 2001 b. Large scale purification of an almond oleosin using an organic solvent procedure. *Plant Physiol. Biochem.*, **39** : 1-8.

BENZONANA G. et DESNUELLE P., 1965. Étude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycerides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta*, **105** : 121-136.

BOOTHE J.G., SAPONJA J.A. et PARMENTER D.L., 1997. Molecular farming in plants: oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Dev. Res.*, **42** : 172-181.

BOS M.A. et VAN VLIET T., 2001. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Adv Colloid Interface Sci.*, **91** : 437-471.

BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72** : 248-254.

BROEKHUYSE R.M., 1968. Phospholipids in tissues of the eye. Isolation, characterization and quantitative analysis by two-dimensional thin-layer chromatography of diacyl and vinyl-ether phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **152** : 307-315.

- BROUN P., GETTNER S. et SOMERVILLE C., 1999. Genetic engineering of plant lipids. *Annu. Rev. Nutr.*, **19** : 197-216.
- CAMERON D.R., COOPER D.G. et NEUFELD R.J., 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** : 1420-1425.
- CHAUDARY S., PARMENTER D.L. et MOLONEY M.M., 1998. Transgenic *Brassica carinata* as a vehicle for the production of recombinant proteins in seeds. *Plant Cell Rep.*, **17** : 195-200.
- CHEN E.C.F., LIN R.-H., HUANG H.-C. et TZEN J.T.C., 1997. Cloning expression and isoform classification of a minor oleosin in sesame oil bodies. *J. Biochem.*, **122** : 819-824.
- CHEN E.C.F., TAI S.S.K., PENG C.-C. et TZEN J.T.C., 1998. Identification of three novel unique proteins in seed oil bodies of sesame. *Plant Cell Physiol.*, **39** : 935-941.
- CHEN J.C.F., TSAI C.C.Y. et TZEN J.T.C., 1999. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol.*, **40** : 1079-1086.
- CHEN J.C.F. et TZEN J.T.C., 2001. An *in vitro* system to examine the effective phospholipids and structural domain for protein targeting to seed oil bodies. *Plant Cell Physiol.*, **42** : 1245-1252.
- CHRISTIANSEN K. et JENSEN P.K., 1972. Membrane-bound lipid particles from beef heart chemical composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta*, **260** : 449-459.
- CIRIGLIANO M.C. et CARMAN G.M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48** : 747-750.
- CIRIGLIANO M.C. et CARMAN G.M., 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50** : 846-850.
- CLAUSEN M.K., CHRISTIANSEN K., JENSEN P.K. et BEHNKE O., 1974. Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Lett.*, **43** : 176-179.
- CUMMINS I., HILLS M.J., ROSS J.H.E., HOBBS D.H., WATSON M.D. et MURPHY D., 1993. Differential, temporal and spatial expression of genes involved in storage oil and oleosin accumulation in developing rapeseed embryos: implications for the role of oleosins and the mechanisms of oil-body formation. *Plant Mol. Biol.*, **23** : 1015-1027.
- DANTHINE S., BLECKER C., PAQUOT M., INNOCENTE N. et DEROANNE C., 2000. Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Lait*, **80** : 209-222.

DAUM G., BÖHNI P.C. et SCHATZ G., 1982. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome *b*<sub>2</sub> and cytochrome *c* peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **257** : 13028-13033.

DELEU M., PAQUOT M., JACQUES P., THONART P., ADRIAENSEN Y. et DUFRENE Y.F., 1999. Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers. *Biophys. J.*, **77** : 2304-2310.

DELOBETTE H., FRIRY A., PLEWNIAK F. et EGLY J.-M., 1991. Le dosage des protéines. *Technoscope Biofutur*, **41** : 3-11.

DE OLIVEIRA, 1993. Inflorescence-specific genes from *Arabidopsis thaliana* encoding glycine-rich proteins. *Plant J.*, **3** : 495-507.

DESAI J.D. et BANAT I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61** : 47-64.

DOMINGUEZ A., FERMINAN E., SANCHEZ M., GONZALEZ F.J., PEREZ-CAMPO F.M., GARCIA S., HERRERO A.B., SAN VICENTE A., CABELLO J., PRADO M., IGLESIAS F.J., CHOUPINA A., BURGUILLO F.J., FERNANDEZ-LAGO L. et LOPEZ M.C., 1998. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *Int. Microbiol.*, **1** : 131-142.

DUBNOVITSKY A.P., KRAVCHUK Z.I., CHUMANEVICH A.A., COZZI A., AROSIO P. et MARTSEV S.P., 2000. Expression, refolding, and ferritin-binding activity of the isolated VL-domain of monoclonal antibody F11. *Biochemistry (Mosc)*, **65** : 1196-1204.

FERNANDEZ D.E. et STAEHELIN L.A., 1987. Does gibberellic acid induce the transfer of lipase from protein bodies in barley aleurone cells? *Plant Physiol.*, **85** : 487-496.

FEUSSNER I., WASTERNACK C., KINDL H. et KÜHN H., 1995. Lipxygenase-catalysed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92** : 11849-11853.

FEUSSNER I., BALKENHOHL T.J., PORZEL A., KÜHN H. et WASTERNACK C., 1997. Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. Implication of lipid body lipxygenase in lipid mobilization during germination. *J. Biol. Chem.*, **272** : 21635-21641.

FIECHTER A., 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.*, **10** : 208-217.

FOLCH J., LEES M. et SLOANE STANLEY G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226** : 497-509.

FOSTER E., SCHNEIDERMAN D., CLOUTIER M., GLEDDIE S. et ROBERT L.S., 2002. Modifying the pollen coat protein composition in *Brassica*. *Plant J.*, **31** : 477-486.

FRANDBSEN G.I., MÜLLER-URIS F., NIELSEN M., MUNDY J. et SKRIVER K., 1996. Novel plant Ca<sup>2+</sup>-binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. *J. Biol. Chem.*, **271** : 343-348.

FRANDBSEN G.I., MUNDY J. et TZEN J.T.C., 2001. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol. Plant.*, **112** : 301-307.

FROESE C.D., NOWACK L., CHOLEWA E. et THOMSON J.E., 2003. Molecular composition and surface properties of storage lipid particles in wax bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Plant Physiol.*, **160** : 215-25.

GAILLARDIN C. et HESLOT H., 1987. La levure. *La Recherche*, **18** : 586-601.

GAILLARDIN C. et HESLOT H., 1988. Genetic engineering in *Yarrowia lipolytica*. *J. Basic Microbiol.*, **3** : 161-174.

GALILI G., SENGUPTA-GOPALAN C. et CERIOTTI A., 1998. The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Mol. Biol.*, **38** : 1-29.

GIDDINGS G., ALLISON G., BROOKS D. et CARTER A., 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.*, **18** : 1151-1155.

GRANGEMARD I., WALLACH J., MAGET-DANA R. et PEYPOUX F., 2001. Lichenysin. A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **90** : 199-210.

GRAU A., GOMEZ FERNANDEZ J.C., PEYPOUX F. et ORTIZ A., 1999. A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **1418** : 307-319.

GREENBERG A.S., EGAN J.J., WEK S.A., GARTY N.B., BLANCHETTE-MACKIE E.J. et LONDOS C., 1990. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.*, **266** : 11341-11346.

GREENBERG A.S., EGAN J.J., WEK S.A., MOOS M.C., LONDOS C. et KIMMEL A.R., 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90** : 12035-12039.

GREENSPAN P., MAYER E.P., FOWLER S.D., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.*, **100** : 965-973.

GUPTA R. et MURALIDHARA H.S., 2001. Interfacial challenges in the food industry: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, **12** : 382-391.



- HABA E., ESPUNY M.J., BUSQUETS M. et MANRESA A., 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.*, **88** : 379-387.
- HADEBALL W., 1991. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. I. Lipases from yeasts (Review). *Acta Biotechnol.*, **11** : 159-167.
- HARBURY P.B., ZHANG T., KIM P.S. et ALBER T., 1993. A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science*, **262** : 1401-1407.
- HARZALLAH B., AGUIE-BEGHIN V., DOUILLARD R. et BOSIO L., 1998. A structural study of  $\beta$ -casein adsorbed layers at the air-water interface using X-ray and neutron reflectivity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **23** : 73-84.
- HAYS D.B., WILEN R.W., SHENG C., MOLONEY M.M. et PHARIS R., 1999. Embryo-specific gene expression in microspore-derived embryos of *Brassica napus*. An interaction between abscisic acid and jasmonic acid. *Plant Physiol.*, **119** : 1065-1072.
- HEERKLOTZ H. et SEELIG J., 2001. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophys. J.*, **81** : 1547-1554.
- HERMAN E.M., 1987. Immunogold-localization and synthesis of an oil-body membrane protein in developing soybean seeds. *Planta*, **172** : 336-345.
- HERNANDEZ-PINZON I., ROSS J.H.E., BARNES K.A., DAMANT A.P. et MURPHY D.J., 1999. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta*, **208** : 588-598.
- HERNANDEZ-PINZON I., PATEL K. et MURPHY D.J., 2001. The *Brassica napus* calcium-binding protein, caleosin, has distinct endoplasmic reticulum- and lipid body-associated isoforms. *Plant Physiol. Biochem.*, **39** : 615-622.
- HEVONOJA T., PENTIKÄINEN M.O., HYVÖNEN M.T., KOVANEN P.T. et ALAKORPELA M., 2000. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta*, **1488** : 189-210.
- HIDALGO F.J., ALAIZ M. et ZAMORA R., 2001. Determination of peptides and proteins in fats and oils. *Anal. Chem.*, **73** : 698-702.
- HIGGINS C.F. et LINTON K.J., 2001. The xyz of ABC transporters. *Science*, **293** : 1782-1784.
- HILLS M.J. et MURPHY D.J., 1988. Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid-free oilseed-rape (*Brassica napus*) cotyledons. *Biochem. J.*, **249** : 687-693.

HILLS M.J., WATSON M.D. et MURPHY D.J., 1993. Targeting of oleosins to the oil bodies of oilseed rape (*Brassica napus L.*). *Planta*, **189** : 24-29.

HOFFMAN et WINSTON, 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57** : 267-272.

HOPE R.G., MURPHY D.J. et McLAUCHLAN J., 2002. The domains required to direct core proteins of hepatitis C virus and GB virus-B to lipid droplets share common features with plant oleosin proteins. *J. Biol. Chem.*, **277** : 4261-4270.

HOPPE A. et THEIMER R.R., 1997. Degradation of oil bodies isolated from cotyledons during germination of rapeseed seedlings. *J. Plant Physiol.*, **151** : 471-478.

HUANG A.H.C., 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43** : 177-200.

HUANG A.H.C., 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.*, **110** : 1055-1061.

JACKS T.J., HENSARLING T.P., NEUCERE J.N., YATSU L.Y. et BARKER R.H., 1990. Isolation and physicochemical characterization of the half-unit membranes of oilseed lipid bodies. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **67** : 353-361.

JUUL B., TURC H., DURAND M.-L., GOMEZ de GRACIA A., DENOROY L., VUUST M.J., CHAMPEIL P. et le MAIRE M., 1995. Do transmembrane segments in proteolyzed sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase retain their functional  $Ca^{2+}$  binding properties after removal of cytoplasmic fragments by proteinase K ?. *J. Biol. Chem.*, **270** : 20123-20134.

KADERBHAI M.A., BARNFIELD T., REAMES T., GILES Y., GALLAGHER J. et MERCER E.I., 1990. Temporal changes in the expression of oleosome polypeptides from endosperms of germinating castor beans. *Biochem. Soc. Trans.*, **18** : 1162-1163.

KALINSKI A., LOER D.S., WEISEMANN J.M., MATTHEWS B.F. et HERMAN E.M., 1991. Isoforms of soybean seed oil body membrane protein 24 kDa oleosin are encoded by closely related cDNAs. *Plant Mol. Biol.*, **17** : 1095-1098.

KEDDIE J.S., HÜBNER G., SLOCOMBE S.P., JARVIS R.P., CUMMINS I., EDWARDS E.-W., SHAW C.H. et MURPHY D.J., 1992. Cloning and characterization of an oleosin gene from *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, **19** : 443-453.

KEESLER G.A., LASTER S.M. et PARKS L.W., 1992. A defect in the sterol: steryl ester interconversion in a mutant of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1123** : 127-132.

KIM H.U., HSIEH K., RATNAYAKE C. et HUANG A.H.C., 2002. A novel group of oleosins is present inside the pollen of *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **277** : 22677-22684.

KNOTT T.J., PEASE R.J., POWELL L.M., WALLIS S., RALL S.C., INNERARITY T.L., BLACKHART B., TAYLOR W.H., MARCEL Y., MILNE R., JOHNSON D., FULLER M., LUSIS A.J., McCARTHY B.J., MAHLEY R.W., LEVY-WILSON B. et SCOTT J., 1986. Complete protein sequence and identification of structural domains of human apolipoprotein B. *Nature*, **323** : 734-738.

KYTE et DOOLITTLE, 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157** : 105-132.

LACEY D.J., WELLNER N., BEAUDOIN F., NAPIER J.A. et SHEWRY P.R., 1998 a. Secondary structure of oleosins in oil bodies isolated from seeds of safflower (*Carthamus tinctorius L.*) and sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Biochem. J.*, **334** : 469-477.

LACEY D.J., BEAUDOIN F., DEMPSEY C.E., SHEWRY P.R. et NAPIER J.A., 1998 b. The accumulation of triacylglycerols within the endoplasmic reticulum of developing seeds of *Helianthus annuus*. *Plant J.*, **17** : 397-405.

LASIC D.D., 1988. The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.*, **256** : 1-11.

LAURIERE M., 1993. A semidry electroblotting system efficiently transfers both high and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal. Biochem.*, **212** : 206-211.

LEBER R., ZINSER E., ZELLNIG G., PALTAUF F. et DAUM G., 1994. Characterization of the lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10** : 1421-1428.

LEBER R., LANDL K., ZINSER E., AHORN H., SPÖK A., KOHLWEIN S.D., TURNOWSKY F. et DAUM G., 1998. Dual localization of squalene epoxidase, Erg1p, in yeast reflects a relationship between the endoplasmic reticulum and lipid particles. *Mol. Biol. Cell*, **9** : 375-386.

LEE K. et HUANG A.H.C., 1994. Genes encoding oleosins in maize kernel of inbreds Mo17 and B73. *Plant Mol. Biol.*, **26** : 1981-1987.

LEE K., RATNAYAKE C. et HUANG A.H.C., 1995. Genetic dissection of the co-expression of genes encoding the two isoforms of oleosins in the oil bodies of maize kernel. *Plant J.*, **7** : 603-611.

LEE W.S., TZEN J.T.C., KRIDL J.C., RADKE S.E. et HUANG A.H.C., 1991. Maize oleosin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the maize oleosin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88** : 6181-6185.

LEPRINCE O., VAN AELST A.C., PRITCHARD H.W. et MURPHY D.J., 1997. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and -sensitive oilseeds. *Planta*, **204** : 109-119.

- LI M., SMITH L.J., CLARK D.C., WILSON R. et MURPHY D.J., 1992. Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds. *J. Biol. Chem.*, **267** : 8245-8253.
- LI M., KEDDIE J.S., SMITH L.J., CLARK D.C. et MURPHY D.J., 1993. Expression and characterization of the N-terminal domain of an oleosin protein from sunflower. *J. Biol. Chem.*, **268** : 17504-17512.
- LI M., MURPHY D.J., LEE K.K.H., WILSON R., SMITH L.J., CLARK D.C. et SUNG J.Y., 2002. Purification and structural characterization of the central hydrophobic domain of oleosin. *J. Biol. Chem.*, **277** : 37888-37895.
- LIN L.-J., TAI S.S.K., PENG C.-C. et TZEN J.T.C., 2002. Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies. *Plant Physiol.*, **128** : 1200-1211.
- LIN Y.-H. et HUANG A.H.C., 1984. Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings. *Plant Physiol.*, **76** : 719-722.
- LIU Y., ENGELMAN D.M. et GERSTEIN M., 2002. Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs. *Genome Biol.*, **3** : research0054.1-0054.12.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.
- LUO Y.-S., WANG H.-J., GOPALAN K.V., SRIVASTAVA D.K., NICAUD J.-M. et CHARDOT T., 2000. Purification and characterization of the recombinant form of acyl coA oxidase 3 from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **384** : 1-8.
- MAGET-DANA R., 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1462** : 109-140.
- MATSUI K., HIJIYA K., TABUCHI Y. et KAJIWARA T., 1999. Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiol.*, **119**: 1279-1287.
- MAYFIELD J.A. et PREUSS D., 2000. Rapid initiation of *Arabidopsis* pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat. Cell Biol.*, **2** : 128-130.
- MAYFIELD J.A., FIEBIG A., JOHNSTONE S.E. et PREUSS D., 2001. Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science*, **292** : 2482-2485.
- MAZHAR H., QUAYLE R., FIDO R.J., STOBART A.K., NAPIER J.A. et SHEWRY P.R., 1998. Synthesis of storage reserves in developing seeds of sunflower. *Phytochemistry*, **48** : 429-432.

- MEYLHEUC T., HERRY J.-M. et BELLON-FONTAINE M.-N., 2001. Les biosurfactants, des biomolécules à forte potentialité d'application. *Sci. Aliments*, **21** : 591-649.
- MICHALSKI M.-C., BRIARD V. et MICHEL F., 2001. Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements. *Lait*, **81** : 787-796.
- MILIONI D., FRANZ G., SUNG R. et HATZOPOULOS P., 2001. Gene expression during heat-shock in embryogenic carrot cell lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **65** : 221-228.
- MILLICHIP M., TATHAM A.S., JACKSON F., GRIFFITHS G., SHEWRY P.R. et STOBART A.K., 1996. Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Biochem. J.*, **314** : 333-337.
- MITRAKI A. et KING J., 1989. Protein folding intermediates and inclusion body formation. *Bio/technology*, **7** : 690-697.
- MORAN A.C., OLIVERA N., COMMENDATORE M., ESTEVES J.L. et SINERIZ F., 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation*, **11** : 65-71.
- MORIKAWA M., HIRATA Y. et IMANAKA T., 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1488** : 211-218.
- MORRISON W.R. et SMITH L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, **5** : 600-608.
- MULLIGAN C.N., YONG R.N. et GIBBS B.F., 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. Haz. Materials*, **85** : 111-125.
- MURPHY D.J. et CUMMINS I., 1989. Seed oil bodies: isolation, composition and role of oil-body apolipoproteins. *Phytochem.*, **28** : 2063-2069.
- MURPHY D.J., CUMMINS I. et KANG A.S., 1989. Immunological investigation of lipases in germinating oilseed rape, *Brassica napus*. *J. Sci. Food Agric.*, **47** : 21-31.
- MURPHY D.J., 1990. Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog. Lip. Res.*, **29** : 299-324.
- MURPHY D.J., KEEN J.N., O'SULLIVAN J.N., AU D.M.Y., EDWARDS E.-W., JACKSON P.J., CUMMINS I., GIBBONS T., SHAW C.H. et RYAN A.J., 1991. A class of amphipatic proteins associated with lipid storage bodies in plants. Possible similarities with animal serum apolipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1088** : 86-94.
- MURPHY D.J. et ROSS J.H.E., 1998. Biosynthesis, targeting and processing of oleosin-like proteins, which are major pollen coat components in *Brassica napus*. *Plant J.*, **13** : 1-16.
- MURPHY D.J., 1999. Production of novel oils in plants. *Curr. Op. Biotechnol.*, **10** : 175-180.

- MURPHY D.J. et VANCE J., 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.*, **24** : 109-115.
- MURPHY D.J., HERNANDEZ-PINZON I., PATEL K., HOPE R.G. et McLAUCHLAN J., 2000. New insights into the mechanisms of lipid-body biogenesis in plants and other organisms. *Biochem. Soc. Trans.*, **28** : 710-711.
- MURPHY D.J., HERNANDEZ-PINZON I. et PATEL K., 2001. Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues. *J. Plant Physiol.*, **158** : 471-478.
- MURPHY D.J., 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lip. Res.*, **40** : 325-438.
- NAESTED H., FRANSEN G.I., JAUH G.-Y., HERNANDEZ-PINZON I., NIELSEN H.B., MURPHY D.J., ROGERS J.C. et MUNDY J., 2000. Caleosins: Ca<sup>2+</sup>-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol. Biol.*, **44** : 463-476.
- NAKAI S., 1983. Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *J. Agric. Food Chem.*, **31** : 676-683.
- NAOT D., HOLLAND D., AVSIAN-KRETCHMER O., ESHDAT Y. et BEN-HAYYIM G., 1995. Induction of a gene encoding an oleosin homologue in cultured citrus cells exposed to salt stress. *Gene*, **161** : 171-173.
- NEUHOFF V., AROLD N., TAUBE D. et EHRARDT W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9** : 255-262.
- NICAUD J.M., MADZAK C., Van den BROEK P., GYSLER C., DUBOC P., NIEDERBERGER P. et GAILLARDIN C., 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEM Yeast Res.*, **2** : 371-379.
- OHLROGGE J.B., 1994. Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.*, **104** : 821-826.
- PARMENTER D.L., BOOTHE J.G., VAN ROOIJEN G.J.H., YEUNG E.C. et MOLONEY M.M., 1995. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol.*, **29** : 1167-1180.
- PATEL M.N. et GOPINATHAN K.P., 1986. Lysozyme-sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52** : 1224-1226.
- PENG C.-C. et TZEN J.T.C., 1998. Analysis of the three essential constituents of oil bodies in developing sesame seeds. *Plant Cell Physiol.*, **39** : 35-42.

PIFFANELLI P., ROSS J.H.E. et MURPHY D.J., 1998. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant Reprod.*, **11** : 65-80.

PLANT A.L., VAN ROOIJEN G.J.H., ANDERSON C.P. et MOLONEY M.M., 1994. Regulation of an *Arabidopsis* oleosin gene promoter in transgenic *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, **25** : 193-205.

PONS L., OLSZEWSKI A. et GUEANT J.-L., 1998. Characterization of the oligomeric behavior of a 16,5 kDa peanut oleosin by chromatography and electrophoresis of the iodinated form. *J. Chromatogr. B*, **706** : 131-140.

PONS L., CHERY C., ROMANO A., NAMOUR F., ARTESANI M.C. et GUEANT J.-L., 2002. The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy*, **57** : 88-93.

QU R. et HUANG A.H.C., 1990. Oleosin KD 18 on the surface of oil bodies in maize. Genomic and cDNA sequences and the deduced protein structure. *J. Biol. Chem.*, **265** : 2238-2243.

RADETZKY R. et LANGHEINRICH U., 1994. Induction of accumulation and degradation of the 18.4-kDa oleosin in a triacylglycerol-storing cell culture of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Planta*, **194** : 1-8.

RATNAYAKE C. et HUANG A.H.C., 1996. Oleosins and oil bodies in plant seeds have postulated structures. *Biochem. J.*, **317** : 955-958.

RAZAFINDRALAMBO H., POPINEAU Y., DELEU M., HBID C., JACQUES P., THONART P. et PAQUOT M., 1998. Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* : effect of lipid and peptide structural attributes. *J. Agric. Food Chem.*, **46** : 911-916.

RENSEN P.C.N., REMCO L.A., KUIPER J., BIJSTERBOSCH M.K., BIESSEN E.A.L., VAN BERKEL T.J.C., 2001. Recombinant lipoproteins: lipoprotein-like lipid particles for drug targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47** : 251-276.

RODRIGUEZ NINO M.R., SANCHEZ C.C. et RODRIGUEZ PATINO J.M., 1999. Interfacial characteristics of  $\beta$ -casein spread films at the air-water interface. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **12** : 161-173.

ROMANOS M.A., SCORER C.A. et CLARE J.J., 1992. Foreign gene expression in yeast : a review. *Yeast*, **8** : 423-488.

RON E.Z. et ROSENBERG E., 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, **3** : 229-236.

ROSEMAN M. et JENCKS W.P., 1974. Interactions of urea and other polar compounds in water. *J. Amer. Chem. Soc.*, **97** : 631-639.

ROSENBERG E. et RON E.Z., 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52** : 154-162.

ROSENTHAL A., PYLE D.L. et NIRANJAN K., 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzym. Microb. Technol.*, **19** : 402-420.

ROSS J.H.E., SANCHEZ J., MILLAN F. et MURPHY D.J., 1993. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*). *Plant Sci.*, **93** : 203-210.

ROSS J.H.E. et MURPHY D.J., 1996. Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae. *Plant J.*, **9** : 625-637.

ROUX E., CANONGE M., BOUCHEZ-MAHIOUT I., LAURIERE M. et CHARDOT T., 2003. Les oléosines. *CICBAA Alim'Inter*, **8** : 91-92.

RUITER R.K., VAN ELDIK G.J., VAN HERPEN R.M.A., SCHRAUWEN J.A.M. et WULLEMS G.J., 1997. Characterization of oleosins in the pollen coat of *Brassica oleracea*. *Plant Cell*, **9** : 1621-1631.

RUUSKA S.A., GIRKE T., BENNING C. et OHLROGGE J.B., 2002. Contrapuntal networks of gene expression during *Arabidopsis* seed filling. *Plant Cell*, **14** : 1191-1206.

SACHETTO-MARTINS G., FRANCO L.O. et DE OLIVEIRA D.E., 2000. Plant glycine-rich proteins : a family or just proteins with a common motif. *Biochim. Biophys. Acta*, **1492** : 1-14.

SADEGHIPOUR H.R. et BHATLA S.C., 2002. Differential sensitivity of oleosins to proteolysis during oil body mobilization in sunflower seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **43** : 1117-1126.

SARMIENTO C., ROSS J.H.E., HERMAN E. et MURPHY D.J., 1997. Expression and subcellular targeting of a soybean oleosin in transgenic rapeseed. Implications for the mechanism of oil-body formation in seeds. *Plant J.*, **11** : 783-796.

SARUBBO L.A., PORTO A.L.F. et CAMPOS-TAKAKI G.M., 1999. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Can. J. Microbiol.*, **45** : 423-426.

SCHÄFER F., BLÜMER J., RÖMER U. et STEINERT K., 2000. Ni-NTA for large-scale IMAC processes – Systematic investigation of separation characteristics, storage and CIP conditions, and leaching. *QIAGEN news*, **4** : 11-15.



SCHIMEK C., EIBEL P., GROLIG F., HORIE T., OOTAKI T. et GALLAND P., 1999. Gravitropism in *Phycomyces*: a role for sedimenting protein crystals and floating lipid globules. *Planta*, **210** : 132-142.

SEGREST J.P., LI L., ANATHARAMAIAH G.M., HARVEY S.C., LIADAKI K.N. et ZANNIA V., 2000. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.*, **11** : 105-115.

SENES A., GERSTEIN M. et ENGELMAN D.M., 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with  $\beta$ -branched residues at neighboring positions. *J. Mol. Biol.*, **296** : 921-936.

SHEPHERD R., ROCKEY J., SUTHERLAND I.W. et ROLLER S., 1995. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.*, **40** : 207-217.

SILVIUS J.R., 1992. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21** : 323-348.

SIVARAM P., CHOI S.Y., CURTISS L.K. et GOLDBERG I.J., 1994. An amino-terminal fragment of apolipoprotein B binds to lipoprotein lipase and may facilitate its binding to endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **269** : 9409-9412.

SLACK C.R., BERTAUD W.S., SHAW B.D., HOLLAND R., BROWSE J. et WRIGHT H., 1980. Some studies on the composition and surface properties of oil bodies from the seed cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius*) and linseed (*Linum usitatissimum*). *Biochem. J.*, **190** : 551-561.

SOULIÉ S., de FORESTA B., MØLLER J.V., BLOOMBERG G.B., GROVES J.D. et le MAIRE M., 1998. Spectroscopic studies of the interaction of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-peptides with dodecyl maltoside and its brominated analog. *Eur. J. Biochem.*, **257** : 216-227.

SUIRE C., BOUVIER F., BACKHAUS R.A., BÉGU D., BONNEU M. et CAMARA B., 2000. Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a new role of oil bodies. *Plant Physiol.*, **124** : 971-978.

TAI S.S.K., CHEN M.C.M., PENG C.-C. et TZEN J.T.C., 2002. Gene family of oleosin isoforms and their structural stabilization in sesame seed oil bodies. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66** : 2146-2153.

THOYTS P.J.E., MILLICHIP M.I., STOBART A.K., GRIFFITHS W.T., SHEWRY P.R. et NAPIER J.A., 1995. Expression and in vitro targeting of a sunflower oleosin. *Plant Mol. Biol.*, **29** : 403-410.

TING J.T.L., LEE K., RATNAYAKE C., PLATT K.A., BALSAMO R.A. et HUANG A.H.C., 1996. Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively

expressed independent of oil contents. Size and shape of intracellular oil bodies are determined by the oleosins/oils ratio. *Planta*, **199** : 158-165.

TING J.T.L., BALSAMO R.A., RATNAYAKE C. et HUANG A.H.C., 1997. Oleosin of plant seed oil bodies is correctly targeted to the lipid bodies in transformed yeast. *J. Biol. Chem.*, **272** : 3699-3706.

TING J.T.L., WU S.S.H., RATNAYAKE C. et HUANG A.H.C., 1998. Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. *Plant J.*, **16** : 541-551.

TORABIZADEH H., SHOJAOSADATI S.A. et TEHRANI H.A., 1996. Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **29** : 734-737.

TOREN A., SEGAL G., RON E.Z. et ROSENBERG E., 2002. Structure-function studies of the recombinant protein bioemulsifier AInA. *Environ. Microbiol.*, **4** : 257-261.

TRIPP B.C., MAGDA J.J. et ANDRADE J.D., 1995. Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension : concentration dependence, mass-transfer considerations, and adsorption kinetics. *J. Colloid Interface Sci.*, **173** : 16-27.

TZEN J.T.C., LAI Y.-K., CHAN K.-L. et HUANG A.H.C., 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiol.*, **94** : 1282-1289.

TZEN J.T.C. et HUANG A.H.C., 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J. Cell Biol.*, **117** : 327-335.

TZEN J.T.C., LIES G.C. et HUANG A.H.C., 1992. Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J. Biol. Chem.*, **267** : 15626-15634.

TZEN J.T.C., CAO Y.-Z., LAURENT P., RATNAYAKE C. et HUANG A.H.C., 1993. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.*, **101** : 267-276.

TZEN J.T.C., PENG C.-C., CHENG D.-J., CHEN E.C.F. et CHIU J.M.H., 1997. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. *J. Biochem.*, **121** : 762-768.

TZEN J.T.C., CHUANG R.L.C., CHEN J.C.F. et WU L.S.H., 1998. Coexistence of both oleosin isoforms on the surface of seed oil bodies and their individual stabilization to the organelles. *J. Biochem.*, **123** : 318-323.

VALENCIA-TURCOTTE L. et RODRIGUEZ-SOTRES R., 2001. The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1534** : 14-26.

VANCE V.B. et HUANG A.H.C., 1987. The major protein from lipid bodies of maize. Characterization and structure based on cDNA cloning. *J. Biol. Chem.*, **262** : 11275-11279.

VAN ROOIJEN G.J.H., TERNING L.I. et MOLONEY M.M., 1992. Nucleotide sequence of an *Arabidopsis thaliana* oleosin gene. *Plant Mol. Biol.*, **18** : 1177-1179.

VAN ROOIJEN G.J.H. et MOLONEY M.M., 1995 a. Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Bio/Technology*, **13** : 72-77.

VAN ROOIJEN G.J.H. et MOLONEY M.M., 1995 b. Structural requirements of oleosin domains for subcellular targeting to the oil body. *Plant Physiol.*, **109** : 1353-1361.

WAHLROOS T., SOUKKA J., DENESYUK A., WAHLROOS R., KORPELA T. et KILBY N.J., 2003. Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells. *Genesis*, **35** : 125-32.

WALTER A., KUEHL G., BARNES K. et VANDERWAERDT G., 2000. The vesicle-to-micelle transition of phosphatidylcholine vesicles induced by nonionic detergents: effects of sodium chloride, sucrose and urea. *Biochim. Biophys. Acta*, **1508** : 20-33.

WANG C., CROFT K.P.C., JÄRLFORS U. et HILDEBRAND D.F., 1999. Subcellular localization studies indicate that lipooxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. *Plant Physiol.*, **120** : 227-235.

WANG S.-M. et HUANG A.H.C., 1987. Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernel. *J. Biol. Chem.*, **262** : 2270-2274.

WANG T.-W., BALSAMO R.A., RATNAYAKE C., PLATT K.A., TING J.T.L. et HUANG A.H.C., 1997. Identification, subcellular localization, and developmental studies of oleosins in the anther of *Brassica napus*. *Plant J.*, **11** : 475-487.

WANNER G. et THEIMER R.R., 1978. Membranous appendices of spherosomes (Oleosomes). Possible role in fat utilization in germinating oil seeds. *Planta*, **140** : 163-169.

WETLAUFER D.B., MALIK S.K., STOLLER L. et COFFIN R.L., 1964. Nonpolar group participation in the denaturation of proteins by urea and guanidinium salts. Model compound studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **86** : 508-514.

WU L.S.H., WANG L.-D., CHEN P.-W., CHEN L.-J. et TZEN J.T.C., 1998. Genomic cloning of 18 kDa oleosin and detection of triacylglycerols and oleosin isoforms in maturing rice and postgerminative seedlings. *J. Biochem.*, **123** : 386-391.

- WU L.S.H., HONG G.H.H., HOU R.F. et TZEN J.T.C., 1999. Classification of the single oleosin isoform and characterization of seed oil bodies in gymnosperms. *Plant Cell Physiol.*, **40** : 326-334.
- WU S.S.H., PLATT K.A., RATNAYAKE C., WANG T.-W., TING J.T.L. et HUANG A.H.C., 1997. Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from *Brassica napus* tapetum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94** : 12711-12716.
- YAKIMOV M.M., ABRAHAM W.-R., MEYER H., GIULIANO L. et GOLYSHIN P.N., 1999. Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438** : 273-280.
- YATSU L.Y., JACKS T.J. et HENSARLING T.P., 1971. Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage, and cottonseed tissues. *Plant Physiol.*, **48** : 675-682.
- YATSU L.Y. et JACKS T.J., 1972. Spherosome membranes. Half unit-membranes. *Plant Physiol.*, **49** : 937-943.
- ZAMORA R., ALAIZ M. et HIDALGO F.J., 2001. Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49** : 4267-4270.
- ZINSER E., SPERKA-GOTTLIEB C.D.M., FASCH E.-V., KOHLWEIN S.D., PALTAUF F. et DAUM G., 1991. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **173** : 2026-2034.
- ZINSER E. et DAUM G., 1995. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11** : 493-536.
- ZWEYTICK D., ATHENSTAEDT K. et DAUM G., 2000. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1469** : 101-120.

## Brevets

- HARADA T., KASHIHARA K. et NIO N., 2002. Complexe oléosine/phospholipide et procédé de production associé. Brevet, n° publication : WO0226788. Ajinomoto CO., INC.
- MacCARTHY J., 2000. Oléosines recombinées tirées du cacao et leurs utilisations comme aromatisant ou émulsifiant. Brevet, n° publication : WO0136648. Société des produits Nestlé S.A.
- MOLONEY M., 1996. Protéines de corps huileux utilisées comme supports de protéines de valeur élevée. Brevet C12N-015/82. n° de publication : WO9621029. University technologies international, INC.

MOLONEY M., JUNGERMANN E. et BOOTHE J., 2000. Corps lipidiques servant d'excipient topique pour des agents actifs. Brevet A61K-007/48. n° de publication : WO0030602. Sembiosys Genetics Inc.

THOMAS T.L. et LI Z., 1998. Région régulatrice 5' d'oléosine servant à la modification de la composition lipidique de graines végétales. Brevet C12N-015/82, n° de publication : WO9845461. Rhone-Poulenc Agro.

## Sites web consultés

The Arabidopsis Information Resource, about *Arabidopsis thaliana*, 25/06/2003 :

<http://www.arabidopsis.org/info/aboutarabidopsis.html>

Expasy molecular biology server, 23/07/2003 :

<http://www.expasy.org/>

Predictprotein server (EMBL), 11/09/2003 :

<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>

QIAGEN, 23/07/2003 :

<http://www.qiagen.com/>

Yves Rocher, recherche botanique, 11/07/2003 :

<http://www.yves-rocher.com/brand/html/recherche.html>

SemBioSys - Genetic Ing., 25/06/2003 :

<http://www.sembiosys.ca/core.html>

## Liste des communications

- *Publications :*

MLICKOVA K., ROUX E., ATHENSTAEDT K., D'ANDREA S., DAUM G., CHARDOT T. et NICAUD J.-M., 2003. Involvement of the acyl CoA oxidases in lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Soumis à *Applied and Environmental Microbiology*.

JOLIVET P., ROUX E., D'ANDREA S., DAVANTURE M., NEGRONI L., ZIVY M. et CHARDOT T., 2003. Composition of the lipid body from *A. thaliana*. Soumis à *Plant Physiology and Biochemistry*.

ROUX E., CANONGE M., BOUCHEZ-MAHIOUT I., LAURIERE M. et CHARDOT T., 2003. Les oléosines. *CICBAA Alim'Inter*, **8** : 91-92.

- *Affiches :*

ROUX E., BAUMBERGER S., AXELOS M. et CHARDOT T., septembre 2003. Interactions à une interface des oléosines avec des phospholipides et des triglycérides. *1<sup>er</sup> congrès de lipidomique du GERLI*, Paris.

ROUX E., BAUMBERGER S. et CHARDOT T., septembre 2002. Behaviour of oleosins at oil / water or air / water interfaces. *43<sup>rd</sup> International Conference on the Bioscience of Lipids*, Graz (Autriche), résumé publié dans les actes.

ROUX E., ARONDEL V. et CHARDOT T., juillet 2001. Expression d'oléosines d'*Arabidopsis thaliana* dans *E. coli*. *Mini-symposium sur les lipides de la SFPV*, Strasbourg.

- *Communications orales :*

ROUX E., BAUMBERGER S., CHARDOT T., décembre 2002. Les oléosines. *Journées de l'école doctorale ABIÉS*, Paris.

ROUX E., BAUMBERGER S., CHARDOT T., novembre 2002. Les oléosines, des protéines interfaciales. *Interfaces Mousses Émulsions*, Nantes.

ROUX E., mai 2002. Les oléosines, de nouveaux émulsifiants d'origine végétale pour les industries agroalimentaires. *Colloque Sciences Alimentaires de l'ENSIA*, Massy.

# **Annexes**

## Annexe 1 : Viscosités de l'eau de 10 à 50 °C

Température (°C)	Viscosité (mPa.s)	Température (°C)	Viscosité (mPa.s)
10	1,3077	30	0,8007
11	1,2713	31	0,7840
12	1,2363	32	0,7679
13	1,2028	33	0,7523
14	1,1709	34	0,7371
15	1,1404	35	0,7225
16	1,1111	36	0,7085
17	1,0828	37	0,6947
18	1,0559	38	0,6814
19	1,0299	39	0,6685
20	1,0050	40	0,6560
21	0,9810	41	0,6439
22	0,9579	42	0,6321
23	0,9358	43	0,6207
24	0,9142	44	0,6097
25	0,8937	45	0,5988
26	0,8737	46	0,5883
27	0,8545	47	0,5782
28	0,8360	48	0,5683
29	0,8180	49	0,5588

D'après Handbook of Chemistry and Physics, 1962.