



HAL
open science

Approches biomimétiques de l'assemblage de protéines de réserve de blé

Amélie Banc

► **To cite this version:**

Amélie Banc. Approches biomimétiques de l'assemblage de protéines de réserve de blé. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2007. Français. NNT: . tel-00542151

HAL Id: tel-00542151

<https://theses.hal.science/tel-00542151>

Submitted on 1 Dec 2010

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.

N° d'ordre : 3473

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES CHIMIQUES

par Amélie BANC

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie Physique

APPROCHES BIOMIMÉTIQUES DE L'ASSEMBLAGE DE PROTÉINES DE RÉSERVE DE BLÉ

Soutenue le : 23 novembre 2007

Devant la commission d'examen formée de :

M. F. ARTZNER	Chargé de Recherche au CNRS	Rapporteurs
M. F. BOURY	Professeur de l'Université d'Angers	
M. L. SERVANT	Professeur de l'Université Bordeaux I	Examineurs
M. P. RICHETTI	Directeur de Recherche au CNRS	
M. B. DESBAT	Directeur de Recherche au CNRS	Directeurs de thèse
Mme L.NAVAILLES	Chargée de Recherche au CNRS	
M. D. RENARD	Chargé de Recherche à l'INRA	
M. Y. POPINEAU	Directeur de Recherche à l'INRA	Membre invité

Résumé :

L'assemblage des protéines de réserve de blé (prolamines) sous forme de corpuscules protéiques lors du développement du grain reste aujourd'hui un mécanisme peu compris. Ce travail de thèse a consisté à utiliser plusieurs approches biomimétiques dans le but de déterminer les paramètres physico-chimiques pouvant entrer en jeu dans l'assemblage *in vivo* de ces protéines. Les γ -gliadines et ω -gliadines, ont été choisies comme prolamines modèles, et leurs modes d'assemblages ont été étudiés *in vitro* dans des solutions aqueuses. Une attention particulière s'est portée sur leur comportement aux interfaces. Pour mimer le contexte biologique, ces protéines ont été étudiées en présence de membranes lipidiques. Les résultats de ces travaux indiquent que, du fait de leur insolubilité, les gliadines présentent une forte capacité à s'assembler en milieu aqueux, en particulier aux interfaces. Les études spectroscopiques montrent que ces protéines présentent des structures secondaires très labiles susceptibles de s'orienter aux interfaces. Que ce soit à l'interface air-eau, ou sous des monocouches lipidiques, les gliadines s'adsorbent sous forme de monocouches. Pour de fortes concentrations en protéines, l'épaisseur des couches adsorbées de γ -gliadines croît pour former des domaines protéiques denses, phénomène non observé dans le cas des ω -gliadines. Un modèle d'auto-assemblage, basé sur la structure primaire de ces gliadines est ainsi proposé, et suggéré comme mécanisme initial de formation des corpuscules protéiques.

Mots-clés: Gliadines, corpuscules protéiques, membranes, interfaces, systèmes biomimétiques, assemblage, structure, dynamique.

Summary:

Wheat storage proteins (prolamins) assembly in protein bodies during grain development still remains an ill-understood mechanism. This work displays different biomimetic strategies in order to elucidate physical chemistry parameters important for these proteins assembly *in vivo*. The γ -gliadins and ω -gliadins were chosen as model prolamins, and their assembly in aqueous solution was studied *in vitro*. This work focused on their interfacial behaviour. To mimic the biological context, these proteins were studied in the vicinity of lipidic membranes. Results indicate that, due to their low solubility, gliadins display an important ability to self-assemble in aqueous media, preferentially to the interfaces. Spectroscopic studies show that these proteins display labile secondary structures able to change their orientation at interfaces. In addition, at the air-water interface or under lipidic monolayers, gliadins adsorb to form protein monolayers. At high γ -gliadins concentrations, the thickness of adsorbed protein layer increases to form dense protein domains, result not observed in the case of ω -gliadins. A self assembly model, based on the primary structure of gliadins is thus proposed, and suggested as an initial mechanism of protein bodies formation.

Keywords: Gliadins, protein bodies, membranes, interfaces, biomimetic systems, assembly, structure, dynamic.

Remerciements

Ce travail de thèse, réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le CNRS et l'INRA, m'a conduit à rencontrer de nombreuses personnes, de divers horizons. De façon générale ces rencontres ont contribué de façon essentielle à ma formation de chercheur, et à mon épanouissement personnel.

En premier lieu, je remercie les différents membres du jury d'avoir pris le soin d'examiner et de rapporter ce travail de thèse : messieurs Frank Boury, Franck Artzner, Laurent Servant et Philippe Richetti. De plus, je remercie Patrick Moreau, Serge Perez et Didier Marion d'avoir apporté le regard extérieur de mon comité de thèse, qui s'est réuni régulièrement pour suivre l'évolution des travaux.

Ensuite, je souhaite sincèrement remercier mes encadrants de thèse. Laurence Navailles m'a conduite avec enthousiasme sur cette problématique biologique, qui nous apparaissait parfois bien obscure. Mais finalement, la biologie ne serait elle pas de la physico-chimie !? Avec elle, j'ai pris plaisir à écrire et réécrire sans cesse l'histoire de la γ -gliadine sur le perron du laboratoire... Denis Renard, malgré l'éloignement géographique, a aussi bien su préserver un regard critique sur mes interprétations que me soutenir pendant les moments difficiles de la rédaction. Enfin, Bernard Desbat a largement contribué à l'évolution de mon travail de thèse et j'ai énormément appris de nos nombreuses discussions (scientifiques ou autres).

L'environnement scientifique varié de mes deux laboratoires d'affiliation m'a permis d'interagir avec de nombreuses personnes que je souhaite remercier. A l'INRA de Nantes, j'ai eu le plaisir de travailler étroitement avec Yves Popineau et Cécile Mangavel qui m'ont fait partager leurs connaissances sur les inextricables gliadines. De plus, je souhaite remercier Dominique Melcion et Jean-Pierre Compoin d'avoir procédé à la purification de ces protéines en grande quantité pour mon travail de thèse. Au CRPP, j'ai eu la chance d'être initiée à diverses techniques de caractérisation : la diffusion de la lumière par Maryse Maugey et Frédéric Nallet, l'AFM par Hassan Saadaoui, la cryofracture par Olivier Mondain Monval et Isabelle Ly, et le FRAP par Patrick Moreau. Ce fut un plaisir de travailler avec ces experts qui ont eu la patience de répondre à mes incessantes questions. Merci également à François Dole de s'être intéressé à mon étude et d'avoir initié des approches par RPE.

La nature exploratoire de mon sujet m'a permis de tester plusieurs techniques originales dans le cadre de collaborations extérieures très enrichissantes. Ainsi, j'ai réalisé de nombreuses études à l'interface air-eau dans le laboratoire de Bernard Desbat, où j'ai toujours été bien accueillie, malgré ma présence de plus en plus importante au cours du temps. En particulier, je souhaite remercier Eloïse qui a toujours su résoudre mes petits problèmes techniques en l'absence du "maître" Bernard. Au LPCM, j'ai également travaillé avec Thierry Buffêteau, qui a pris le temps de réaliser des expériences de VCD sur les atypiques gliadines, et de m'expliquer cette technique dont j'ignorais tout. Par ailleurs, suite à des "Apéros Science", j'ai eu la chance d'être initiée au monde de la microfluidique par les "lofeurs", Jacques et JB, qui n'ont jamais cessé de m'impressionner. Enfin une dernière collaboration a commencé à se mettre en place sur la fin de ma thèse avec Bruno Zappone, l'italien qui veut percer le secret des pâtes à pizza, à suivre... Merci à tous ces collaborateurs.

Ces trois années de thèse resteront également gravées dans ma mémoire pour les bons moments que j'ai pu passer : aux séances de bad multiples, à l'escalade et dans les Pyrénées, aux tournois de coinche et caméléon® acharnés, au billard, à la plage..... Pour tous ces souvenirs, merci à Ahmed (notre meilleur GO), Sophie ("maman de Bordeaux"), Gaël et Vincent (les sportifs fous), Seb (illustrateur attiré du bureau "groovy"), JB (l'idole des jeunes), Patrick (le poète), Guillaume (l'homme à la mezzanine), Karine, Pierre, Benoît... et à tous les autres que j'oublie.

Je n'oublierai pas de remercier mes parents qui m'ont encouragé, bien qu'ils ne m'aient pas beaucoup vu pendant ces années bordelaises. Enfin merci à toi Chris, qui a supporté toutes mes râleries, m'a soutenu dans toutes les épreuves, et a cru en moi jusqu'au bout, pour être enfin ensemble...

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : ETAT DE L'ART	3
A. DESCRIPTION DES PROTEINES DE RESERVE DU BLE	4
1. Protéines de réserve du blé.....	4
2. γ -gliadines	6
3. ω -gliadines	7
B. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES DE RESERVE DE BLE	9
1. Propriétés d'assemblage en volume	9
a) <i>Solubilité</i>	9
b) <i>Monomères</i>	9
c) <i>Coacervats</i>	10
d) <i>Fibres - Microfibrilles</i>	10
2. Propriétés d'assemblage aux interfaces.....	11
a) <i>Interface solide-air</i>	11
b) <i>Interface air-eau</i>	12
c) <i>Interface membrane-eau (vésicules - monocouche)</i>	13
C. BIOSYNTHESE ET ASSEMBLAGE DES PROTEINES DE RESERVE DANS LE GRAIN DE BLE	14
1. Routage des protéines de réserve	14
2. Accumulation des protéines de réserve au sein du réticulum endoplasmique	16
3. Spécificités du blé	16
D. OBJECTIFS ET STRATEGIE DU TRAVAIL DE THESE	17
BIBLIOGRAPHIE	18
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	23
A. MATERIEL	23
1. Gliadines.....	24
a) <i>Purification</i>	24
b) <i>Marquage fluorescent de la γgliadine</i>	30
2. Solvants	32
a) <i>Solubilisation</i>	32
b) <i>Contexte biologique</i>	33
3. Membranes	33
a) <i>Membranes biologiques</i>	33
b) <i>Auto-association des lipides et tensio-actifs</i>	34
c) <i>Composition des membranes modèles</i>	35
B. METHODES	38
1. Etude des solutions.....	38
a) <i>Spectroscopie UV-Visible</i>	38
b) <i>Spectroscopie infrarouge – Dichroïsme Circulaire Vibrational (VCD)</i>	40
c) <i>Spectroscopie Raman</i>	41
d) <i>Diffusion dynamique de la lumière (DLS)</i>	42
e) <i>Microscopie à Force Atomique</i>	44
2. Etudes à l'interface air-eau.....	46

a) Balance de Langmuir et tensiométrie	46
b) Microscopie à angle de Brewster (BAM).....	47
c) Polarization Modulation IR Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS)	48
3. Etude des phases lamellaires	50
a) Microscopie de fluorescence - lumière polarisée – confocale.....	50
b) Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP)	53
c) Diffraction des rayons X (DRX).....	55
BIBLIOGRAPHIE	57

CHAPITRE III : ASSEMBLAGE DES γ - ET ω -GLIADINES EN MILIEU AQUEUX..... 59

A. ETUDE PRELIMINAIRE	60
1. Spectroscopie infrarouge.....	60
2. Dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD).....	61
B. ASSEMBLAGE EN VOLUME.....	63
1. Solubilité en milieu aqueux.....	63
a) Effet de la concentration initiale.....	63
b) Effet du temps de solubilisation	64
c) Effet de la force ionique	65
2. Formes d'assemblages ?	66
a) Diffusion dynamique de la lumière	66
b) Observations en microscopie à force atomique (AFM).....	69
3. Système de concentration contrôlée de solutions diluées	72
a) Microévaporateur	72
b) Microscopie optique.....	73
c) Spectroscopie Raman Confocale.....	75
4. Bilan	79
C. ASSEMBLAGE DES γ- ET ω-GLIADINES A L'INTERFACE AIR-EAU	80
1. Essais préliminaires.....	80
2. Isothermes de compression et microscopie à angle de Brewster	82
3. Mesures PM-IRRAS	85
a) FTIR (ATR) de γ et ω -gliadines à l'état solide.	85
b) Spectres PM-IRRAS	86
c) Simulations	93
4. Bilan	97
D. CONCLUSION	98
BIBLIOGRAPHIE	99

CHAPITRE IV : INTERACTION MEMBRANE-PROTEINE DE RESERVE DE BLE ... 103

A. APPROCHE PHASE LAMELLAIRE	104
1. Approche – Formulation	104
2. Observations microscopiques.....	104
3. Diffraction des rayons X	105
4. FRAP.....	106
a) Mesures préliminaires	107
b) Résultats	109
5. Etudes spectroscopiques : FTIR, Raman.....	111
a) FTIR	112
b) Raman	113

6. Bilan	114
B. APPROCHE MONOCOUCHE DE LANGMUIR.....	116
1. Approche – protocole	116
2. Pression de la monocouche lipidique	116
3. Observation en microscopie à Angle de Brewster	118
<i>a) Monocouches de DMPC à $\Pi < 25\text{mN/m}$</i>	118
<i>b) Monocouches de DMPC à $\Pi > 25\text{mN/m}$</i>	119
<i>c) Etude de l'épaisseur des agrégats</i>	120
4. Mesures PM-IRRAS	122
5. Test d'une monocouche de DMPG	126
6. Transfert sur substrat pour observation en Microscopie à Force Atomique (AFM)	
127	
<i>a) Monocouche lipidique</i>	128
<i>b) Monocouche lipidique + γgliadine</i>	130
7. Bilan	131
C. CONCLUSION	133
BIBLIOGRAPHIE	133
CONCLUSION GENERALE.....	135
ANNEXE A	137
ANNEXE B	143
ANNEXE C	145

Introduction

Le 1^{er} janvier 2004, a été créé le Groupement de Recherche "Assemblages des Molécules Végétales" (GDR AMV). Ce GDR regroupe une trentaine d'équipes de différentes disciplines (biologie, chimie, physique), du CNRS et de l'INRA, autour du thème général de la formation des assemblages naturels de biopolymères chez les plantes. Le programme scientifique associé à ce GDR concerne les mécanismes de biosynthèse et les associations supramoléculaires de nombreux biopolymères (protéines, polysaccharides, polyphénols) synthétisés au cours de la croissance des plantes. Rapidement, il est apparu que les techniques les plus sophistiquées et les modèles théoriques développés au CNRS étaient très complémentaires des approches plus biologiques menées à l'INRA sur la construction des assemblages chez les plantes. Ainsi, ce travail de thèse a été réalisé et financé dans ce contexte inter-organismes, afin de développer de nouvelles approches biomimétiques pour la compréhension de l'assemblage des protéines de réserve de blé au sein d'organites nommés corpuscules protéiques.

Les protéines de réserve sont des constituants clés de la valeur d'utilisation des grains et graines de grande culture. Depuis longtemps, ces protéines sont étudiées à l'INRA de Nantes pour leurs propriétés technologiques et nutritionnelles. Jusqu'à la fin des années 1990, les efforts de recherche étaient consacrés à leur purification et à l'étude de leurs propriétés dans les produits finis (pains, pâtes...). En effet, leurs propriétés interfaciales étaient étudiées pour leur capacité à stabiliser des systèmes dispersés tels que les mousses ou les émulsions, alors que leurs propriétés rhéologiques étaient étudiées pour leur capacité à former un réseau viscoélastique contribuant aux propriétés mécaniques des pâtes. Depuis les années 2000, pour progresser dans la voie de la maîtrise de la valeur technologique des graines de céréales, il apparaît fondamental de comprendre les mécanismes régissant la mise en place et l'accumulation des protéines de réserve dans les graines, dans un but d'optimisation de la qualité des grains *in vivo*. En effet, des liens ont été établis entre la composition biochimique des grains et la qualité des produits qui en résultent, mais peu d'études ont été réalisées sur le mode d'assemblage de ces protéines. L'hypothèse selon laquelle leur mode d'assemblage, serait prépondérant dans la qualité du grain à maturité reste entièrement à démontrer.

Les études biologiques montrent qu'au cours de la maturation des graines, les protéines de réserve sont stockées sous forme d'organites denses en protéines : les corpuscules protéiques. La synthèse et le routage de ces protéines dans la cellule, conduisant à la formation de ces corpuscules, apparaissent complexes et variables au sein des différentes espèces. Ainsi les mécanismes qui conduisent à l'organisation supramoléculaire de ces protéines *in vivo* sont mal connus. Toutefois, il a été observé que l'expression de ces protéines dans différents types cellulaires, conduisait aux mêmes modes d'organisation que dans les cellules du grain de blé. L'assemblage des protéines de réserve de blé, n'étant pas lié au contexte cellulaire, pourrait donc être uniquement lié aux propriétés intrinsèques des protéines. Dans ces circonstances, l'étude des interactions protéine-protéine par une approche biomimétique semblait constituer une voie originale pour comprendre la genèse des corpuscules protéiques.

Les données biologiques indiquent que la première étape de l'assemblage des protéines de réserve aurait lieu après leur synthèse, dans le réticulum endoplasmique. Le lumen du réticulum endoplasmique est un milieu très complexe, qui peut être notamment décrit comme un environnement aqueux et confiné par la présence des membranes. Ainsi dans une première étape, nous nous sommes intéressés aux propriétés d'assemblage des protéines de réserve dans des milieux aqueux simples, cette problématique n'ayant jamais été réellement traitée préalablement, du fait de la très faible solubilité de ces protéines dans ces milieux. Dans une seconde étape, la stratégie retenue a été d'insérer les protéines de réserve dans des phases lamellaires lyotropes, afin de mimer le contexte membranaire du réticulum endoplasmique. Cette approche "phase lamellaire" a permis de révéler une interaction entre protéines de réserve et membranes. Pour approfondir l'étude des interactions protéine-protéine et protéine-membrane, des études ont été réalisées par des approches à l'interface air-eau.

Ce manuscrit de thèse se décompose ainsi en quatre chapitres :

-Le premier chapitre est consacré à la présentation des éléments bibliographiques, concernant la problématique biologique et les propriétés physico-chimiques des protéines de réserve de blé, nécessaires à la compréhension du sujet.

-Le deuxième chapitre "Matériel & Méthodes", présente les protocoles de purification et de marquage fluorescent des protéines, les lipides et tensio-actifs utilisés dans les membranes modèles, ainsi que les diverses techniques employées.

-Le troisième chapitre regroupe les études concernant le comportement des protéines de réserve dans des milieux aqueux. Deux approches mises en place sont exposées: l'une pour étudier les protéines en volume, et l'autre à l'interface air-eau. La solubilité de ces protéines dans des milieux aqueux est éclaircie, et des résultats importants concernant les modes d'assemblage des protéines de réserve aux interfaces sont présentés.

-Le quatrième chapitre rassemble les études concernant l'interaction des protéines de réserve avec des membranes modèles. En premier lieu est présentée l'approche phase lamellaire qui nous a permis d'identifier une interaction entre protéines de réserve et membrane. Ensuite, les études réalisées à l'aide de monocouches de lipides à l'interface air-eau, afin de préciser la nature de l'interaction, sont exposées. L'ensemble de ces résultats suggère des modes d'assemblages spécifiques, via des interfaces membranaires, qui pourraient avoir lieu dans le contexte biologique.

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

Le blé est un composant majeur de l'alimentation humaine. En 2005, plus de 600 millions de tonnes de blé ont été produites dans le monde, et la consommation mondiale s'élevait à plus de 100 kg/habitant/an¹. Cette forte consommation tient au fait que les protéines de réserve du grain de blé ont la propriété unique de pouvoir former, après hydratation, une masse cohérente, insoluble et viscoélastique : le gluten. Cette propriété est largement mise à profit dans les industries alimentaires pour la panification et pour la texturation de divers produits alimentaires. Par ailleurs, de nouveaux débouchés dans des secteurs non alimentaires se font jour, notamment dans le domaine des matériaux biodégradables² et de l'encapsulation^{3,4}.

Ainsi, le blé a une grande importance dans notre société, et les scientifiques cherchent à comprendre les mécanismes qui régissent les propriétés uniques du gluten pour améliorer la qualité des aliments et des nouveaux produits.

Dans cette partie bibliographique, dans un premier temps, les protéines de réserve du blé ainsi que leurs propriétés physico-chimiques connues sont décrites, puis un résumé des connaissances concernant la biosynthèse et l'assemblage de ces protéines *in vivo* est présenté. Enfin, dans ce contexte, les objectifs et la stratégie envisagée pour ce travail de thèse sont exposés.

A. Description des protéines de réserve du blé

1. Protéines de réserve du blé

Du fait de leur abondance et de leur importance économiques, les protéines de réserve des graines ont été historiquement presque les premières protéines étudiées. Au début du siècle dernier, Osborne (1924), sur la base de leur solubilité, les a classées en 4 groupes: les albumines solubles dans l'eau, les globulines solubles dans les solutions salines, les glutélines solubles dans les solutions acides, et les prolamines solubles dans des mélanges eau/éthanol.

Dans l'endosperme du blé, la majorité des protéines de réserve sont des prolamines⁵. Leur nom est basé sur le constat que ce sont généralement des protéines riches en proline et glutamine. Elles sont très polymorphes, leur masse molaire peut varier de 30 à 100 kDa. Les prolamines du blé ont été classées selon leur richesse en acides aminés contenant du soufre (S-rich et S-poor) et leur poids moléculaire (High Molecular Weight), ou selon leur capacité à former des ponts disulfures intermoléculaires (gliadines et gluténines), comme indiqué dans la figure 1.

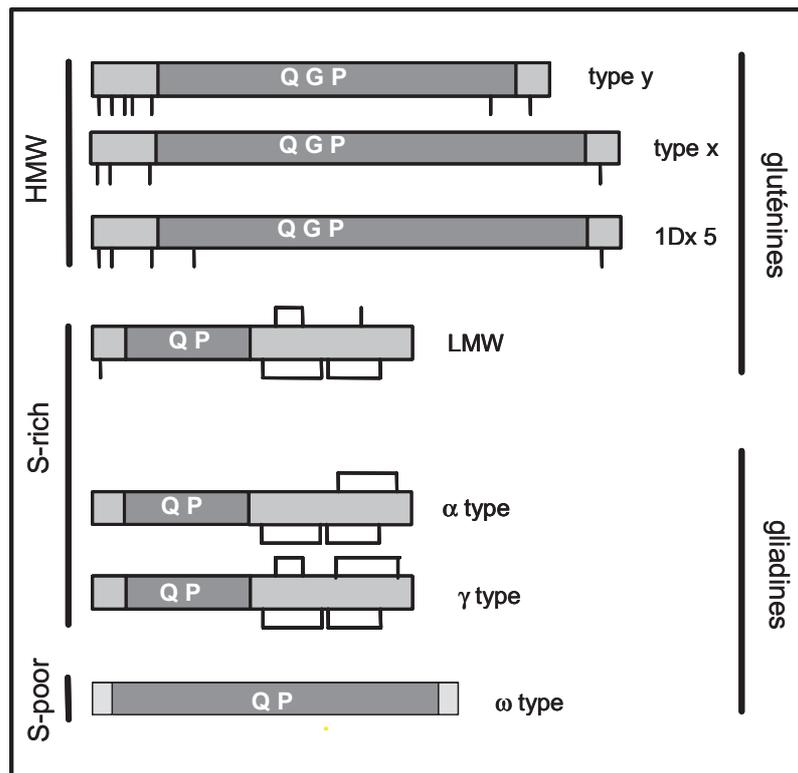


Figure 1 : Classification des prolamines du blé : à gauche, selon leur poids moléculaire et leur richesse en ponts disulfures, à droite selon leur caractère monomérique (gliadines) ou polymérique (glutélines). En gris clair sont symbolisés les domaines non répétés et en gris foncé les domaines répétés. Les cystéines libres sont représentées par un trait vertical alors que les ponts disulfures intramoléculaires sont représentés par un pont.

Les gluténines sont dites polymériques car elles sont formées de l'association de plusieurs sous-unités par des ponts disulfures intermoléculaires alors que les gliadines formées d'une seule chaîne polypeptidique sont monomériques. Les caractéristiques moléculaires des différentes prolamines sont présentées dans le Tableau 1.

Les sous-unités gluténines sont divisées en deux groupes, les gluténines de faible poids moléculaire (LMW) qui représentent deux tiers de l'ensemble des gluténines, et les gluténines de haut poids moléculaire (HMW). Les gluténines de faible poids moléculaire sont très polymorphes et ont des masses molaires comprises entre 30 et 70 kDa. Les sous-unités gluténines de haut poids moléculaire sont les prolamines les moins polymorphes et ont une masse molaire comprise entre 100 et 160 kDa. On leur attribue un rôle déterminant dans les propriétés technologiques des farines^{6,7}.

Les gliadines représentent 45 % des prolamines totales. Elles présentent le plus grand polymorphisme, selon les variétés, elles peuvent renfermer 20 à 40 constituants différents⁸. On distingue 3 fractions de gliadines définies en fonction de leur mobilité électrophorétique à pH acide: les α/β , les γ , et les ω -gliadines, qui représentent respectivement 44-60 %, 30-46 %, et 6-20 % des gliadines totales⁹. Leurs masses molaires sont comprises entre 30 et 40 kDa pour les α/β et γ -gliadines, entre 60 et 80 kDa pour les ω -gliadines¹⁰. Les gliadines sont parmi les protéines connues les moins chargées. Elles ne renferment que 6 à 11 résidus basiques par molécule et 95 % des résidus glutamiques et aspartiques sont amidés. Les ω -gliadines ont des points isoélectriques compris entre 5.5 et 7.0, et ceux des α/β et γ -gliadines sont compris entre 6.5 et 8.

Components	M_r (% total)	Polymers or monomers	Partial amino acid composition (mol%)
HMW prolamins HMW subunits of glutenin	65-90 000 (6-10%)	Polymers	30-35% Gly, 10-16% Pro, 15-20% Gly, 0.5-1.5% Cys, 0.7-1.4% Lys
S-rich prolamins γ -gliadins α -gliadins B- and C-type LMW subunits of glutenin ^a	30-45 000 (70-80%)	Monomers Monomers Polymers	30-40% Gln, 15-20% Pro, 2-3% Cys, <1.0% Lys
S-poor prolamins ω -gliadins D-type LMW subunits of glutenin ^a	30-75 000 (10-20%)	Monomers Polymers	

^aC-type LMW subunits are essentially polymeric forms of α - and γ -gliadins and D-type LMW subunits polymeric ω -gliadins. The B-type LMW subunits constitute a discrete group of S-rich prolamins.

^bCys is present in D-type LMW subunits, but not ω -gliadins.

Tableau 1 : Caractéristiques moléculaires des prolamines du blé¹¹

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons utilisé deux types de prolamines, les γ -gliadine et ω -gliadine, c'est pourquoi seules les structures de ces deux protéines sont décrites dans ce manuscrit.

2. γ -gliadines

Les gliadines de type γ ont des séquences considérées comme ancestrales car elles sont présentes dans de nombreuses espèces de graminées telles que le blé, l'orge ou le seigle⁵. Ce sont des protéines monomériques, riches en soufre, de masse molaire 35 kDa environ. Elles sont composées de deux domaines bien distincts : le domaine N-terminal, riche en séquence d'acides aminés répétés de type (PQQPFPQ)_n; et le domaine C-terminal, non répété, contenant les quatre ponts disulfures intramoléculaires.

10	20	30	40	50
MNIQVDPSSQ	VQWLQQQLVP	QLQQPLSQQP	QQTFPQPQQT	FPHQPQQQVP
60	70	80	90	100
QPQQPQQPFL	QPQQPFPQQP	QQPFPQTQQP	QQPFPQQPQQ	FPQTQQPQQ
110	120	130	140	150
FPQQPQQPFL	PQTQQPQQPF	PQLQQPQQPF	PQPQQQLPQP	QQPQQSFPQQ
160	170	180	190	200
QRPFIQPSLQ	QQLNPCKNIL	LQQCKPASLV	SSLWSIWPQ	SDCQVMRQQC
210	220	230	240	250
CQQLAQIPQQ	LQCAAIHSVV	HSIIMQQQQQ	QQQQQGMHIF	LPLSQQQQVG
260	270	280	290	300
QGSLVQGQGI	IQPQQPAQLE	AIRSLVLQTL	PSMCNVYVPP	ECSIMRAPFA
310				
SIVAGIGGQY R				

Figure 2: Séquence d'acides aminés de la γ -gliadine référencée Q6EEW9¹²
($M_w=35\ 678$ g/mol) dans la banque de données Uniprot¹³.

Les deux domaines des γ -gliadines sont distincts par leur séquence primaire, mais aussi par leur hydrophobicité (figure 3). Le domaine C-terminal est très hydrophobe et apparaît replié d'après les modélisations moléculaires, alors que le domaine N-terminal est moins hydrophobe, et apparaît plus étendu. Cette structure suggère un caractère amphiphile de la protéine.

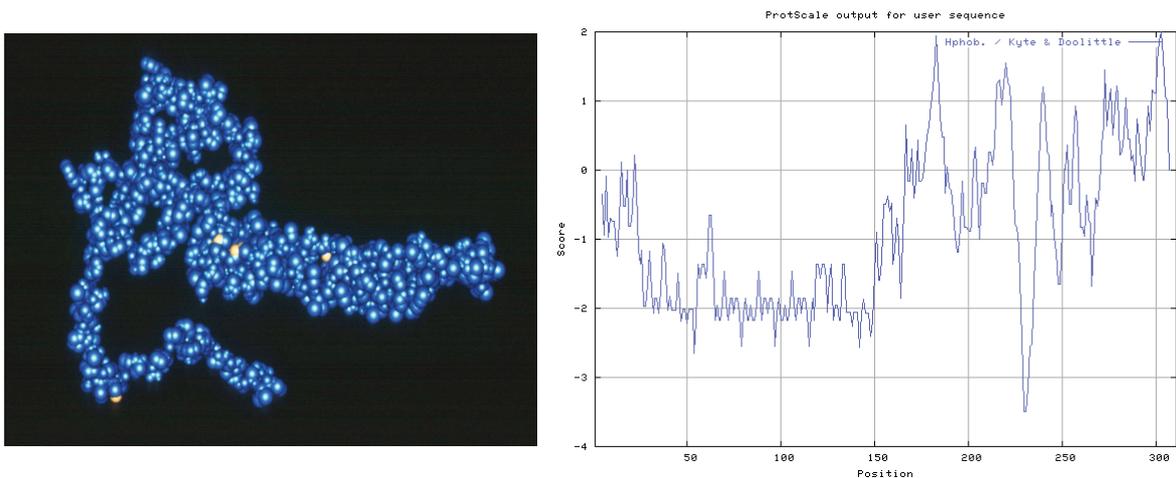


Figure 3: A gauche, représentation 3D à partir de la modélisation moléculaire de la γ -gliadine avec son domaine répété étendu et son domaine non répété globulaire¹⁴. A droite, profil d'hydrophobicité de la γ -gliadine calculé à partir de la séquence Q6EEW9 par la méthode de Kyte & Doolittle¹⁵. L'indice est croissant pour une hydrophobicité croissante.

A notre connaissance, les cristaux de prolamines de blé n'ont été obtenus qu'en conditions de micro-gravité à bord de la station MIR, et aucune étude par diffraction des rayons X n'a pu être réalisée ensuite¹⁶. Ainsi les connaissances actuelles concernant leur structure tertiaire se limitent à des études spectroscopiques, microscopiques et par diffusion du rayonnement sur les protéines en solution. Les études spectroscopiques concernant les γ -gliadines^{17,18,19} montrent, d'une part que le domaine non répété est structuré majoritairement en hélices α , et d'autre part que le domaine répété, riche en prolines, est composé de coudes β répétés en équilibre avec des structures de type poly-L-proline II. La structure du domaine non répété se montre stable en fonction des changements de température, alors que la structure du domaine répété riche en proline apparaît dépendante du solvant et de la température¹⁹.

3. ω -gliadines

Les ω -gliadines sont des prolamines monomériques peu riches en soufre, leur structure ne comporte aucun pont disulfure. Ces protéines se distinguent par leur unique domaine répété et leur très grande richesse en proline (plus de 30 % molaires) et en glutamine (plus de 55 % molaires). Les ω -gliadines sont divisées en trois groupes selon leur masse molaire moyenne²⁰ : le groupe 1A de 34-39 kDa, le groupe 1B de \sim 50 kDa et le groupe 1D de \sim 40 kDa. Les groupes 1A et 1D ont une séquence répétée de PF(PQQ)₂, alors que le groupe 1B a une séquence répétée légèrement différente : FP(Q)₂₋₄

10	20	30	40
SRLLSPRGKE	LHTPQEQFPQ	QQQFPQPQQF	PQQQIPQQHQ
50	60	70	80
IPQQPQQFPQ	QQQFLQQQI	PQQQIPQQHQ	IPQQPQQFPQ
90	100	110	120
QQQFPQQHQS	PQQQFPQQQF	PQQKLPQQEF	PQQQISQQPQ
130	140	150	160
QLPQQQQIPQ	QPQQFLQQQQ	FPQQQPPQQH	QFPQQQLPQQ
170	180	190	200
QQIPQQQQIP	QQPQQIPQQQ	QIPQQPQQFP	QQQFPQQQFP
210	220	230	240
QQQFPQQEFP	QQQQFPQQQI	ARQPQQLPQQ	QQIPQQPQQF
250	260	270	280
PQQQQFPQQQ	SPQQQQFPQQ	QFPQQQQLPQ	KQFPQPQQIP
290	300	310	320
QQQQIPQQPQ	QFPQQQFPQQ	QQFPQQQEFP	QQQFPQQQFH
330	340	350	360
QQQLPQQQFP	QQQFPQQQFP	QQQQFPQQQQ	LTQQQFPRPQ
370	380	390	400
QSPEQQQFPQ	QQFPQQPPQQ	FPQQQFPIPY	PPQQSEEPS
410	420		
YQQYPQQQPS	GSDVISISGL		

Figure 4 : Séquence d'acides aminés d'une ω -gliadine du groupe 1B²¹ (50 958 g/mol)

Les différentes études concernant la structure secondaire des ω -gliadines^{22,20,18} montrent que ces protéines se structurent principalement en coudes β . Cependant, le taux d'hydratation semble jouer un rôle important sur la structuration de ces protéines : pour de faibles taux d'hydratation, la quantité de feuillets β est croissante avec l'hydratation, et pour des taux supérieurs à 35 %, les feuillets β sont remplacés par des chaînes hydratées étendues²³. Par ailleurs, une structure en hélice composée de feuillets et de coudes β , présentée sur la figure 6, a été proposée pour un peptide modèle répété étudié par dynamique moléculaire²⁴.

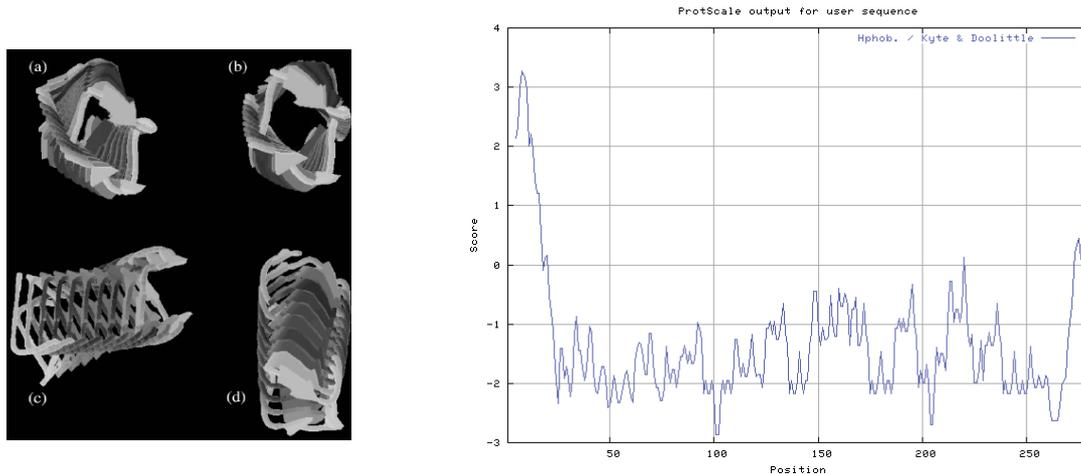


Figure 5 : A gauche, représentation de la structure hélicoïdale obtenue en dynamique moléculaire avec un peptide répété modèle : $(PQQPFPQQ)_{20}$. A droite, profil d'hydrophobicité de la ω -gliadine calculé à partir de la séquence Q9FUW7 par la méthode de Kyte & Doolittle. L'indice est croissant pour une hydrophobicité croissante.

B. Propriétés physico-chimiques des protéines de réserve de blé

1. Propriétés d'assemblage en volume

a) Solubilité

Selon la classification d'Osborne, les prolamines sont définies comme les protéines solubles dans des mélanges eau-éthanol, et non solubles dans des solutions aqueuses à pH neutre. L'insolubilité des gliadines dans l'eau à pH neutre est expliquée par la valeur du point isoélectrique des gliadines qui est proche de la neutralité, et l'établissement de nombreuses liaisons hydrogènes intermoléculaires par l'intermédiaire des chaînes latérales des résidus glutamines²⁵. De plus, des études^{26,27,28} montrent que la solubilité des gliadines est variable avec le pH et la force ionique du solvant. Les faibles forces ioniques et les pH acides accroissent la solubilité des gliadines. Par ailleurs, il a été montré que la solubilité des gliadines dans l'eau était accrue par une solubilisation préalable des protéines dans des solutions salines²⁹. Ce comportement serait expliqué par un changement de conformation des gliadines lors du passage en milieu salin, qui favoriserait les interactions eau-gliadine.

b) Monomères

Les gliadines monomériques sont généralement étudiées, soit en acide acétique dilué, soit en solution eau-éthanol. Leur taille a été mesurée par différentes techniques chromatographiques (SEC) ou de diffusion du rayonnement (rayons X, neutrons)^{30,58}. Les résultats obtenus, en diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS), suggèrent une forme anisotrope des gliadines en eau-éthanol. Les mesures de tailles des différentes fractions de gliadines sont récapitulées dans le tableau suivant :

Protein	M_r	R_g (nm)	R_c (nm)	d (nm)	L (nm)	$2a$ (nm)	L_c (nm)	$I(0)/c$
α -	35	3.55	1.10	3.20	11.7	15.1	15.8	36
γ -	45	3.80	1.15	3.25	12.5	16.2	17.7	45
ω -	39	4.60	1.15	3.25	15.4	19.9	26.3	58

$M_r \times 1000$; d and L refer to the length of an assumed rod model, and for an oblate ellipsoid model where the semi-axes are a and b , $d = 2b$; L_c is the contour length and $I(0)/c$ a measure of molecular weight.

Tableau 2 : Tailles des gliadines solubilisées en eau-éthanol (70-30) mesurées par SAXS³¹

Les expériences de diffusion des neutrons⁵⁷ et de chromatographie d'exclusion stérique⁵⁵ montrent que la taille des monomères apparaît plus ou moins compacte selon la nature du solvant : la chaîne polypeptidique est d'autant plus étendue que son affinité pour le solvant est grande. Par ailleurs des monomères de gliadines ont pu être observés par microscopie à effet tunnel³² (STM). Sur un substrat hydrophobe de type graphite (HOPG), les γ -gliadines à faible concentration sont sous forme monomérique, étendues sur le substrat, alors qu'à plus forte concentration, elles forment une monocouche.

c) Coacervats

Du fait de leur insolubilité dans les solutions aqueuses à pH neutre, les gliadines ont été étudiées pour la fabrication de nanoparticules dans un objectif d'encapsulation⁴. Le principe de formation des nanoparticules de gliadines est basé sur la coacervation simple³³, qui est le passage d'une macromolécule d'un bon à un mauvais solvant. Le procédé se décompose en quatre étapes :

Dissolution des gliadines dans un bon solvant (eau-éthanol).

Incorporation de la substance à encapsuler dans la solution de gliadines.

Induction d'une séparation de phases par sursaturation des gliadines dans un non solvant (ajout d'une solution tampon pH neutre). Formation des nanoparticules.

Concentration par évaporation de l'éthanol et élimination du surnageant après centrifugation.

Ce processus de fabrication conduit à la formation de nanoparticules de tailles comprises entre 200 et 600 nm de diamètre³⁴. La structure de ces coacervats de gliadine est peu connue.

Des expériences de microscopie électronique à transmission (TEM)³⁵ montrent que les gliadines dialysées contre de l'eau ultrapure peuvent former des agrégats structurés sous différentes formes selon l'espèce de blé, et donc la composition des gliadines. Des structurations sous forme de couches concentriques ont pu être observées dans certains cas.

d) Fibres - Microfibrilles

Il a été montré qu'une fraction des α -gliadines était capable de s'assembler sous forme de microfibrilles^{36, 37} dans certaines conditions de pH ($\text{pH} > 5$) et de force ionique (> 0.005 M) (figure 6). Cette fraction nommée A-gliadines peut former, de façon réversible, des microfibrilles de 8 nm de diamètre, et de 300 à 400 nm de long.

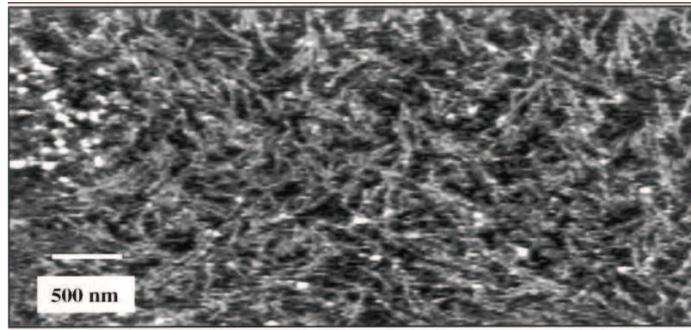


Figure 6 : Cliché de microscopie AFM de microfibrilles de A-gliadine déposés sur une surface de mica en solution d'acétate d'ammonium⁶⁵.

Par ailleurs, des fibres ont pu être observées³⁸ dans des solutions très concentrées de gliadines (400 mg/ml) solubilisées dans un tampon phosphate à pH neutre contenant de l'urée. Ces fibres ont une épaisseur de l'ordre du micron et ont une longueur qui peut atteindre plusieurs centaines de microns.

2. Propriétés d'assemblage aux interfaces

a) Interface solide-air

Les propriétés d'adsorption des prolamines de blé sur des surfaces hydrophobes ont été étudiées par l'équipe d'Eliasson^{39,40,41}. Les adsorptions des différentes fractions de gliadines, de la sous-unité gluténine 1Dx5, et d'un peptide constitutif de 1Dx5, correspondant au domaine répété central, ont été étudiés. Ces études ont été réalisées par ellipsométrie sur des surfaces de mica méthylées de façon à les rendre hydrophobes. Il a été montré que, de façon générale, les quantités de gliadines ou de gluténines adsorbées sur ce type de surface augmentaient avec le pH et la force ionique. Cependant le peptide du domaine répété de la sous-unité gluténine apparaît insensible à la force ionique. Les quantités adsorbées varient selon l'ordre suivant : sous-unité 1Dx5 > α -gliadine > β -gliadine = γ -gliadine > ω -gliadine.

La quantité adsorbée augmente avec la quantité injectée pour l'ensemble de ces protéines, sauf pour la ω -gliadine où un plateau à 3 mg/m² a été observé. Ce comportement a été expliqué par la capacité des prolamines, de forme anisotrope, à prendre des positions soit couchées (axe majeur parallèle à l'interface), soit debout sur l'interface (axe majeur perpendiculaire à l'interface). Gluténines, α , β et γ -gliadines auraient la capacité à prendre les deux types de positions selon la concentration, alors que les ω -gliadines resteraient couchées quelle que soit la concentration. De plus, des expériences d'adsorptions successives mettent en évidence l'incapacité des ω -gliadines à s'adsorber sur une couche de α , β ou γ -gliadine préalablement adsorbée sur la surface, alors que les α , β et γ -gliadines peuvent remplacer les ω -gliadines dans une couche interfaciale préalablement formée. De la même façon, le peptide du domaine répété de la sous-unité gluténine 1Dx5 est incapable de s'adsorber sur une couche de sous-unités gluténines 1Dx5. Ainsi, ces études suggèrent que l'adsorption des prolamines

sur surface hydrophobe serait dominée par les domaines hydrophobes non répétés. La force ionique écranterait les répulsions électrostatiques favorisant ainsi l'adsorption.

b) Interface air-eau

Dans un premier temps, la farine entière, contenant l'ensemble des prolamines, protéines hydrosolubles, amidon et lipides, a été étudiée à l'interface air-eau⁴². Il a été montré que ce mélange complexe stabilisait l'interface air-eau et pouvait former spontanément des fibrilles. Les acides aminés du gluten ont été identifiés comme composants de ces fibrilles⁴³, sans pour autant identifier à la fois le type de prolamine impliqué ni le mécanisme de formation des microfibrilles. Par ailleurs, des études sur le gluten à l'interface air-eau ont montré qu'une succession de cycles de compression-expansion de la couche interfaciale conduisait à la formation de ponts disulfures intermoléculaires⁴⁴. Ensuite, avec les progrès réalisés sur la purification des composants de la farine, des études ont pu être réalisées sur les différentes protéines. Keller⁴⁵ a montré que l'activité interfaciale des protéines du blé évoluait de la façon suivante : gliadine > gluténine > globuline > albumine pour une sous-phase constituée d'un tampon acétate, 0.01 M à pH 6, contenant 4 % de NaCl.

Cette évolution est en accord avec le classement des prolamines selon leurs propriétés hydrophobes mesurées par chromatographie d'interaction hydrophobe⁴⁶ : γ -gliadine > α -gliadine > Gluténine > ω -gliadine > Albumine + globuline

L'influence de la force ionique de la sous-phase a été étudiée⁴⁷. De façon générale, l'ajout de sels dans la sous-phase stabilise la couche protéique interfaciale, ce comportement étant attribué à une diminution de solubilité des gliadines avec une force ionique croissante.

Pour une force ionique élevée (0.1 M NaCl), Örnebro⁷⁵ a suggéré que dans le cas de compression élevée d'une couche interfaciale de α -gliadines, les protéines n'étaient pas éjectées dans la sous-phase, mais restaient associées au film interfacial sous forme de boucles protubérantes dans la sous-phase. La structure de films d' α -gliadines a ensuite été étudiée par AFM⁴⁸. Des films ont été réalisés par deux procédés différents : transfert sur une surface de mica d'un film d' α -gliadines préparé à l'interface air-eau par la technique de Langmuir-Blodgett, et adsorption d' α -gliadines sur une surface de mica à partir d'une solution éthanolique. Les clichés obtenus par AFM en mode tapping sont présentés figure 7. Le film adsorbé apparaît beaucoup plus rugueux que le film transféré. Cette observation laisse suggérer que le film adsorbé comporte des formes agrégées de gliadines et qu'il ne s'agit donc pas d'une monocouche. De plus, des mesures de force, réalisées par SFA⁷⁶, ont montré que les films transférés d' α -gliadines avaient des structures très compactes et que leurs interactions étaient dominées par des répulsions électrostatiques à longue portée, alors que les films adsorbés en solution éthanolique interagissaient principalement par des forces stériques.

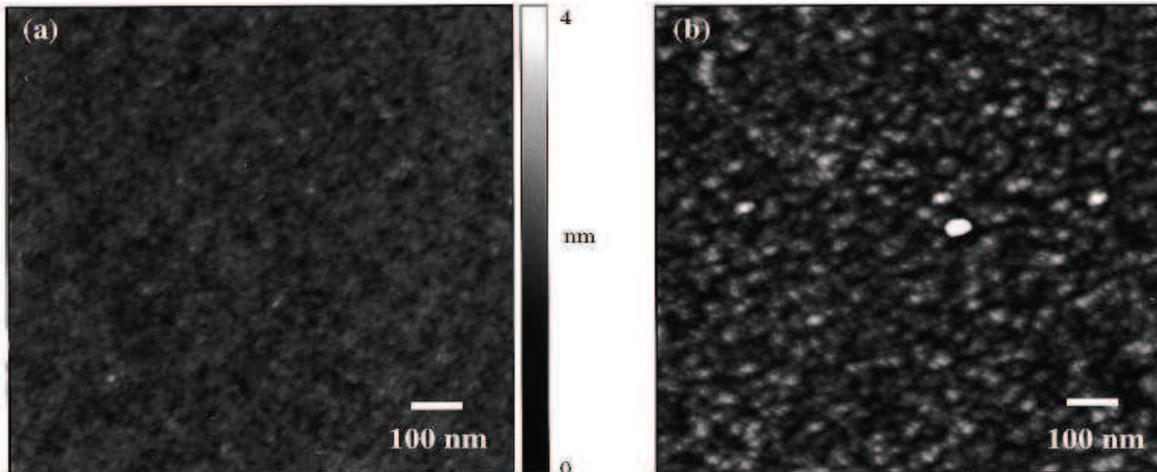


Figure 7 : Cliché de microscopie AFM de couches de α -gliadines déposées ou adsorbées sur une surface de mica : (a) couche prélevée à l'interface air-eau par la technique de Langmuir-Blodgett ($\Pi=20$ mN/m), (b) couche adsorbée depuis une solution éthanolique⁷⁶.

c) Interface membrane-eau (vésicules - monocouche)

Jusqu'à présent, très peu d'études ont été réalisées sur les prolamines à l'interface membrane-eau. Une première approche a été réalisée par Keller⁴⁵, à l'aide de films de Langmuir, pour étudier la compétition entre protéines et lipides pour l'adsorption aux interfaces des bulles gazeuses dans les pâtes. Cette étude a montré que pour des pressions interfaciales de monocouches lipidiques peu élevées, les gliadines s'inséraient à l'interface, alors qu'à partir d'un certain seuil (≈ 37 mN/m), les protéines étaient expulsées dans la sous-phase. Par ailleurs, une étude de l'influence des gliadines sur les propriétés mécaniques d'une membrane de vésicule géante a été réalisée⁴⁹. Il a été montré que le module élastique de la bicouche constituant la vésicule était augmenté par la présence de gliadines en solution. De ce résultat, une interaction gliadine-membrane a pu être déduite. Les gliadines ayant un caractère hydrophobe, les auteurs ont proposé un modèle de pénétration des gliadines dans la bicouche.

C. Biosynthèse et assemblage des protéines de réserve dans le grain de blé.

Le grain de blé mature contient 10 à 15 % de protéines ; 80 à 90 % de ces protéines sont des protéines de réserve stockées au niveau de l'albumen amylicé (figure 8), et servent de réserve d'azote et de carbone pour la germination et le développement futur de la plante⁵⁰.

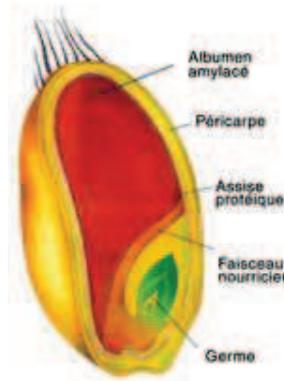


Figure 8 : Représentation schématique d'une coupe de grain de blé

Les protéines de réserve du grain de blé sont synthétisées durant le développement des graines, par les ribosomes, dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules de l'albumen amylicé. Ces protéines sont ensuite stockées sous forme de corpuscules protéiques, organites contenant une très grande quantité de protéines. Ce mode de stockage des protéines de réserve permet une utilisation efficace d'un espace limité tout en permettant la dessiccation lors de la maturation du grain, puis une bonne réhydratation et dégradation pendant la phase de germination⁵¹.

1. Routage des protéines de réserve

Deux voies de routage (figure 9) ont été identifiées pour la formation des corpuscules protéiques dans le grain de blé^{52,53} :

La voie sécrétoire classique, impliquant le passage des protéines par l'appareil de Golgi avant le stockage dans des vacuoles.

La voie, plus originale, impliquant l'accumulation des protéines directement dans le lumen du RE, pour former des systèmes denses en protéines, qui sont ensuite libérés dans le cytoplasme de la cellule sous forme de corpuscules protéiques. Ces corpuscules sont ensuite internalisés dans des vacuoles.

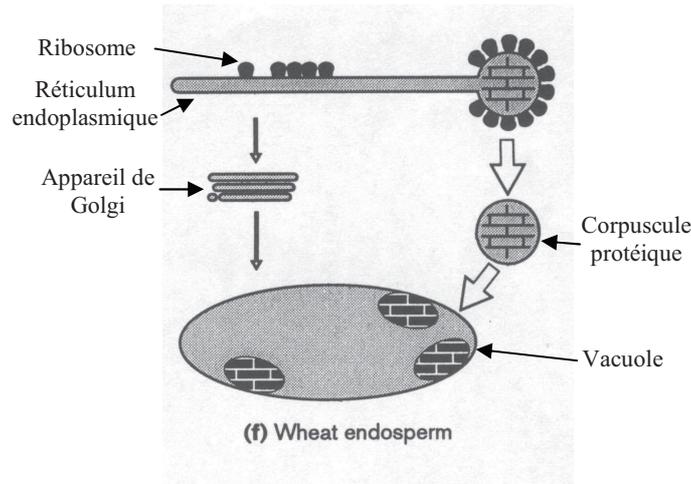


Figure 9 : Représentation schématique des deux voies de routage des protéines de réserve du blé : à gauche, la voie sécrétoire classique, via l'appareil de Golgi ; à droite, formation de corpuscules protéiques à l'intérieur du réticulum endoplasmique, transport dans le cytoplasme et internalisation dans des vacuoles par un procédé analogue à l'autophagie⁵⁴.

La seconde voie conduisant à la formation de compartiments dérivés du RE, attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique de biologie cellulaire végétale^{55,56,57,58}. En effet, les protéines de réserve n'ont pas de séquence de rétention type KDEL, et sont pourtant accumulées dans le RE, sans être considérées comme des protéines mal repliées qui sont normalement dégradées (figure 10). Cette voie, spécifique au monde végétal, permet de stocker soit des protéines ou huiles de réserve, soit des enzymes hydrolytiques. Les mécanismes régissant l'accumulation des protéines au sein du RE et la formation des corpuscules protéiques (CP) sont à l'heure actuelle mal connus.

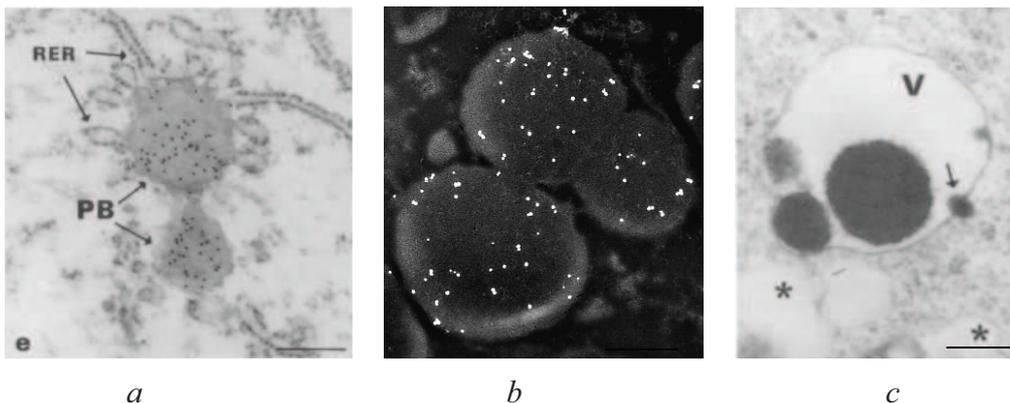


Figure 10 : Corpuscules protéiques dans le cytoplasme de cellules de l'albumen amyloacé de grain de blé, observés en microscopie électronique, après immunomarquage à l'antigène anti- γ gliadine (a et b). (a) Petits corpuscules protéiques (PB) entourés de membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER) - (b) Gros corpuscules protéiques détachés du RER - (c) Corpuscules protéiques internalisés dans des vacuoles (V) - Echelle $0.5 \mu\text{m}$ ⁵⁹

2. Accumulation des protéines de réserve au sein du réticulum endoplasmique

Dans la littérature, plusieurs facteurs pouvant entrer en jeu dans les mécanismes de formation des corpuscules protéiques via une accumulation au sein du RE ont été proposés :

- Des protéines chaperones résidant dans le RE ont été retrouvées dans la composition des corpuscules protéiques^{60,61}. Ces protéines sont connues pour assurer le repliement des protéines natives, par la formation des ponts disulfures dans le lumen du RE. Leur rôle dans l'accumulation des protéines de réserve au sein du RE a été suggéré⁶².
- Des protéines cargo, plus spécifiquement des protéases, sont également accumulées dans les corpuscules⁶³. Ces enzymes sont responsables de la dégradation des protéines de réserve lors de la germination. Ces protéines contiennent le signal de rétention K/HDEL, dont la suppression induit la sortie vers la voie sécrétoire plutôt que l'accumulation dans le RE. Il a donc été proposé que leur interaction avec les protéines de réserves prévienne le passage de ces dernières par la voie golgienne. De plus, il a été montré que la membrane des corpuscules protéiques contenait des récepteurs qui jouent un rôle dans la sélection et la concentration de ces protéines cargo.
- Le ciblage de l'ARN messenger pouvant induire la création de régions spécifiques de formation des corpuscules protéiques a été évoqué⁶⁴.
- La concentration de protéines dans le RE semble jouer un rôle sur le type de voie empruntée par les protéines de réserve. Dans les tissus jeunes, où il y a de hauts taux de biosynthèse, la voie de l'accumulation serait privilégiée⁶⁵.
- Des interactions entre les protéines de réserve et les lipides de la membrane du RE ont également été suggérées¹¹. Des études biophysiques d'interaction entre domaine répété de γ -zéines (protéine de réserve du maïs) et liposomes de PC ont été réalisées par Kogan *et al*⁶⁶. Ces études montrent une augmentation de stabilité et de perméabilité des liposomes lorsqu'ils sont en interaction avec les peptides de γ -zéines. Un modèle d'auto assemblage de ces peptides sur membrane lipidique est proposé.

3. Spécificités du blé

Dans le cas du blé, la plupart des travaux ont été réalisés par l'équipe de Galili. Les résultats marquant sont les suivants :

- Il existe deux types de corpuscules protéiques se différenciant par leur densité. Les corpuscules peu denses ne contiennent que des gliadines, alors que les plus denses contiennent gliadines, gluténines et protéines chaperones BiP (Binding Proteins).⁵²
- Les corpuscules denses résultent de l'accumulation de protéines de réserve dans le lumen du RE. Leur membrane est parfois recouverte de ribosomes. Ces corpuscules se détachent du RE et sont internalisés dans des vacuoles de stockage, contrairement au cas du riz ou du maïs, où les corpuscules restent attachés au RE.⁵⁹

- La γ -gliadine seule peut former des corpuscules protéiques denses dans le RE de la levure, ces corpuscules sont de même type que ceux des cellules du grain de blé naturel. La majorité des γ -gliadines passent par la voie de l'accumulation dans le RE, alors que des protéines mutantes, sans domaine N-terminal, passent essentiellement par la voie golgienne.⁶⁷
- La synthèse de γ -gliadines mutantes dans des oocytes de Xénope a permis d'attribuer des voies de routage spécifiques aux domaines N-terminal et C-terminal de la protéine de réserve. Le domaine répété N-terminal, plus hydrophile, passe totalement par la voie de l'accumulation alors que le domaine globulaire hydrophobe, C-terminal de la protéine passe par la voie golgienne.⁶⁸
- Des expériences de pulse-chase dans des oocytes de Xénope ont montré que les γ -gliadines pouvaient diffuser librement à l'intérieur du RE, contrairement à des protéines mutantes (où les cystéines sont remplacées par des sérines). Les γ -gliadines pouvant former des CP par la voie de l'accumulation, ces expériences suggèrent que la voie de l'accumulation n'est pas simplement due à une agrégation rapide des protéines de réserve qui ne sont pas solubles dans l'eau.⁶⁹
- Des expériences *in vitro* ont montré qu'une partie des protéines de réserve du blé était soluble dans un tampon aqueux, et que les agrégats formés par le reste des protéines étaient issus d'interactions faibles. Les agrégats formés par des protéines de réserve dénaturées (après réduction des ponts disulfures) apparaissent plus stables et seraient donc régis par des interactions plus fortes.⁷⁰
- Des expériences récentes d'immunocolocalisation⁷¹ sur des corpuscules protéiques de blé ont montré que les deux types de corpuscules protéiques contenaient toutes les catégories de prolamines. De plus, aucune organisation particulière des différents types de prolamines n'a pu être observée.

D. Objectifs et stratégie du travail de thèse

L'objectif de ce travail de thèse s'inscrit dans la volonté de compréhension des mécanismes qui régissent l'assemblage naturel des protéines de réserve de blé dans le grain. Les biologistes ont montré que ces protéines étaient stockées dans des organites, nommés corpuscules protéiques (CP), localisés essentiellement dans les cellules de l'albumen amylacé de la graine. Deux voies ont été identifiées pour la biogenèse des CP du blé : la voie sécrétoire classique, via l'appareil de Golgi, et une voie plus originale qui consiste en une accumulation des protéines néo-synthétisées dans le RE, conduisant à l'émergence des CP hors du RE. A l'heure actuelle, les mécanismes qui gouvernent la voie de l'accumulation sont incompris. En effet, l'agrégation des protéines au sein du RE conduit normalement à la voie de la dégradation destinée aux protéines mal repliées, et les protéines de réserve ne possèdent pas de motif de rétention dans le RE, du type KDEL. Plusieurs hypothèses ont donc été proposées pour expliquer l'accumulation des protéines dans le RE. L'une d'entre elles est l'auto-

assemblage des protéines de réserve, couplé d'une interaction de ces protéines avec la membrane du RE. C'est cette hypothèse que nous explorons dans ce travail de thèse, avec une approche biophysique. De nombreuses études, ont montré qu'il était possible de former des CP à partir de protéines de réserve synthétisées dans des cellules très différentes de celles de l'albumen amylicée des graines, qui sont hautement spécialisées. Il a donc été suggéré que l'accumulation des protéines de réserve était probablement due aux propriétés intrinsèques des protéines⁷². Ainsi, une approche biophysique apparaît raisonnable. Des protéines de réserve modèles sont utilisées dans cette étude : la γ -gliadine et la ω -gliadine. La γ -gliadine est considérée comme la protéine ancestrale des protéines de réserve, et a la capacité de s'assembler seule sous forme de corpuscules protéiques par la voie de l'accumulation lorsqu'elle est exprimée dans des systèmes hétérologues. De plus, cette protéine possède un domaine répété d'acides aminés, et un domaine non répété comme la plupart des protéines de réserve. La ω -gliadine, composée d'un unique domaine répété, est choisie comme modèle des protéines de réserve de type "S-poor". Elle représente également un bon modèle du domaine répété de la γ -gliadine.

Ce travail de thèse se décompose en deux parties :

-La première partie est consacrée à l'auto-assemblage des protéines de réserve dans des milieux aqueux. L'étude bibliographique montre que certains travaux ont déjà été réalisés sur des solutions de gliadines, mais souvent dans des solvants acides ou éthanoliques qui permettent de solubiliser les prolamines. Cependant une étude réalisée avec des solvants aqueux, proches du contexte biologique (pH neutre), est nécessaire pour notre problématique. Ainsi nous étudions l'auto-assemblage des protéines de réserve dans l'eau et à l'interface air-eau.

-La seconde partie est consacrée à l'étude de l'interaction protéine de réserve – membrane lipidique. A notre connaissance, deux études seulement, suggérant une telle interaction, ont été réalisées à ce jour. Deux approches différentes sont engagées dans cette thèse. Dans un premier temps, des protéines de réserve de blé sont insérées dans des phases lamellaires de tensio-actifs afin d'étudier le confinement des protéines au sein d'un système membranaire. Ensuite, des protéines de réserve de blé sont injectées sous des monocouches de lipides à l'interface air-eau afin de focaliser l'étude sur l'interface membrane-eau.

BIBLIOGRAPHIE

¹ d'après le secrétariat de la Conférence des Nations Unies sur le Commerce Et le Développement (CNUCED).

² Pallos, Pavlath, Orts, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 349-352.

³ Ezpeleta, Irache, Stainmesse, Chabenat, Guegen, Popineau, Orecchioni, *Int J Pharmaceutics* **1996**, 131, 191-200.

⁴ Duclairioir, C. *Thèse de l'Université de Caen* **2000**.

-
- ⁵ Shewry, Tatham, *Biochem. J.* **1990**, 267, 1-12.
- ⁶ Payne, Corfield, Blackman, *Theor. Appl. Genet.* **1979**, 55, 153–159.
- ⁷ Burnouf, Bouriquet, *Theor. Appl. Genet.* **1980**, 58, 107–111.
- ⁸ Brown, Flavell, *Theor. Appl. Genet.* **1981**, 59, 349–359.
- ⁹ Wieser, Seilmeier, Belitz, *J. Cereal Sc.* **1994**, 19, 149-155.
- ¹⁰ Bunce, White, Shewry, *J. Cereal Sc.* **1985**, 3, 131-142.
- ¹¹ Shewry, Halford, *J. Exp. Botany* **2002**, 53, 370, 947-958.
- ¹² Piston, Dorado, Martin, Barro, *J Cereal Sci.* **2006**, 43, 120-128.
- ¹³ http://www.expasy.org/uniprot/Q6EEW9_WHEAT
- ¹⁴ D'Ovidio, Simeone, Masci, Porceddu, Kasarda, *Cereal Chem.* **1995**, 72, 443-449.
- ¹⁵ Kyte, Doolittle, *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 105-132.
- ¹⁶ Aibara, *J. Crystal Growth* **1995**, 155, 247-253.
- ¹⁷ Tatham, Shewry, *J. Cereal Sci.* **1985**, 3, 103-113.
- ¹⁸ Pézolet, Bonenfant, Dousseau, Popineau, *FEBS Lett.* **1992**, 299, 247-250.
- ¹⁹ Tatham, Masson, Popineau, *J. Cereal Sci.* **1990**, 11, 1-3.
- ²⁰ Blanch, Kasarda, Hecht, Nielsen, Barron, *Biochemistry* **2003**, 42, 5665-5673.
- ²¹ Hsia, Anderson, *Theor. Appl. Genet.* **2001**, 103, 37-44.
- ²² Purcell, Kasarda, Wu, *J. Cereal Sci.* **1988**, 7, 21-32.
- ²³ Wellner, Belton, Tatham, *Biochem. J.* **1996**, 319, 741-747.
- ²⁴ Areas, Cassiano, *Biophys. Chem.* **2001**, 90, 135-146.
- ²⁵ Popineau, Denery-Papini, dans : *Protéines Végétales* **1996**, Godon, Ed. Sciences et Techniques Alimentaires.
- ²⁶ Cole, Torres, Kasarda, *Cereal Chem.* **1983**, 60, 4, 306-310.
- ²⁷ Holme, Briggs, *Cereal Chem.* **1959**, 36, 321-340.
- ²⁸ Popineau, Pineau, *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* **1988**, 21, 113-117.
- ²⁹ Fu, Sapirstein, Bushuk, *J. Cereal Sci.* **1996**, 24, 241-246.
- ³⁰ Orecchioni, Duclairoir, Renard, Nakache, *J. Nanosc. Nanotech.* **2006**, 6, 3171-3178.
- ³¹ Thomson, Miles, Popineau, Harries, Shewry, Tatham, *Biochem.Biophys. Acta* **1999**, 1430, 359-366.
- ³² Thomson, Miles, *Ultramicroscopy* **1992**, 42-44, 1204-1213.
- ³³ Bungenberg de Jong, "*Crystallisation –Coacervation-Flocculation*" **1949**, 232-258.
- ³⁴ Duclairoir, Nakache, Marchais, Orecchioni, *Colloid Polymer Sci.* **1998**, 276, 321-327.
- ³⁵ Shomer, Lookhart, Vasiliver, Bean, *J. Cereal Sci.* **1998**, 27, 27-36.

-
- ³⁶ Kasarda, Bernardin, Thomas, *Science* **1967**, 155, 203-205.
- ³⁷ McMaster, Miles, Kasarda, Shewry, Tatham, *J. Cereal Sci.* **1999**, 31, 281-286.
- ³⁸ Xu, Tseng, Carriere, Wirtz, *Biomacromolecules* **2002**, 3, 92-99.
- ³⁹ Wannerberger, Wahlgren, Eliasson, *Cereal Chem.* **1996**, 73, 499-505.
- ⁴⁰ Örnebro, Wahlgren, Eliasson, Fido, Tatham, *J. Cereal Sci.* **1999**, 30, 105-114.
- ⁴¹ Örnebro, Nylander, Eliasson, Shewry, Tatham, Gilbert, *J. Cereal Sci.* **2001**, 34, 141-150.
- ⁴² Eliasson, Silverio, Tjerneld, *J. Cereal Sci.* **1991**, 13, 27-39.
- ⁴³ Amend, Belitz, *Zeitschrift für Lebens.-Unter-suchungen und-Forschung*, **1989**, 189, 103-109.
- ⁴⁴ Lundh, Eliasson, Larsson, *J. Cereal Sci.* **1988**, 1988, 7, 1-9.
- ⁴⁵ Keller, Orsel, Hamer, *J. Cereal Sci.* **1997**, 25, 175-183.
- ⁴⁶ Bietz, Burnouf, *Theor. Applied Genet.* **1985**, 70, 599-609.
- ⁴⁷ Örnebro, Nylander, Eliasson, Shewry, Tatham, Gilbert, *J. Cereal Sci.* **2003**, 38, 147-156.
- ⁴⁸ Wannerberger, Nylander, Eliasson, Tatham, Fido, Miles, McMaster, *J. Cereal Sci.* **1997**, 26, 1-13.
- ⁴⁹ Monteiro, Areas, Schröder, Fa, *Colloids and Surfaces* **2004**, 34, 53-57.
- ⁵⁰ Galili, Shimoni, Giorini-Silfen, Levanony, Altschuler, Shani, *Plant Physiol. Biochem* **1996**, 34 (2), 245-252.
- ⁵¹ Galili, *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3411-3413.
- ⁵² Rubin, Levanony, Galili, *Plant Physiol.* **1992**, 99, 718-724.
- ⁵³ Levanony, Rubin, Altschuler, Galili, *J. Cell Biol.* **1992**, 119, 5, 1117-1128.
- ⁵⁴ Matsuoka, Bednarek, *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998**, 1, 463-469.
- ⁵⁵ Vitale, Hinz, *Trends in Plant Science* **2005**, 10, 7, 316-323.
- ⁵⁶ Galili, *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3411-3413.
- ⁵⁷ Hara-Nishimura, Matsushima, Shimada, Nishimura, *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3435-3439.
- ⁵⁸ Vitale, Galili, *Plant Physiol.* **2001**, 125, 115-118.
- ⁵⁹ Levanony, Rubin, Altschuler, Galili, *J. Cell Biol.* **1992**, 119, 5, 1117-1128.
- ⁶⁰ Shimoni, Zhu, Levanony, Segal, Galili, *Plant Physiol.* **1995**, 108, 327-335.
- ⁶¹ Muench, Wu, Zhang, Li, Boston, Okita, *Plant Cell Physiol.* **1997**, 38, 404-412.
- ⁶² Vitale, Cerriotti, *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3420-3426.
- ⁶³ Hara-Nishimura, Matsushima, Shimada, Nishimura, *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3435-3439.
- ⁶⁴ Crofts, Washida, Okita, Ogawa, Kumamaru, Satoh, *Plant Physiol.* **2004**, 136, 3414-3419.
- ⁶⁵ Cerriotti, Pedrazzini, Fabbrini, Zoppe, Bollini, Vitale, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 202, 959-968.

- ⁶⁶ Kogan, Lopez, Cocera, Lopez-Iglesias, De La Maza, Giralt, *Biopolymers* **2004**, 73, 2, 258–268.
- ⁶⁷ Rosenberg, Shimoni, Altschuler, Levanony, Volokita, Galili, *Plant Physiol.* **1993**, 102, 61-69.
- ⁶⁸ Altschuler, Rosenberg, Harel, Galili, *Plant Cell* **1993**, 5, 443-450.
- ⁶⁹ Galili, Altschuler, Levanony, Giorini-Silfen, Shimoni, Shani, Karchi, *J. Plant Physiol.* **1995**, 145, 626-631.
- ⁷⁰ Shimoni, Galili, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 18869-18874.
- ⁷¹ Loussert, Popineau, Mangavel, *J. Cereal Sci.* **2007**, en cours d'impression.
- ⁷² Geli, Torrent, Ludevid, *The Plant Cell* **1994**, 6, 1911-1922.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre, le matériel et les méthodes utilisés au cours de la thèse sont présentés. Afin de répondre aux diverses questions posées par la problématique, plusieurs types de systèmes ont été mis en place et étudiés au cours de ce travail. Ainsi, le matériel et les techniques expérimentales ne sont pas présentés de manière exhaustive, mais dans le cadre spécifique des systèmes étudiés.

A. Matériel

Le matériel utilisé dans ce travail est d'origine commerciale pour ce qui est des solvants, tensioactifs et lipides, alors que les protéines de réserves sont issues de la purification de la farine de blé réalisée par Jean-Pierre Compoint et Dominique Melcion à l'INRA de Nantes. Le protocole de marquage de la γ -gliadine par un fluorophore a été mis au point au cours de la thèse.

1. Gliadines

a) Purification

(1) Protocole de purification

Les gliadines utilisées pour ce travail de thèse ont été purifiées à l'échelle préparative, à l'INRA de Nantes, à partir d'une farine de blé de la variété Hardi.

Dans un premier temps, les gliadines totales sont obtenues à partir de la farine, par lavage à l'eau pour extraire l'amidon et les fibres, puis lavage au dichlorométhane pour extraire les lipides. Enfin les gliadines sont extraites du gluten avec une solution eau/éthanol 30/70. Les gliadines totales sont ensuite dialysées contre l'eau, puis contre l'acide acétique pendant une semaine pour être congelées et lyophilisées.

Dans un second temps, les gliadines totales sont fractionnées par plusieurs méthodes chromatographiques¹ pour obtenir des ω -gliadines lentes et des γ_{46} -gliadines. Le protocole est résumé par le schéma ci-dessous (figure 1):

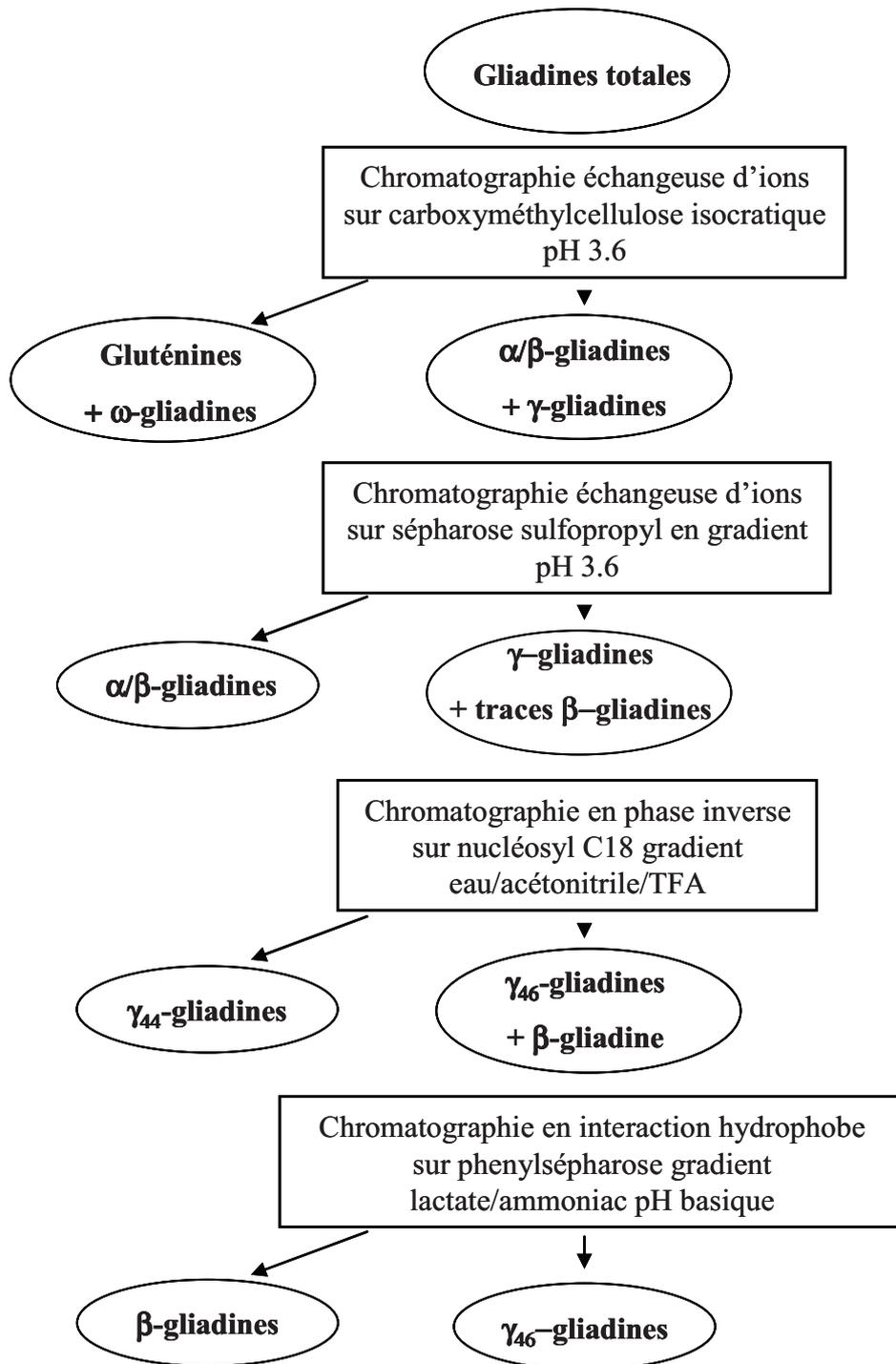


Figure 1 : Schéma du protocole de purification des gliadines

Dans un premier temps, les gliadines totales sont passées en chromatographie échangeuse d'ions CM92 (Whatman) isocratique à pH 3.6. Le tampon A d'éluant est composé de lactate de sodium 0.01 M et d'urée 2 M, ajusté au pH 3.6 par ajout d'acide lactique. Le tampon B a la même composition que le tampon A auquel a été ajouté 0.5 M de NaCl. La colonne utilisée est le modèle XK 50/150 et le débit est de 5 mL/min. Les étapes d'éluant sont les suivantes : 0 % d'éluant B pendant 80 minutes, 50 % d'éluant B pendant 40 minutes et de nouveau 0 % d'éluant B pendant 40 minutes. La solution de gliadines totales injectée est préparée à partir de 10 g de protéines lyophilisées, solubilisées dans 500 mL de tampon A, agitée une nuit à température ambiante, puis centrifugée à 55000 G pendant 20 minutes.

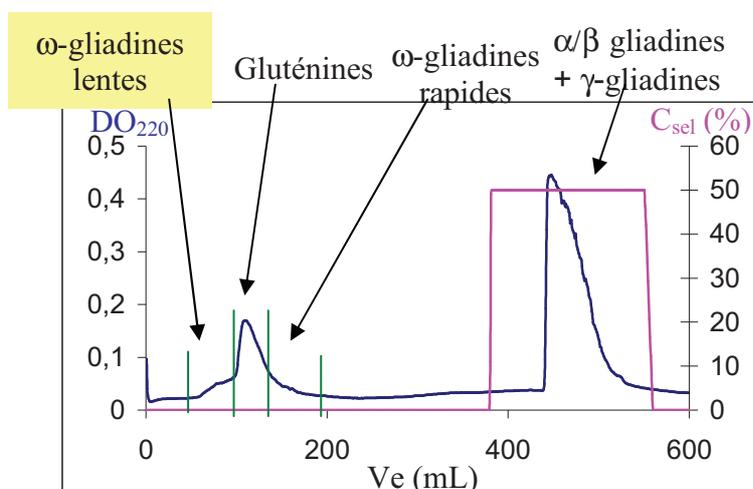


Figure 2 : Profil de séparation des gliadines totales sur gel de CM 92. En bleu, absorbance à 220 nm, en rose % d'éluant B.

Les fractions de gliadines collectées sont (figure 2):

- ω -gliadines lentes à $50 < V_e < 100$ mL
- Gluténines à $100 < V_e < 130$ mL
- ω -gliadines rapides à $130 < V_e < 190$ mL
- α/β et γ -gliadines à $420 < V_e < 520$ mL

Les fractions obtenues sont ensuite mises en dialyse contre de l'eau permutée pendant 2 jours, puis contre de l'acide acétique 0.01 M pendant 2 jours supplémentaires.

Ce sont les ω -gliadines lentes résultant de cette première colonne qui sont lyophilisées et utilisées dans ce travail de thèse. Cependant, afin d'obtenir des γ_{46} -gliadines, d'autres étapes de purification sont nécessaires.

Ainsi dans un second temps, la fraction dialysée contenant α/β - et γ -gliadines est déposée sur un gel de Sépharose afin de séparer les α/β -gliadines (figure 3). La chromatographie échangeuse d'ions sur Sépharose sulfopropyl fast flow (GE Amersham Pharmacia Biotech) en gradient, pH 3.6, est utilisée. La colonne, les éluants et le débit sont les mêmes que dans la première étape. Une éluant en gradient linéaire est réalisée: 0 % d'éluant B pendant 50

minutes, obtention de 30 % d'éluant B en 1226 minutes, obtention de 100 % d'éluant B en 2 minutes, puis 100 % d'éluant B pendant 200 minutes.

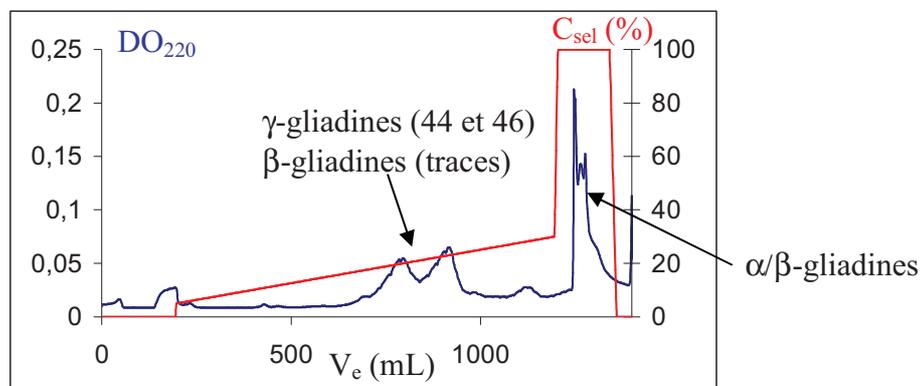


Figure 3 : Profil de séparation des gliadines totales sur gel de Sépharose SP

Les fractions de γ -gliadines sont groupées, dialysées contre de l'acide acétique 0.01 M et lyophilisées.

Dans une troisième étape, cette fraction contenant les γ -gliadines et des traces de β -gliadines est passée en chromatographie à polarité de phase inverse sur Nucléosil C18 (300 Å, 5 μ m, Interchim). Le solvant d'éluant est un gradient d'eau/acétonitrile/TFA (solution A : eau/TFA 0.1 %, solution B : acétonitrile/TFA 0.08 %). Le débit est de 18 mL/min, et le gradient permet de passer de 34 à 53 % de B en 25 minutes. La solution injectée est préparée à partir de 300 mg de γ -gliadines, dissoutes dans 20 mL de tampon A pendant 1 heure à température ambiante, puis filtrées sur 0.45 μ m (Sartorius, Millipore). Le profil est suivi en milli-absorbance (mAU) (figure 4). Cette étape permet de séparer les γ_{44} -gliadines.

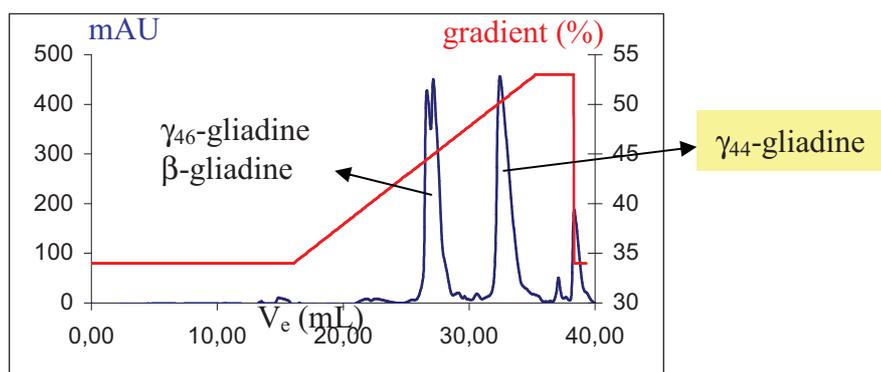


Figure 4 : Profil de séparation en phase inverse nucléosil C18

Afin de purifier les γ_{46} -gliadines, une dernière séparation chromatographique est réalisée par interaction hydrophobe sur phénylsépharose avec un gradient lactate/ammoniac à pH basique (figure 5). Le tampon A, de pH 3.6, est composé de lactate (0.01 M) et d'urée (0.5 M) ; le tampon B est composé d'ammoniac à 25 % (pH 11) et la solution C est composée d'ammoniac et d'éthanol à 70 %, pH 11. Le débit est de 10 mL/min. Pendant les 12 premières minutes, l'éluant est réalisé avec un mélange de tampons A (65 %) et B (35 %), puis

pendant 10 minutes avec 100 % de tampon B. Ensuite, un gradient linéaire de tampons A et C est réalisé pour obtenir 53 % de tampon C, enfin l'élution est maintenue avec 53 % de tampon C pendant 5 minutes.

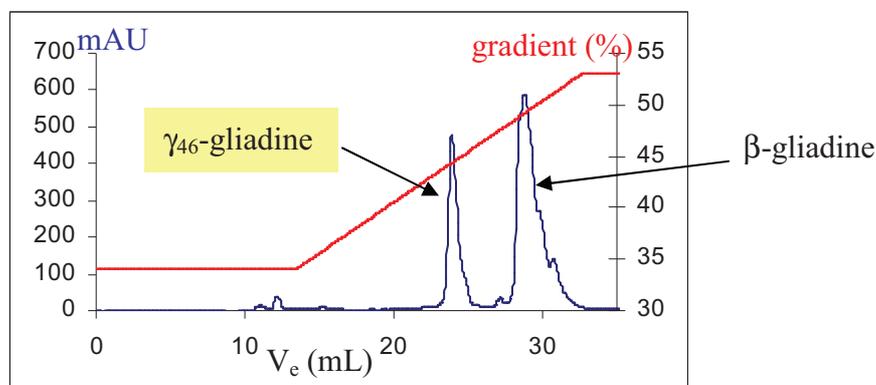


Figure 5 : Profil de séparation chromatographique d'interaction hydrophobe

Les fractions purifiées sont ensuite dialysées contre de l'acide acétique, puis congelées et lyophilisées pour être stockées.

(2) Caractérisation des protéines purifiées

Les protéines purifiées ont été caractérisées par chromatographie de phase inverse (mêmes conditions que l'étape 3 de purification), et par spectrométrie de masse. Les résultats chromatographiques sont présentés figure 6. Les fractions purifiées sortent de la colonne à un volume d'élution bien défini.

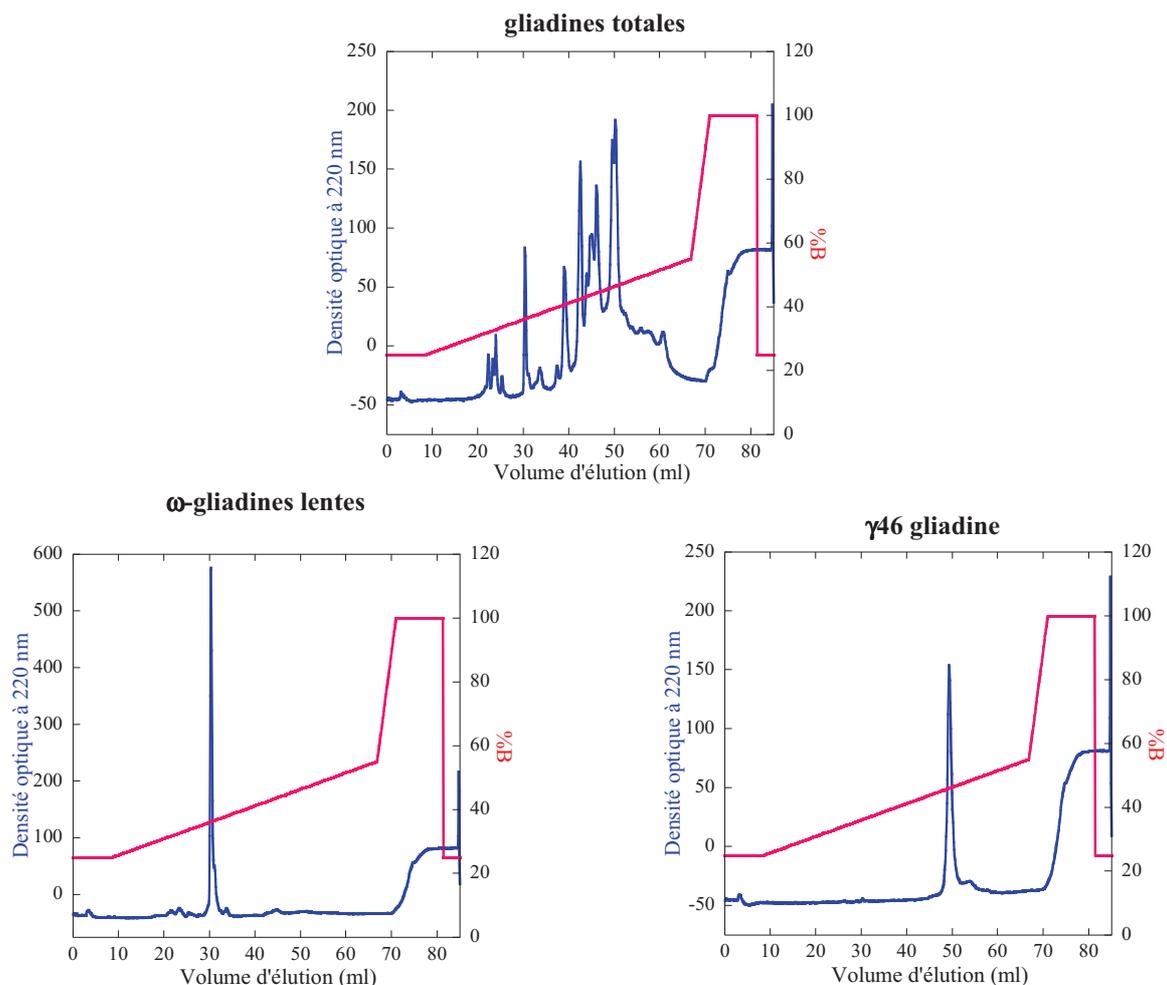


Figure 6 : Caractérisation des fractions de gliadines totales, γ_{46} -gliadines et ω -gliadines lentes par chromatographie de phase inverse.

Ensuite, en sortie de colonne chromatographique, les protéines purifiées ont été caractérisées par spectrométrie de masse de type infusion à électrospray (ESI)². Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Fraction	% de population	Masse molaire (g/mol)	Ecart type
γ_{46} -gliadine	81	35 185	0.68
	19	34 614.18	1.63
ω -gliadine	100	42 734.28	1.8

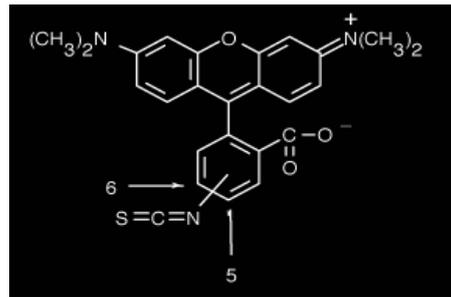
Tableau 1 : Caractérisation des fractions de gliadines totales, γ_{46} -gliadines et ω -gliadines lentes par spectrométrie de masse.

Deux populations de masse molaires relativement proches sont mises en évidence dans la fraction de γ_{46} -gliadines purifiées alors qu'une seule population est détectée dans la fraction de ω -gliadines.

b) Marquage fluorescent de la γ -gliadine

(1) Type de marquage

Afin de réaliser des observations en microscopie de fluorescence et des mesures de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), la γ_{46} -gliadine a été marquée avec une sonde fluorescente : la tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC, mélange d'isomères, Invitrogen).



$M_w=536$ g/mol
 $\lambda_{exc}=544$ nm
 $\lambda_{em}=572$ nm

Figure 7 : Molécule de TRITC

Ce type de sonde se lie de façon covalente avec les protéines par le biais de la réaction décrite dans la figure 8. La fonction isothiocyanate du marqueur réagit avec des fonctions amines aliphatiques déprotonées. Dans les protéines, on trouve des fonctions amines aliphatiques dans les lysines et en N-terminal. De façon à garder les fonctions amines de la protéine sous la forme non protonée, la réaction de marquage doit se faire à pH basique.

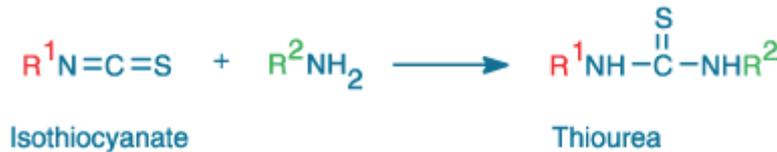


Figure 8 : Réaction de marquage de type isothiocyanate

Cependant, les gliadines ne sont pas solubles dans des solvants aqueux à pH basique, et contiennent peu de lysines dans leur séquence primaire (< 1 %). Des études ont donc dû être réalisées pour optimiser un protocole adapté aux γ -gliadines.

(2) Techniques d'étude du marquage

Le taux de marquage des protéines a été évalué par spectroscopie UV-Visible (voir suite du chapitre 2). La concentration du marqueur a été déterminée à partir de sa bande d'adsorption spécifique à $\lambda = 553$ nm, qui a un coefficient d'extinction $\epsilon = 112 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ dans l'eau:éthanol (45:55), et la concentration de gliadines³ a été déterminée grâce au pic d'adsorption à $\lambda = 280$ nm caractéristique des acides aminés chromophores tels que la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane. Cependant le marqueur absorbe également à la longueur d'onde caractéristique des protéines, et sa contribution a donc dû être prise en compte de la façon suivante :

$$A_{prot} = A_{280} - F \cdot A_{553} \quad \text{Équation 1}$$

Avec A_{prot} l'absorption corrigée de la protéine, A_i , la valeur d'absorption mesurée à i nm, et F le facteur d'adsorption du marqueur à 280 nm, évalué sur le spectre d'absorption du marqueur seul par le calcul suivant :

$$F = A_{280}/A_{553} \quad \text{Équation 2}$$

La présence de marqueur libre dans la solution de protéines marquées a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Marqueur libre et protéine on pu être dissociés sur une colonne TSK-HW-55- F, avec un éluant eau:éthanol (45:55), un débit de 0.5 ml/min, et une détection UV à 220 nm.

La nature du marquage a été évaluée grâce à un traitement des protéines marquées, à l'hydroxylamine, composé réagissant fortement avec le marqueur libre, ou le marqueur faiblement lié à la protéine. Le protocole est le suivant :

- Ajout d'une solution d'hydroxylamine 5 M, pH 8.5 (ajusté avec NaOH), à la solution de protéine marquée, de façon à obtenir un ratio massique hydroxylamine/protéine =1.
- Incubation 1h à température ambiante sous agitation.
- Dialyse pendant 2 jours avec un boudin à seuil de coupure 12 -14 000 g/mol.
- Mesure du taux de marquage et estimation de la perte de marquage due au traitement.

(3) Résultats de l'étude du marquage des gliadines

Différents paramètres du protocole de marquage des gliadines ont été étudiés :

- le ratio molaire marqueur / protéine introduit dans le milieu réactionnel
- la durée d'incubation des protéines avec le marqueur
- la température d'incubation des protéines avec le marqueur
- l'effet de la lyophilisation du produit marqué
- le solvant du milieu réactionnel (solvants testé : eau:éthanol (45:55), tampon pH9, tampon pH9:éthanol (45:55), tampon pH9:dioxane (80:20))

Il en résulte que la lyophilisation n'a pas d'effet sur le taux de marquage alors que l'augmentation du ratio initial marqueur / protéine, la durée et la température d'incubation permettent d'augmenter le taux de marquage final. Le type de solvant utilisé ne semble pas avoir d'effet remarquable sur le taux de marquage et les mesures de SEC ont montré qu'il n'y avait pas de marqueur libre dans nos solutions de gliadines marquées. Cependant, des traitements successifs de gliadines marquée à l'hydroxylamine ont montré que le marquage n'était pas très stable dans le cas du solvant eau:éthanol. Du fait que le milieu réactionnel ne soit pas basique, il pourrait s'agir d'un marquage des sérines et non pas des lysines, ce qui impliquerait une liaison ester, instable dans l'eau. Les gliadines n'étant pas solubles dans les tampons basiques, le solvant de solubilisation de la protéine le plus propice à la réaction s'est révélé être un mélange tampon pH 9 (bicarbonate 0.1 M) -éthanol. Ce type de solvant permet un marquage covalent qui n'est pas altéré par les traitements à l'hydroxylamine.

(4) Protocole adopté

Le protocole de marquage des γ -gliadines utilisé dans le cadre de cette thèse est le suivant :

- Préparation d'une solution de protéine à 10 mg/mL dans une solution : tampon bicarbonate (0.1 M) pH 9 : éthanol (45:55).
- Préparation d'une solution de marqueur 10 mg/mL dans du DMSO.
- Ajout de la solution de marqueur dans la solution de protéine ratio molaire marqueur/protéine = 10.
- Incubation pendant 7 heures, à 50 °C, à l'abri de la lumière, sous agitation magnétique.
- Dialyse de la solution dans un mélange eau:éthanol (45 :55) pour éliminer l'excès de marqueur.
- Mesure du ratio final marqueur/ protéine.
- Lyophilisation

Ce type de protocole permet d'obtenir un ratio molaire marqueur/ protéine ~ 1 .

2. Solvants**a) Solubilisation**

Les gliadines ne sont pas solubles dans les milieux aqueux à pH neutre. Elles peuvent être solubilisées dans des mélanges eau-éthanol, ou dans des solutions acides (pH 3). La solubilité instantanée des γ -gliadines en fonction du rapport eau-éthanol (v/v) est présentée dans la figure 9. Les mesures ont été réalisées par mesure de concentration (spectroscopie UV-Visible) de mélanges solvant-gliadine, filtrés à 0.05 μm .

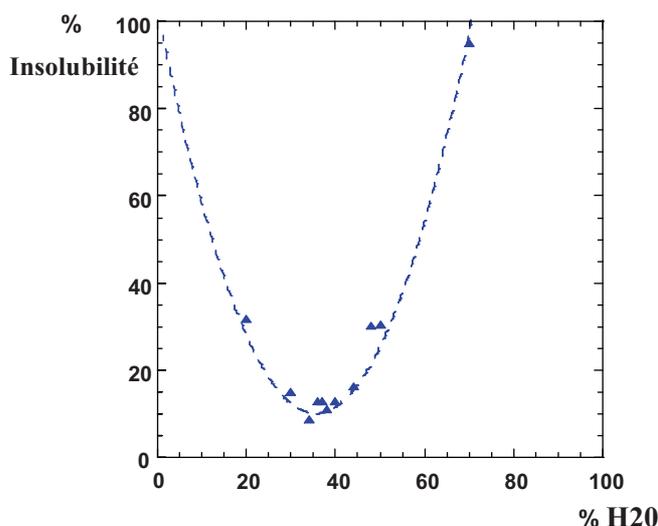


Figure 9 : Solubilité de la γ -gliadine dans des mélanges eau-éthanol déterminée par la mesure de concentration en spectroscopie UV-Visible après filtration sur 0.05 μm .

Dans ce travail de thèse, les gliadines sont solubilisées dans des mélanges eau-éthanol 45:55 pour des raisons historiques.

b) Contexte biologique

Les conditions de solvant dans la lumière du réticulum endoplasmique des cellules de l'albumen du blé ne sont pas vraiment connues. Cependant, le pH de la lumière du réticulum endoplasmique est estimé proche de la neutralité^{4,5}. Ainsi, dans le cadre de cette thèse nous essayons, autant que possible, de travailler dans des solvants aqueux à pH neutre. De façon générale nous travaillons soit avec de l'eau ultrapure, soit avec un tampon phosphate, pH 7.2, 0.05 M.

3. Membranes

a) Membranes biologiques

De façon générale, les membranes biologiques ont des compositions complexes⁶. Elles sont principalement composées d'une bicouche de phospholipides, mais contiennent également du cholestérol, des protéines transmembranaires et périphériques, et des oligosaccharides fixés sur des protéines ou des lipides (figure 10). Leur composition varie selon le type de membrane cellulaire, le stade de développement et les facteurs environnementaux, de façon à remplir un rôle très spécifique.

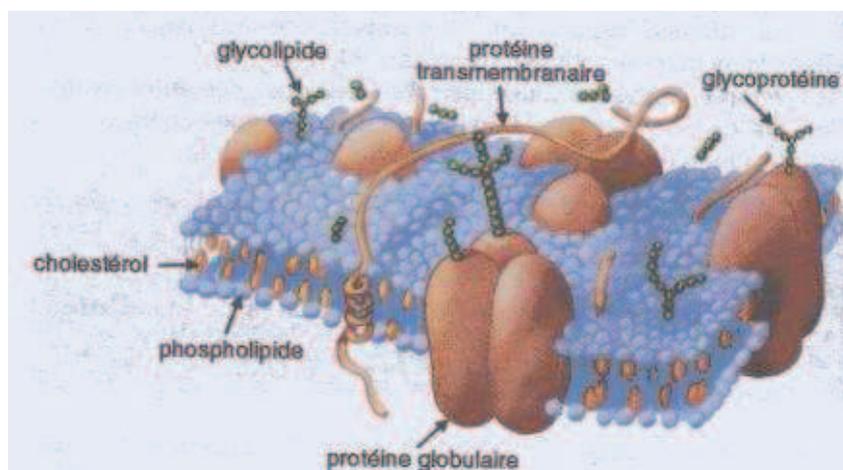


Figure 10 : Représentation schématique d'une membrane biologique⁷

Dans le cas du blé, la composition lipidique du réticulum endoplasmique des cellules de l'endosperme n'est pas connue à l'heure actuelle. Cependant, il a été montré que l'albumen amylicé du blé contenait une quantité remarquablement importante de N-acylphosphatidylethanolamine, qui pouvait représenter jusqu'à plus de 50 % des phospholipides lors de la phase de déshydratation de l'endosperme⁸. Ces phospholipides sont généralement produits lors de changement dégénératifs ou de maladies cellulaires. On peut donc supposer que ces lipides ne sont pas forcément majoritaires lors de l'étape de formation

des corpuscules protéiques. Par ailleurs, il a été montré que les phospholipides majoritaires de la membrane du réticulum endoplasmique du maïs étaient des phosphatidylcholines (PC)⁹ et que la charge globale de la membrane était négative. Ainsi, dans le cadre de notre étude, nous travaillons avec des membranes modèles très simplifiées composées d'un seul type de lipide : soit de la PC car elle est le phospholipide majoritaire, soit de la PG pour étudier l'effet de la charge négative.

b) Auto-association des lipides et tensio-actifs

Les lipides et tensio-actifs sont des molécules dites amphiphiles, de par l'existence au sein de la même molécule, d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Cette organisation particulière leur confère des propriétés singulières d'auto-organisation. Les molécules amphiphiles sont, en solution dans l'eau, susceptibles de former une grande variété d'agrégats supra-moléculaires¹⁰ tels que des micelles sphériques ou cylindriques, des membranes ou des vésicules. A l'interface air-eau, ces molécules s'auto-organisent sous forme de monocouches. Deux types de membranes modèles sont utilisés dans cette thèse : des bicouches de molécules amphiphiles organisées en volume sous forme de phases lamellaires et des monocouches de lipides à l'interface air-eau.

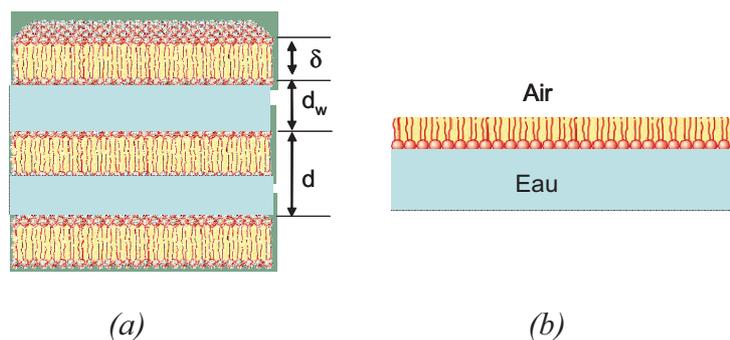


Figure 11 : Représentation schématique (a) d'une phase lamellaire (b) d'une monocouche à l'interface air-eau.

Les phases lamellaires sont des empilements périodiques (d) de bicouches d'épaisseur δ , séparées par une couche aqueuse (d_w), dont l'épaisseur varie selon la dilution du système. On a donc $d = \delta + d_w$. Pour un échantillon homogène et monophasique, la périodicité de la phase lamellaire est liée à la fraction volumique en membrane (ϕ_m), par l'expression :

$$\phi_m = \delta/d \quad \text{Équation 3}$$

Avec ϕ_m la fraction volumique en membrane dans l'échantillon.

Ces phases apparaissent dans des domaines concentrés du diagramme de phases de molécules amphiphiles dans l'eau. Il existe au moins trois types d'organisations des molécules au sein d'une bicouche dans les systèmes lamellaires: la phase L_α , la phase L_β' et la phase P_β' (figure 12). Dans la phase L_α , phase lamellaire fluide, l'organisation des molécules est de type liquide au sein de membranes planes en moyenne. Dans la phase P_β' , les membranes sont déformées de manière périodique. Les molécules sont alors généralement inclinées par rapport à la normale aux couches et sont organisées au sein des membranes. Enfin, dans la phase L_β' , phase lamellaire gel, les molécules sont inclinées par rapport à la normale aux couches et sont

organisées au sein de membrane planes. Dans ce travail nous utilisons des phases L_α qui sont les plus proches des membranes biologiques.

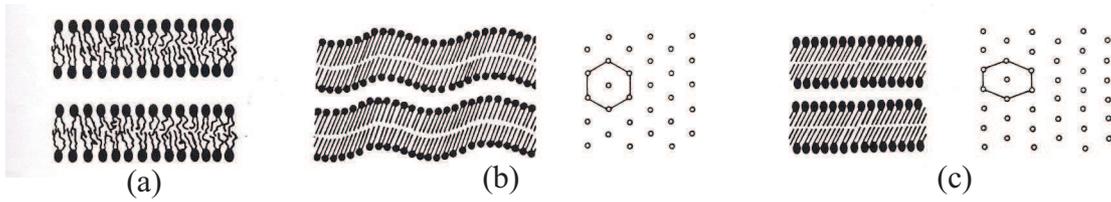


Figure 12. Description des différentes phases lamellaires recensées. Dans la phase L_α (a), l'ordre des molécules est liquide au sein des bicouches. Pour les phases P_β (b) et L_β (c) les molécules sont organisées selon un ordre quasi-cristallin et sont inclinées par rapport à la normale aux couches.

Dans les régimes très dilués, les lipides en volume dans l'eau sont en équilibre avec des lipides adsorbés à l'interface air-eau sous forme de monocouche. La concentration interfaciale de lipides augmente avec la concentration en lipides du système, et peut ainsi former différentes phases 2D : gaz, liquide expansé, liquide condensé, solide (figure 13).

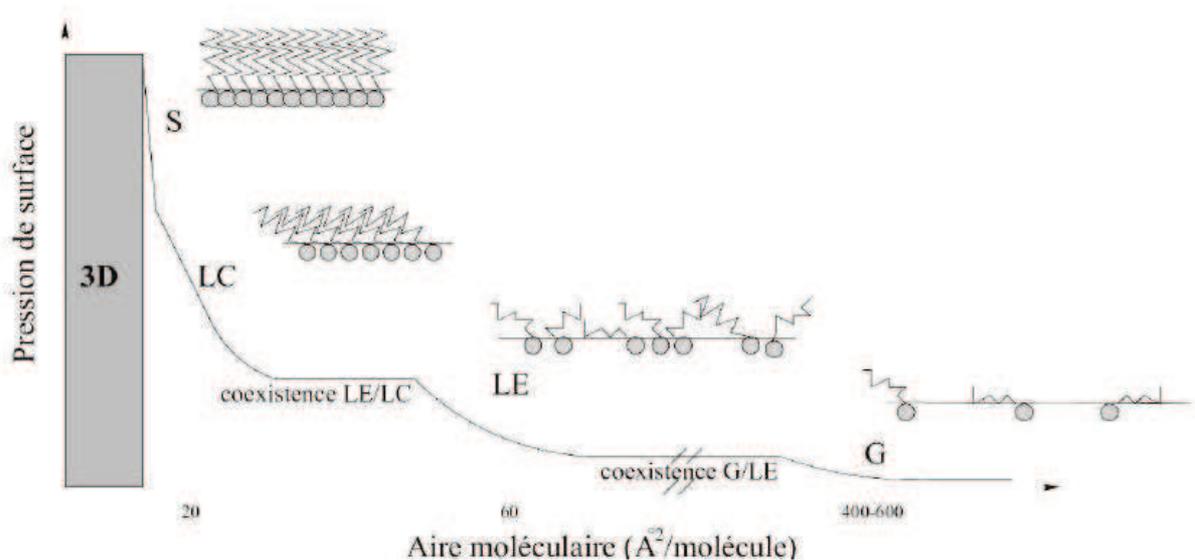


Figure 13 : Isotherme typique d'une molécule amphiphile étalée à la surface de l'eau pure¹¹. Les schémas illustrent les configurations des molécules dans chacune des phases (G : gaz, LE : liquide expansé, LC : liquide condensé, S : solide).

Pour des concentrations en volume supérieures à la concentration micellaire critique (cmc), les lipides s'auto associent dans l'eau sous forme de micelles et la concentration interfaciale n'évolue plus.

c) Composition des membranes modèles

Les lipides et tensio-actifs utilisés dans ce travail pour former des membranes modèles sont les suivants :

(1) C12E5/Hexanol

Dans un premier temps un système de tensio-actifs synthétiques est utilisé pour étudier les gliadines dans des phases lamellaires. Il est composé d'un mélange de pentaethylene glycol monododecyl ether (C₁₂E₅) (Nikkol Chemical) et d'hexanol (C₆E₀) hydraté dans l'eau. Ce système, longuement étudié au laboratoire¹², présente l'avantage de former des phases lamellaires qui possèdent une large gamme de dilution, permettant d'atteindre des épaisseurs de couches aqueuses allant de 1 à 100 nm. Le rapport massique hexanol/C₁₂E₅ utilisé est 0.29. Il s'agit d'un système neutre.

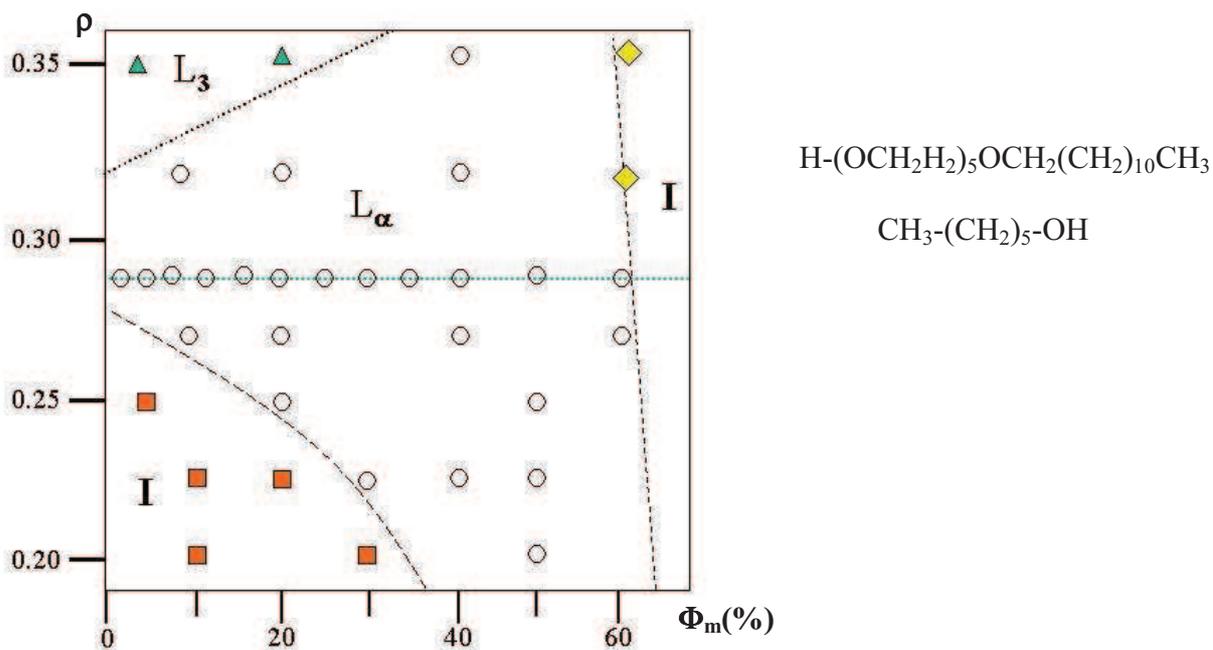


Figure 14 : Diagramme de phases du système C₁₂E₅/Hexanol/H₂O en fonction du rapport $\rho = \text{Hexanol}/\text{C}_{12}\text{E}_5$ pour une température de 22°C¹³. Les différentes phases identifiées sont : phase éponge L_3 (▲) ; diphasique micelles + phase lamellaire L_α (■) ; phase lamellaire L_α (○) ; isotrope (◆). A droite, représentation des molécules de C12E5 et hexanol.

(2) DHPE

Pour évaluer le coefficient de diffusion d'un lipide insérée dans une membrane de C₁₂E₅/Hexanol par FRAP du 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE) marqué à la fluorescéine a été utilisé. Ce lipide marqué est couramment utilisé comme marqueur fluorescent de membranes¹⁴.

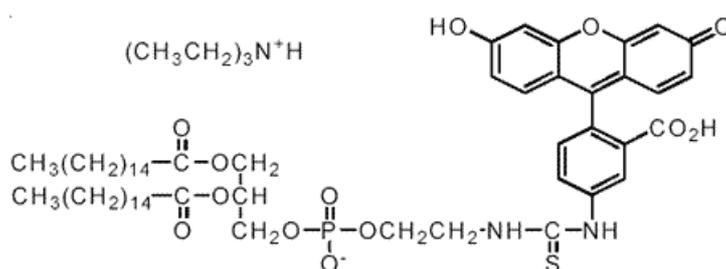


Figure 15 : Représentation de la molécule de DHPE marquée par de la fluorescéine.

(3) DMPC

Dans un premier temps, les monocouches de lipides sont réalisées avec du 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC) (Bachem). Ce phospholipide zwitterionique est un constituant majeur des membranes biologiques. Il représente 18.9 % des lipides des membranes plasmiques du maïs par exemple¹⁵. Ce phospholipide est utilisé pur dans la monocouche de façon à simplifier l'analyse des résultats, notamment en spectroscopie infrarouge.

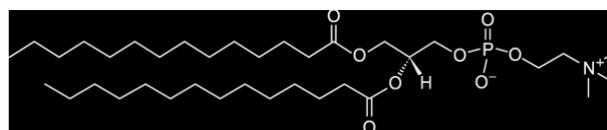
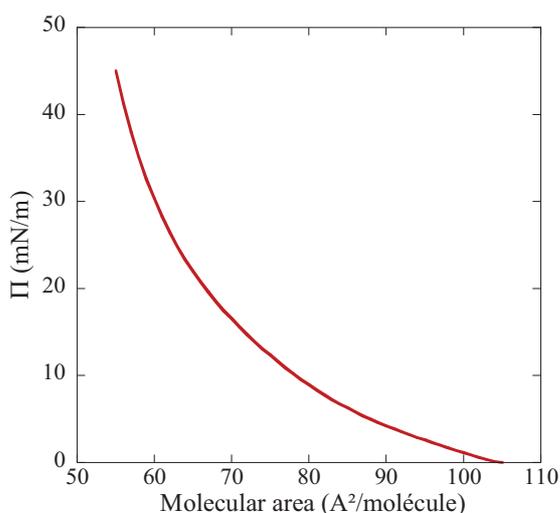


Figure 16 : Diagramme de phase 2D du DMPC à l'interface air-eau à température ambiante.
A droite, représentation de la molécule de DMPC

Son isotherme de compression à l'interface 2D (figure 16) présente une phase gaz et une phase liquide unique. De même que les membranes biologiques, les monocouches de DMPC ne présentent pas de transition de phase : liquide expansé - liquide condensé.

(4) DMPG

La plupart des membranes biologiques sont globalement chargées négativement. De façon à tester l'effet de cette charge, des monocouches de 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-[Phosphorac-(1-glycerol)] (DMPG) (Avanti Polar Lipids) sont utilisées. Le diagramme de phases 2D

du DMPG (figure 17) présente une transition de phase liquide expansé – liquide condensé à une pression de 15 mN/m à température ambiante.

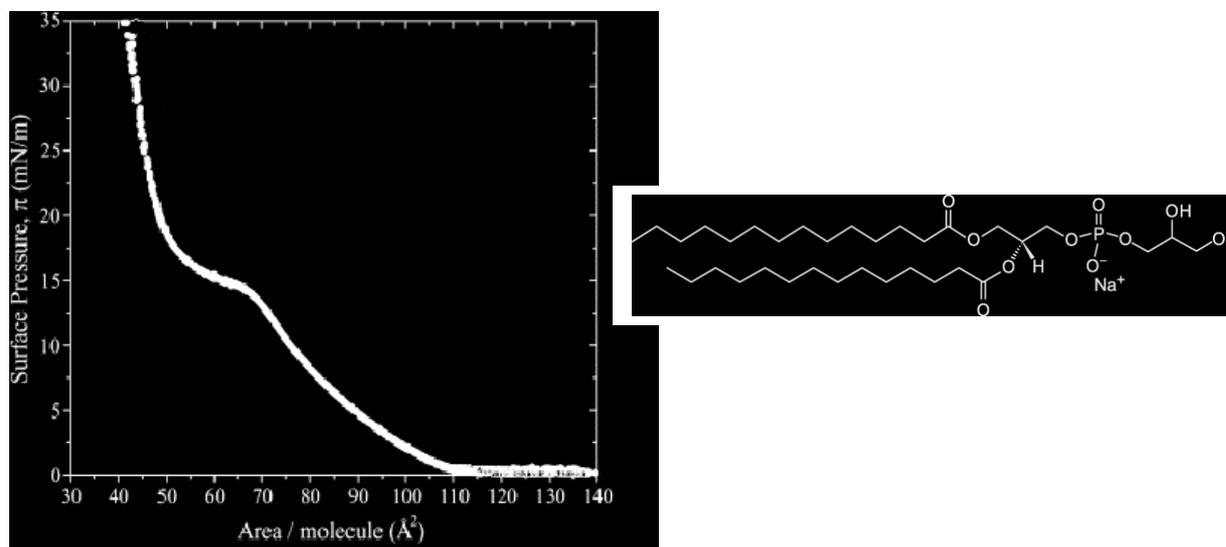


Figure 17 : Diagramme de phase 2D du DMPG à l'interface air-eau à température ambiante¹⁶. A droite, représentation de la molécule de DMPG

B. Méthodes

1. Etude des solutions

a) Spectroscopie UV-Visible

Dans le cadre de cette thèse, la spectroscopie UV-Visible est utilisée pour mesurer des concentrations et évaluer des états d'association. Cette technique¹⁷ mesure l'atténuation de l'absorption d'un rayonnement de longueur d'onde variable, λ , par une solution. L'absorbance (ou densité optique) mesurée est définie de la façon suivante :

$$A = -\log(I/I_0) \quad \text{Equation 1}$$

Avec A l'absorbance ou densité optique, I_0 l'intensité du rayon incident et I celle du rayon émergent. De façon générale, les mesures réalisées sont des différences entre absorbances de solutions et celles de leur solvant pour extraire l'absorbance du soluté.

Dans la gamme de longueur d'onde où le soluté n'absorbe pas, on peut mesurer une densité optique non nulle liée à la turbidité de l'échantillon. Celle-ci est liée à la présence d'objets dans l'échantillon qui diffusent la lumière incidente. Leur taille est de l'ordre de grandeur des longueurs d'onde du visible. Dans le cas des gliadines, la turbidité τ à la longueur d'onde λ est évaluée par une régression linéaire de la densité optique mesurée entre 350 et 450 nm :

$$\tau = a \cdot \lambda + b \quad \text{Equation 2}$$

Pour mesurer la concentration des gliadines en solution, on utilise le pic d'adsorption à 280 nm lié à la présence d'acides aminés chromophores tels que la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane dans la protéine. La valeur de densité optique à cette longueur d'onde, corrigée de la contribution de la turbidité, permet de mesurer la concentration de protéines dans la solution grâce à la loi de Beer-Lambert :

$$A_c = A_m - \tau = \epsilon \cdot l \cdot C \quad \text{Equation 3}$$

Avec A_c l'absorbance corrigée à 280 nm, A_m l'absorbance mesurée, τ la turbidité à 280 nm, ϵ le coefficient d'extinction de la protéine étudiée, l l'épaisseur de la cuve et C la concentration de protéine dans la solution.

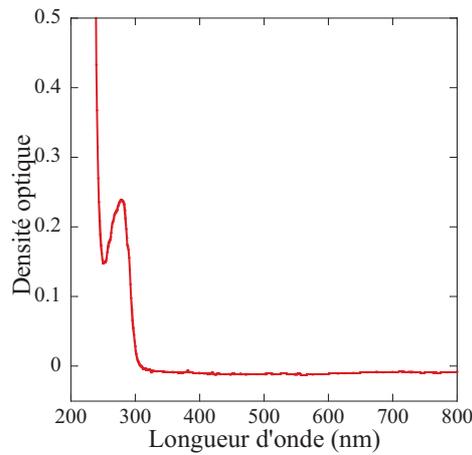


Figure 18 : Spectre UV corrigé de la γ -gliadine dans eau-éthanol

Les coefficients d'extinction de la γ -gliadine et de la ω -gliadine ont été mesurés en solution eau-éthanol et valent respectivement 0.5 et $0.3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ (figure 19) :

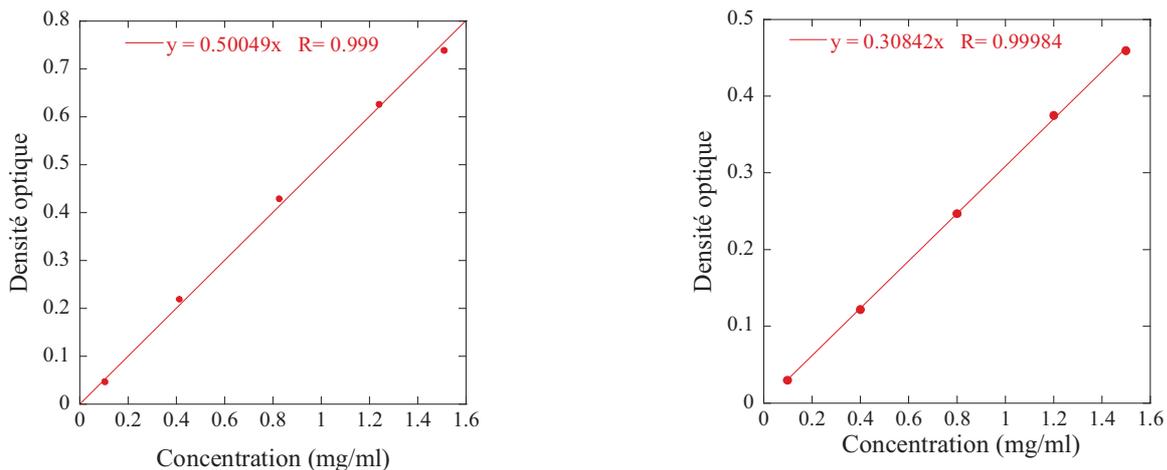


Figure 19 : Courbes de calibration des coefficients d'extinction de la γ -gliadine (à gauche) et de la ω -gliadine (à droite) : $\epsilon_{\gamma\text{-gliadine}} = 0.5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$ et $\epsilon_{\omega\text{-gliadine}} = 0.31 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}$

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre UV-Visible Unicam UV4, et les échantillons sont analysés dans des cuves en quartz de longueur de trajet optique 1 cm, ayant un volume réduit.

b) Spectroscopie infrarouge – Dichroïsme Circulaire Vibrationalnel (VCD)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode réflexion totale atténuée (ATR) est utilisée dans ce travail, pour obtenir des informations concernant la structure secondaire des gliadines sous forme de poudre ou en solution. Une description du principe de spectroscopie FTIR peut être trouvée dans la littérature¹⁷. Le mode ATR permet d'obtenir des spectres de matériaux fortement absorbants, ne pouvant être facilement obtenus en transmission. Son principe est le suivant : une onde infrarouge pénètre un cristal d'indice de réfraction élevé (supérieur à celui de l'échantillon) et transparent dans l'infrarouge. Pour un angle d'incidence supérieur à l'angle critique, l'onde est totalement réfléchi sur la surface en contact avec l'air. Cependant, du côté air de l'interface, il existe une onde évanescente, dont le champ électrique peut interagir avec les modes d'absorptions d'un échantillon placé contre le cristal. Cette onde est localisée et ne pénètre dans l'échantillon que sur une épaisseur de l'ordre du micron. Lorsqu'on s'approche d'une longueur d'onde d'absorption de l'échantillon, une partie de l'énergie est absorbée ce qui induit une atténuation du rayonnement réfléchi. Ainsi l'intensité du rayonnement réfléchi varie avec la longueur d'onde, comme pour un spectre d'absorption et les spectres sont représentés en $-\log_{10}(R/R_0)$.

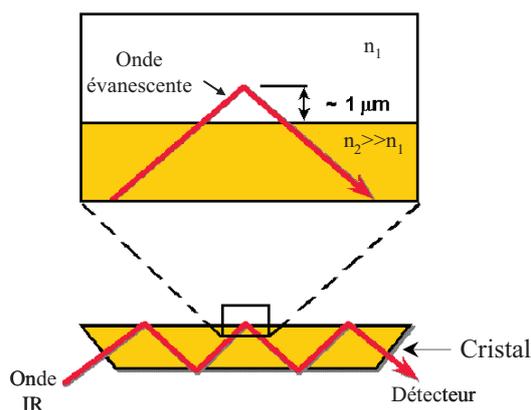


Figure 20 : Schéma de fonctionnement du module ATR

L'appareillage utilisé est un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Nicolet Magma 550) équipé d'un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide et d'un cristal ATR de germanium.

Des notions fondamentales sur la structuration des protéines et les bandes d'absorption infrarouge des protéines seront nécessaires pour l'interprétation des spectres. Ces notions sont décrites en annexe A et B.

La spectroscopie infrarouge ne permettant pas une résolution parfaite des structures secondaires, des expériences ont également été réalisées en dichroïsme circulaire vibrationnel¹⁸ (VCD). Son principe¹⁹ repose sur l'absorption d'une onde infrarouge polarisée circulairement droite ou gauche. Le signal VCD est défini comme la différence d'absorbance, d'un échantillon composé de molécules chirales, entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite :

$$S_{VCD} = A_g - A_d$$

Dans le cas des protéines, qui sont des molécules chirales, les spectres de VCD montrent des formes de bandes amide I caractéristiques des structures secondaires, mieux résolues qu'en spectroscopie infrarouge puisque les bandes peuvent être positives ou négatives (figure 21).

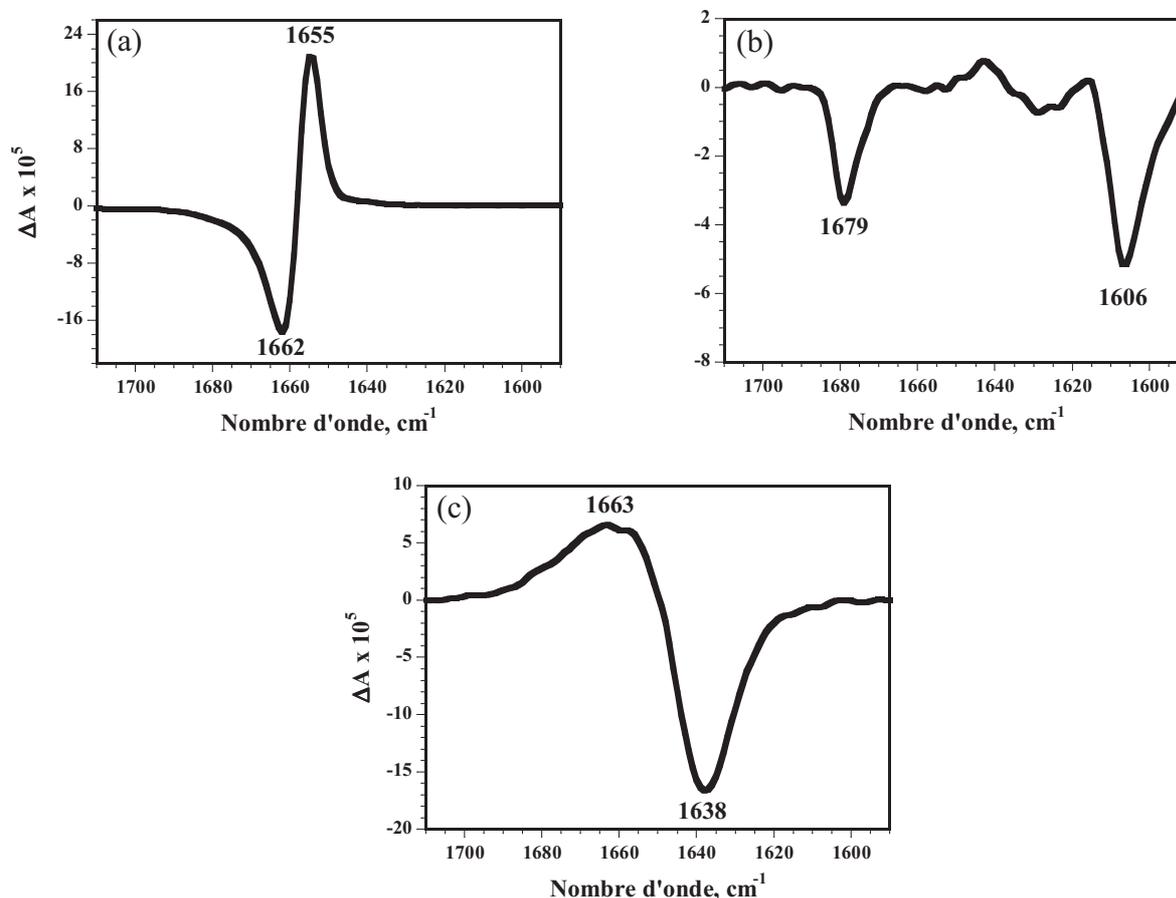


Figure 21 : Spectres VCD caractéristiques d'hélices α (a), de feuilletts β (b) et d'hélices de type PPII (c). Ces spectres sont ceux de polypeptides : (a) polybenzylglutamate (b) polylysine à pH basique (c) poly-L-proline.

Ces expériences de spectroscopie ont été réalisées au LPCM (Université Bordeaux 1) en collaboration avec Bernard Desbat et Thierry Buffeteau.

c) Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman confocale est utilisée dans ce travail pour étudier les modes vibrationnels des protéines, dans des contextes où il est important de cibler des zones d'échantillon. La spectroscopie Raman est basée sur la diffusion inélastique des photons, qui ont interagit avec les nuages électroniques des molécules²⁰.

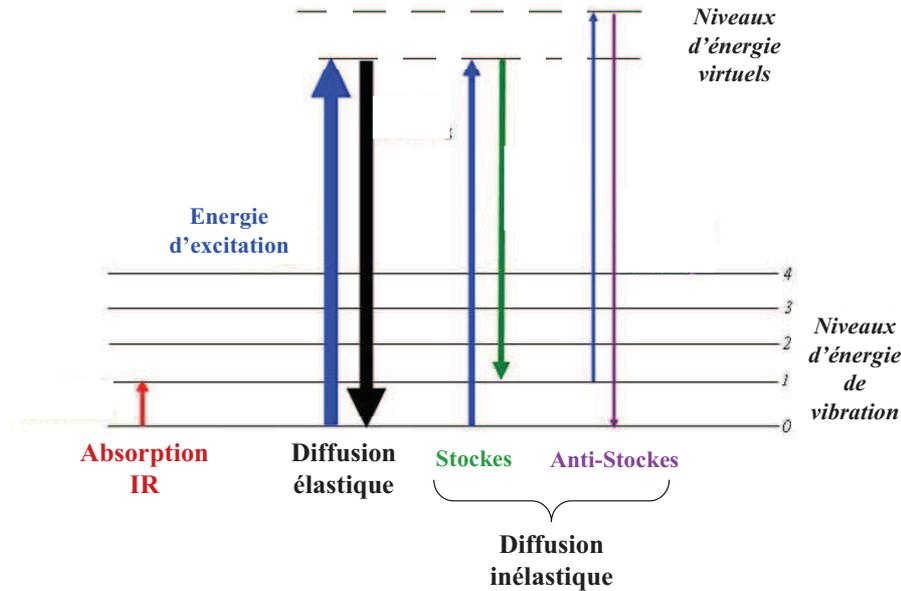


Figure 22 : Représentation schématique de l'absorption infrarouge, de la diffusion élastique et de la diffusion inélastique.

Tout comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie Raman permet de sonder les modes vibrationnels des molécules. Cependant les règles de sélection pour ces deux spectroscopies sont différentes : le faisceau infrarouge est absorbé lorsqu'il y a un changement de moment dipolaire permanent, alors que l'effet Raman est causé par une oscillation du moment dipolaire induit. Ainsi l'intensité des bandes est différente selon les spectroscopies et certains modes vibrationnel ne sont observés que dans l'une des spectroscopies. L'étude des modes vibrationnels des protéines en Raman, permet de donner des informations sur les structures secondaires des protéines grâce aux bandes amides, et des informations sur les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine) qui présentent des raies intenses. L'appareil utilisé est un spectromètre LabRAM HR 800 de Jobin Yvon HORIBA, utilisé avec un objectif 10x.

d) Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La technique de diffusion dynamique de la lumière est utilisée pour mesurer le rayon hydrodynamique d'objets en solution, de taille comprise entre quelques nanomètres et quelques microns²¹. La diffusion dynamique de la lumière mesure une fluctuation d'intensité diffusée en fonction du temps. Les variations d'intensité diffusée correspondent à des fluctuations de fréquence liées à celles de la concentration et de la densité qui sont de type gaussienne. Ainsi peut être introduite une fonction d'auto-corrélation $g_1(t)$, image de cette diffusion Brownienne de l'intensité diffusée (I) par les objets en solution :

$$\langle I(q,0)I(q,t) \rangle = I^2(q,t) + a.g_1^2(q,t) \quad \text{Equation 4}$$

Pour n populations monodisperses d'objets sphériques, il existe le modèle suivant :

$$g_1(q,t)=b_1.\exp(-t/\tau_1)+ b_2.\exp(-t/\tau_2)+\dots+ b_n.\exp(-t/\tau_n) \quad \text{Equation 5}$$

avec

$$\sum_{i=0}^n b_i = 1$$

et τ_i , les temps de relaxation :

$$\tau_i = \frac{1}{D_i \cdot q^2} \quad \text{Equation 6}$$

D_i les coefficients de diffusion translationnels des objets et q le vecteur de diffusion défini par l'expression suivante:

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot n}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad \text{Equation 7}$$

Avec n l'indice de réfraction du milieu, λ la longueur d'onde du rayonnement incident et θ l'angle de diffusion.

Le rayon hydrodynamique d'objets sphériques en solution est relié au coefficient de diffusion translationnel par la relation de Stockes-Einstein :

$$R_H = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad \text{Equation 8}$$

Avec k , la constante de Boltzmann ($1,3806503 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T la température et η la viscosité du milieu ($\eta_{\text{eau}} = 10^{-3} \text{ PI}$ à $20 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pour une sphère, le rayon hydrodynamique est relié au rayon de giration par la relation suivante :

$$R_g^2 = \frac{3}{5} \cdot R_H^2 \quad \text{Equation 9}$$

Ainsi, en ajustant la courbe expérimentale d'auto-corrélation d'une solution d'objets sphériques par l'équation 8, il est possible de déterminer les coefficients de diffusion des objets, et de calculer les rayons hydrodynamiques correspondants.

Pour des solutions polydisperses d'objets sphériques un modèle d'exponentielle étirée est utilisé :

$$g_1(q,t)=b.\exp(-t/\tau_e^\alpha) \quad \text{Equation 10}$$

avec τ_e le temps de relaxation moyen et α le coefficient d'étirement traduisant la polydispersité en tailles de l'échantillon ($0 < \alpha < 1$).

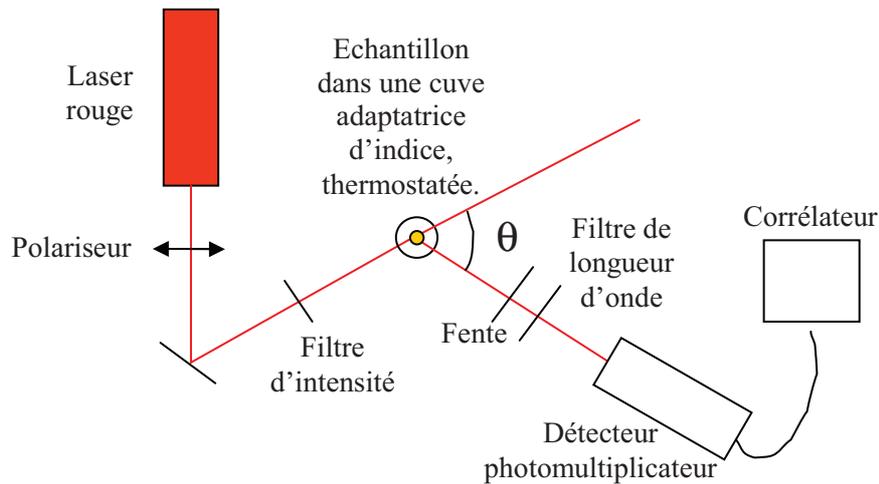


Figure 23 : Schéma du montage de diffusion dynamique de la lumière

Les expériences sont réalisées sur un montage (figure 23), développé au laboratoire, qui utilise un Laser Coherent Innova 90 (Kr-Ion) opérant à $\lambda = 647.1$ nm. Les échantillons sont immergés dans une cuve remplie de décaline isoréfractive avec le verre, thermostatée à l'aide d'un bain Haake. L'angle de diffusion entre le faisceau incident et l'axe du détecteur peut varier entre 20° et 140° . Le détecteur est un photomultiplicateur Philips monté sur un goniomètre, et le corrélateur, qui calcule la fonction d'auto-corrélation temporelle à partir du nombre de photons diffusés arrivant sur le détecteur, est digital de marque Brookhaven BI-9000 A.

e) Microscopie à Force Atomique

Afin de visualiser les modes d'assemblage des protéines de réserve à l'échelle moléculaire, des expériences de microscopie à force atomique (AFM) sont réalisées. L'AFM^{22,23} est une microscopie à balayage qui utilise les forces d'interaction entre une pointe très fine et une surface pour caractériser la surface d'un échantillon. Le schéma de principe est présenté dans la figure 24. Une pointe positionnée au bout d'un microlevier (cantilever) est déplacée sur la surface de l'échantillon. La mesure de la déflexion du microlevier, s'effectue par la lecture d'un faisceau laser réfléchi sur ce dernier, et la position de la tâche laser est déterminée grâce à une photodiode segmentée, qui donne accès aux angles de déflexion et de torsion de l'extrémité du cantilever. En fonction de ce signal, le déplacement de l'échantillon par rapport à la pointe est commandé par une boucle de rétro-contrôle et un moniteur. Dans notre montage, l'échantillon est déplacé par rapport à la pointe (en x,y,z) grâce à un tube piézo-électrique. Deux modes de fonctionnement de l'AFM sont utilisés dans notre étude : les modes dits "contact" et "tapping". Pour le mode "contact", la sonde est mise en contact avec l'échantillon alors qu'en mode "tapping" la pointe est mise en vibration au voisinage de la surface à sonder grâce à un autre élément piézo-électrique. La figure 25 présente ces deux modes sur la courbe de Lennard-Jones qui présente les forces d'interaction entre deux objets en fonction de la distance. En mode "contact", les expériences sont réalisées au voisinage du mur répulsif de potentiel, alors qu'en mode "tapping" une oscillation de la pointe est imposée pour que cette dernière vienne rencontrer le mur répulsif.

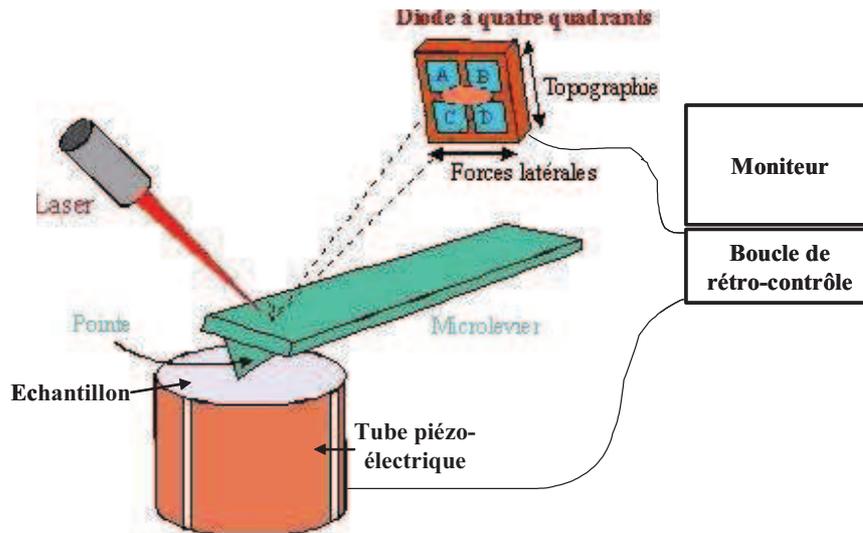


Figure 24 : Schéma de principe du microscope à force atomique

De façon générale, le mode "tapping" a été utilisé pour éviter de détériorer nos échantillons "mous", avec le passage de la pointe. En milieu aqueux nous avons utilisé le mode contact. En mode contact, deux types d'images sont présentées, les images dites de "hauteur" et de "déflexion". Comme le nom l'indique l'image de "hauteur" donne une information sur la topographie des objets observée. Cette mesure est réalisée grâce au déplacement du tube piézo-électrique (en z) lors du balayage, alors que les images de "déflexion" indiquent la déflexion de la pointe. Ce deuxième type d'image donne des informations sur les forces exercées entre pointe et échantillon.

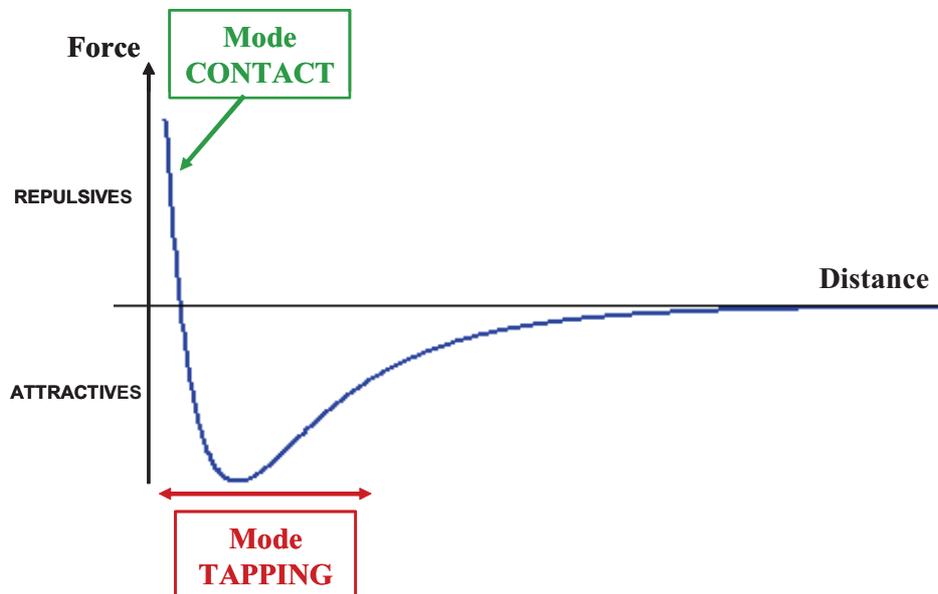


Figure 25 : Deux modes de fonctionnement de l'AFM (contact et tapping) repérés sur la courbe de force d'interaction en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon (Lennard-Jones).

Le dispositif utilisé est un microscope à champ proche Nanoscope IIIa de Digital Instrument et les pointes sont en silicium.

2. Etudes à l'interface air-eau

L'ensemble des études à l'interface air-eau a été réalisé en collaboration avec Bernard Desbat (Université Bordeaux I - CBMN).

a) Balance de Langmuir et tensiométrie

Les études à l'interface air-eau sont réalisées dans des cuves de Langmuir en téflon équipées d'une barrière mobile pilotée par un logiciel.

La pression de surface est mesurée grâce à une balance de Wilhelmy. Le principe repose sur la mesure de la force qui s'applique sur un morceau de papier suspendu à une tige reliée à un tensiomètre, et plongeant dans la sous phase au niveau de l'interface (figure 26).

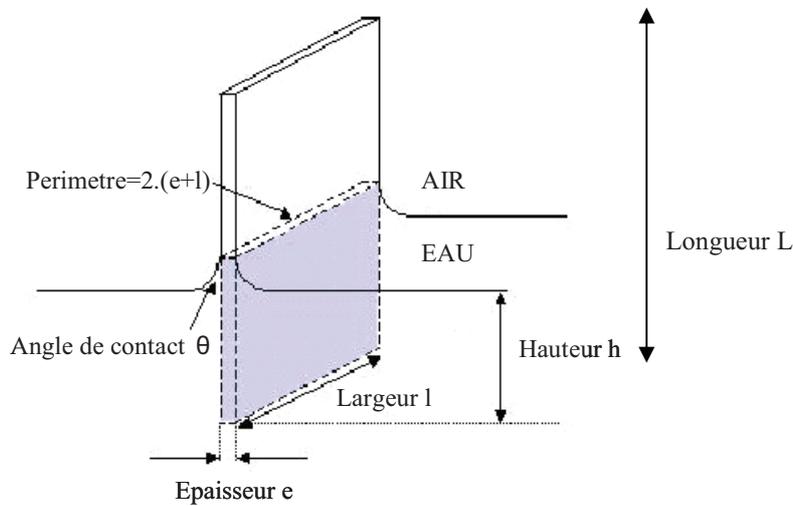


Figure 26 : Représentation schématique d'une lame de Wilhelmy

La résultante de forces s'exerçant sur le morceau de papier peut s'écrire :

$$F=P+P_A+f \quad \text{Equation 11}$$

Avec P le poids du papier, P_A la poussée d'Archimède et f la force interfaciale qui résulte du mouillage. La projection sur l'axe z de l'équation 14 donne pour une interface d'eau :

$$F=-\rho_p.L.l.e.g + \rho_e.h.l.e.g-2.(e+l).\gamma_e.\cos\theta \quad \text{Equation 12}$$

Avec ρ_p la densité du papier, ρ_e la densité de l'eau, γ_e la tension superficielle de l'eau et θ l'angle de mouillage. Le papier étant saturé en eau, l'angle de mouillage est considéré nul. Ainsi :

$$\gamma=(-F-\rho_p.L.l.e.g + \rho_e.h.l.e.g)/(2.(e+l)) \quad \text{Equation 13}$$

La pression de surface Π est définie par :

$$\Pi=\gamma_e-\gamma_f \quad \text{Equation 14}$$

Avec γ_f la tension de surface en présence d'un film à l'interface. La pression de surface est donc directement reliée à la différence entre la force qui s'exerce sur le morceau de papier en présence et en absence de film à l'interface :

$$\Pi = \frac{F_f - F_e}{2.(e+l)} \quad \text{Equation 15}$$

b) Microscopie à angle de Brewster (BAM)

Pour observer la texture de l'interface eau-air, nous utilisons un microscope à angle de Brewster [11], technique sensible à la variation d'indice et d'épaisseur de l'interface. Le principe est le suivant (figure 27) :

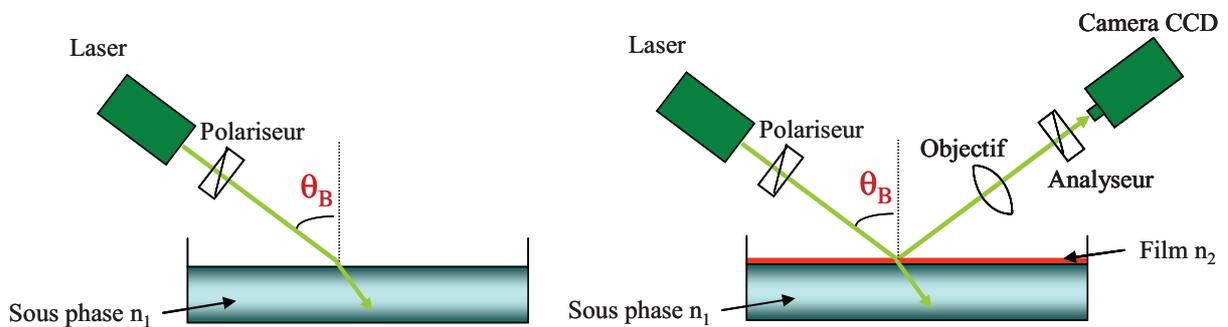
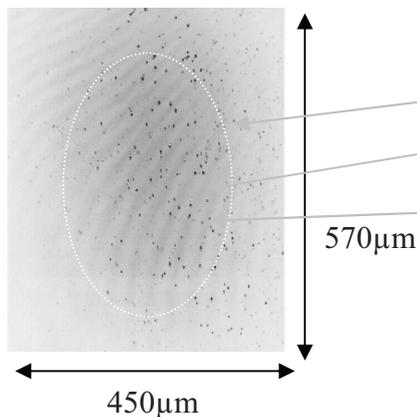


Figure 27 : Schéma du montage de microscopie à angle de Brewster

Un rayonnement laser polarisé p (parallèle au plan d'incidence) est projeté sur l'interface eau-air, à l'angle de Brewster de l'eau (~ 53°), de façon à ce que le rayon incident ne soit pas réfléchi sur une surface d'eau. Ainsi, en présence d'espèces à l'interface, ayant un indice de réfraction différent de l'eau, une partie du rayonnement est réfléchi. Ce signal est ensuite grossi par un objectif x10, puis récupéré par une camera CCD. Ceci permet d'obtenir des images à plusieurs niveaux de gris, le niveau de gris étant fonction de l'épaisseur du film, des indices de réfraction du système, de la longueur d'onde du laser, et du temps d'obturation de la camera.



A noter :

- Halo blanc : Vignettage lié à l'intensité du laser.
- Bandes en diagonale : Artefact lié au matériel.
- Points blancs : Agrégats d'épaisseur plus importante que le fond continu car plus lumineux.
- L'image en "direct" n'est focalisée que sur une ligne à cause de l'inclinaison du laser. Pour la prise de photo, une image est reconstituée à partir de plusieurs images à différentes mises au point.

Figure 28 : Exemple de cliché de microscopie Brewster- objectif X10

Pour des surfaces homogènes, il est possible de remonter à l'épaisseur de la couche interfaciale à partir de modèles prenant en compte les indices de réfraction des différentes espèces²⁴. L'expression approchée de la réflectance pour un film monocouche de faible épaisseur est la suivante²⁵ :

$$R = \frac{I_R}{I_0} = \left(\pi \frac{d}{\lambda}\right)^2 \frac{(n_1^2 - n_2^2 - 1 + \frac{n_2^2}{n_1^2})^2}{1 + n_2^2} \quad \text{Equation 16}$$

où I_0 et I_R sont les intensités incidentes et réfléchies, $n_{1,2}$ les indices de réfractons du film (1) et de la sous-phase (2), λ la longueur d'onde du faisceau incident et d l'épaisseur du film.

Expérimentalement, pour un temps d'obturation de la caméra donné, la réflectance R est reliée aux niveaux de gris, par une fonction linéaire, qui est déterminée par une procédure de calibration disponible dans le logiciel du microscope. Cette fonction est établie par un ajustement de la courbe expérimentale des niveaux de gris en fonction de l'angle d'incidence du rayonnement sur une surface d'eau, par la courbe de Fresnel²⁶ qui peut être assimilée à une parabole autour de l'angle de Brewster.

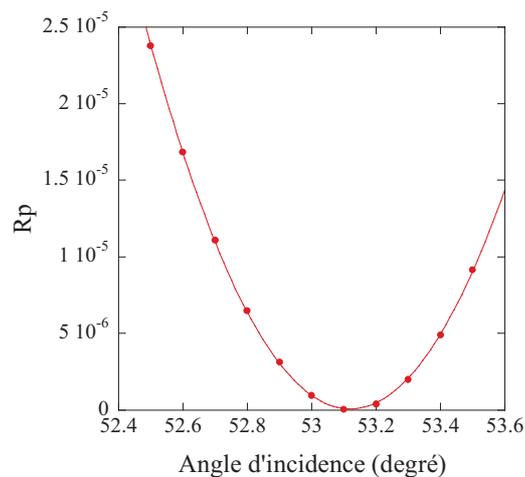


Figure 29 : Parabole correspondant au minimum de la courbe de Fresnel, pour une polarisation p , autour de l'angle de Brewster.

Pour nos expériences nous utilisons le microscope à angle de Brewster de marque BAM2 plus (NFT, Göttingen, Germany), équipé d'un laser à double fréquence Nd :YAG de longueur d'onde 532 nm et d'une caméra CCD avec un objectif de grossissement x10.

c) Polarization Modulation IR Reflection Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS)

La spectroscopie PM-IRRAS est utilisée pour réaliser des mesures de spectroscopie infrarouge sur des monocouches à l'interface air-eau. Cette technique a été mise au point au Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire de l'Université Bordeaux 1 dans les années 90^{27,28}. Elle combine trois techniques (figure 30)²⁹ :

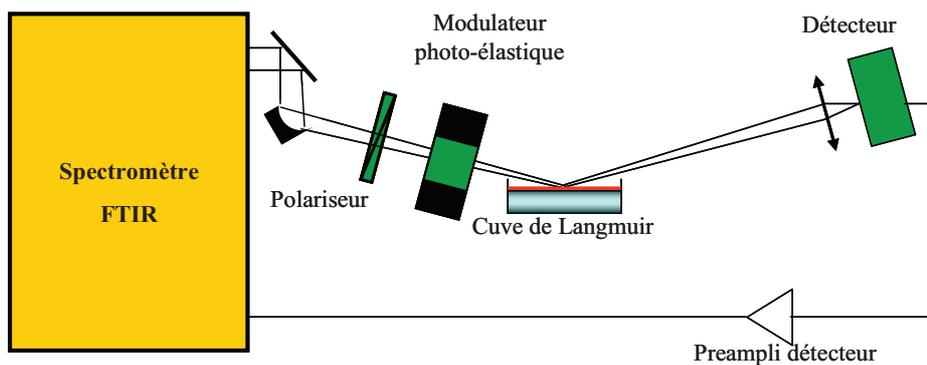
-La spectroscopie IRRAS.

-Un modulateur photoélastique pour moduler rapidement la polarisation du champ électrique incident.

-Un traitement électronique qui permet de filtrer, démoduler et traiter mathématiquement le signal reçu par le détecteur. On obtient ainsi le signal de réflectivité différentielle normalisée :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} J_2 \quad \text{Equation 17}$$

avec R la réflectivité, J_2 la fonction de Bessel, p la polarisation parallèle au plan d'incidence, et s la polarisation perpendiculaire au plan d'incidence. Avec la normalisation en temps réel du signal de surface, la spectroscopie PM-IRRAS s'affranchit des fluctuations temporelles du montage optique et de l'échantillon. Elle permet une analyse *in situ*, le montage étant disposé à l'air libre.



$I \propto (\text{Orientation du moment de transition}) \times (\text{densité moléculaire})$

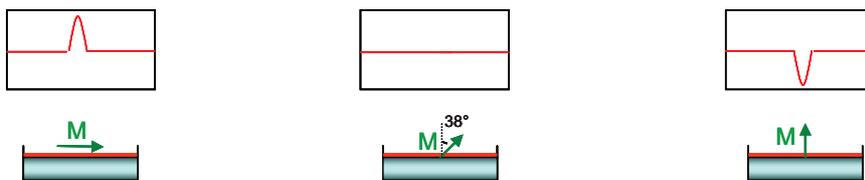


Figure 30 : Représentation schématique du montage de spectroscopie PM-IRRAS et des règles de sélection

De surcroît, le signal PM-IRRAS est soumis à des règles de sélection qui permettent de remonter à l'orientation des moments de transition par rapport à l'interface (figure 30). En résumé :

- Un moment de transition de groupement moléculaire orienté parallèlement à l'interface donne une bande d'absorption positive.

- Un moment de transition orienté perpendiculairement au plan de l'interface donne une bande d'absorption négative.

Pour une orientation de 40° environ, il y a extinction de la bande d'absorption. Ainsi, l'intensité des bandes d'absorbance est proportionnelle à la concentration de surface et à l'orientation des moments de transition. La technique de PM-IRRAS permet donc d'obtenir des informations qualitatives, quantitatives et d'orientation des espèces à l'interface. Dans notre étude nous nous sommes particulièrement intéressés aux bandes amides des protéines, donnant accès à la nature et à l'orientation des structures secondaires des protéines.

Expérimentalement, pour supprimer la contribution de la sous-phase et la dépendance de la fonction de Bessel, les spectres des films interfaciaux sont divisés par ceux de la sous-phase. De plus, la contribution de la vapeur d'eau est supprimée par soustraction du spectre de la vapeur d'eau. Le montage³⁰ utilisé est composé d'un spectromètre à transformée de Fourier ThermoOptek, Nexus 870, d'un modulateur photoélastique à cristal de ZnSe et d'un détecteur de type MCT associé à un préamplificateur.

3. Etude des phases lamellaires

a) Microscopie de fluorescence - lumière polarisée – confocale.

Plusieurs techniques de microscopies optiques sont utilisées pour étudier les systèmes de phases lamellaires : la microscopie en lumière polarisée et la microscopie de fluorescence.

La microscopie optique en lumière polarisée permet d'observer les systèmes biréfringents. La biréfringence est la propriété qu'ont certains matériaux à dédoubler un rayonnement polarisé incident en deux rayons de polarisations différentes qui se propagent avec une vitesse différente. On peut définir ce phénomène comme une rotation de la polarisation. En plaçant un polariseur à la sortie de l'échantillon (analyseur) orienté perpendiculairement au polariseur, on observe la conséquence des interférences entre les deux rayons, on parle alors de texture. Une phase lamellaire est biréfringente et uniaxe. Le faisceau lumineux incident est séparé en deux composantes : l'une dans la direction parallèle aux bicouches et l'autre dans la direction de l'empilement. Deux orientations extrêmes des bicouches par rapport à l'axe optique peuvent être distinguées : l'orientation homéotrope pour laquelle le directeur (vecteur normal aux couches noté n) est parallèle à l'axe optique, et l'orientation planaire pour laquelle le directeur est perpendiculaire à l'axe optique. En géométrie homéotrope, la texture est noire et homogène car le faisceau transmis garde la même polarisation que le faisceau incident. En géométrie planaire, le faisceau transmis est la résultante de deux composantes polarisées perpendiculairement. L'intensité maximale est obtenue lorsque le directeur de la phase lamellaire est orienté à 45° par rapport aux axes du polariseur et de l'analyseur. Ainsi la texture de l'orientation planaire est caractérisée par une modification de l'intensité lumineuse observée lorsque la platine porte échantillon est mise en rotation, à analyseur et polariseurs croisés fixés. Pour un échantillon en poudre, la texture observée est composée d'un mélange de textures correspondant aux différentes orientations de la phase.

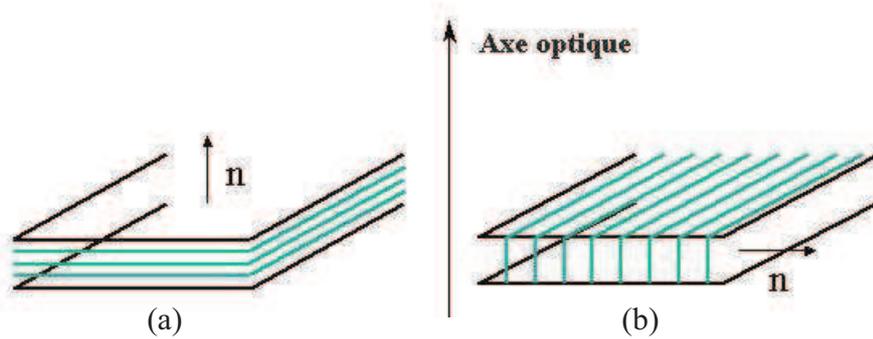
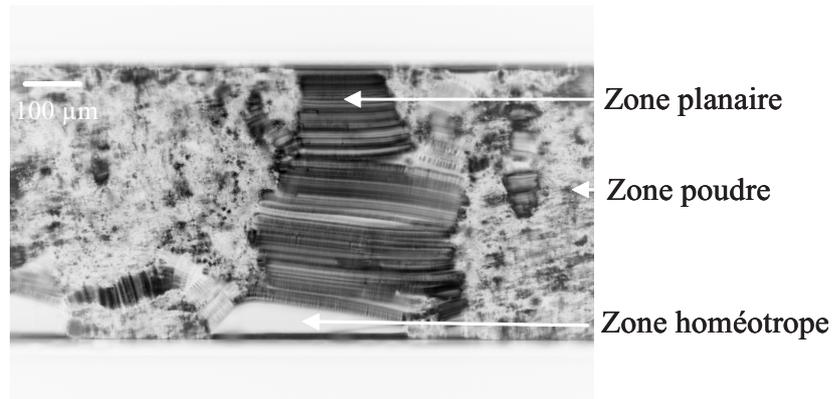


Figure 31 : Observation de texture de phase lamellaire en microscopie en lumière polarisée.
 (a) Orientation homéotrope (b) Orientation planaire

La microscopie de fluorescence est utilisée pour localiser les protéines, préalablement marquées avec un fluorophore, dans la phase lamellaire. Les fluorophores sont des molécules fluorescentes composées d'un ou plusieurs noyaux aromatiques. Ces molécules peuvent absorber un photon en passant dans un état énergétique excité S_1 . Lors du retour au niveau énergétique fondamental S_0 , il y a perte d'énergie sous forme de chaleur pour passer au niveau S_1 , et perte d'énergie sous forme d'émission de photon pour passer du niveau S_1 au niveau fondamental S_0 . Cette perte d'énergie sous forme d'émission de photon est nommée fluorescence.

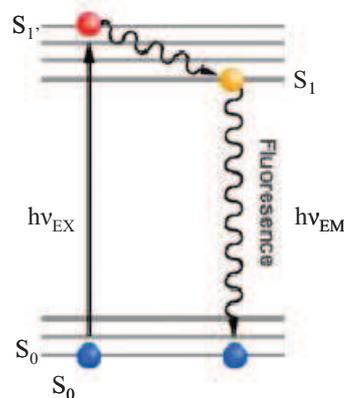


Figure 32 : Représentation schématique du phénomène de fluorescence

En microscopie de fluorescence, l'échantillon est illuminé avec un rayonnement de longueur d'onde correspondant à l'excitation du fluorophore contenu dans l'échantillon. Ainsi, il est possible de localiser les zones où il y a des espèces fluorescentes. Par ailleurs, l'excitation

pour la majorité des fluorophores est fortement dipolaire. Cette propriété conduit à une variation d'intensité mesurée en fonction de l'orientation locale¹³. Ainsi, dans des phases lamellaires dopées avec des fluorophores il est possible d'observer la texture de l'échantillon en fluorescence.

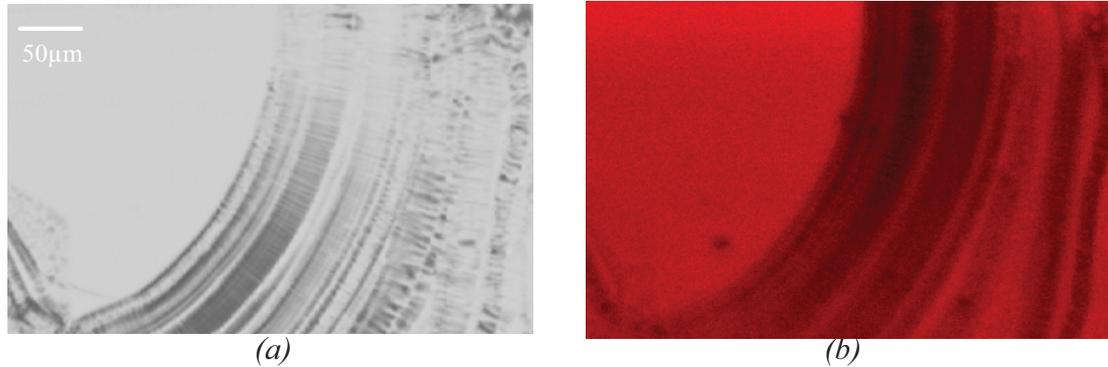


Figure 33 : Observation d'une phase lamellaire dopée par de la TRITC (a) en microscopie en lumière polarisée (b) en microscopie de fluorescence

De façon générale, les observations en microscopie optique ont été réalisées sur un microscope confocal de façon à pouvoir faire en parallèle des mesures de FRAP. La microscopie confocale³¹ permet de visualiser une section de faible épaisseur d'un échantillon.

Son principe général (en réflexion) est présenté dans la figure 34. Une lumière ponctuelle est envoyée sur l'échantillon. Après réflexion sur l'échantillon, le faisceau est focalisé par un trou de taille micrométrique (pinhole), avant d'atteindre le détecteur. Le pinhole permet de s'affranchir des rayons qui ont été réfléchis par des parties de l'échantillon qui sont en dehors du plan focal. On ne mesure donc que le signal provenant d'une tranche d'épaisseur définie par la taille du pinhole.

Pour toutes les expériences de microscopie optique et FRAP, les échantillons de phase lamellaire sont observés dans des capillaires plats "Vitrotubes" d'épaisseur calibrée à 50 μm. Ces capillaires permettent d'observer les échantillons dans l'épaisseur et d'induire un cisaillement de la phase lamellaire lors de son introduction par capillarité. Les forces de cisaillement sont connues pour favoriser l'orientation des phases lamellaires.

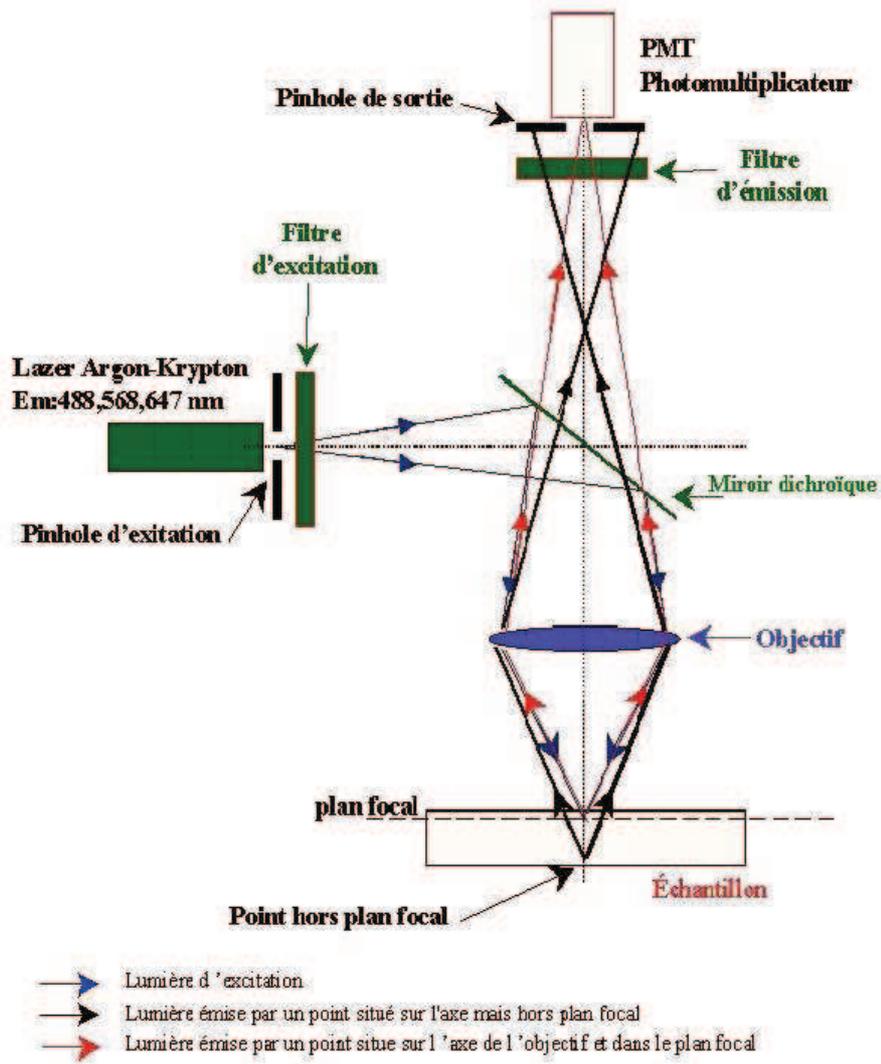


Figure 34 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un microscope confocal³².

b) Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP)

Le FRAP est utilisé pour mesurer le coefficient de diffusion des protéines insérées dans des phases lamellaires. Pour mesurer leur coefficient de diffusion, les protéines doivent être marquées avec une espèce fluorescente. L'expérience consiste à détruire de manière définitive la fluorescence portée par les protéines, dans une zone déterminée, et à suivre, au cours du temps, le retour de la fluorescence par diffusion des particules non photoblanchies des bords de la zone.

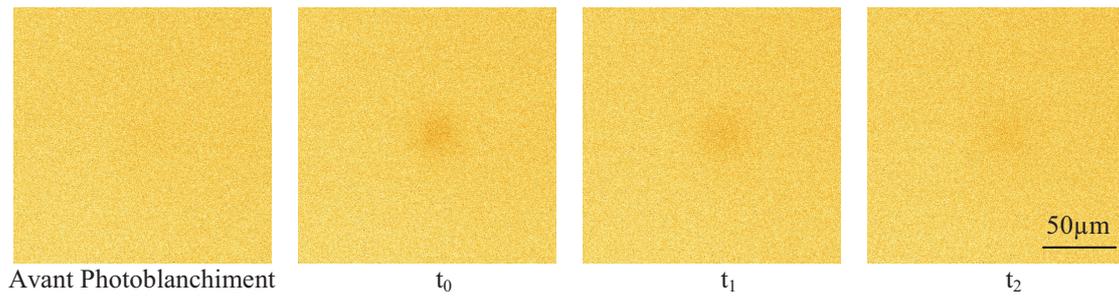


Figure 35 : Illustration de l'expérience de FRAP, clichés de microscopie de fluorescence, avant et après photo blanchiment.

La diffusion des particules non photoblanchies provient du mouvement brownien des molécules. En l'absence d'interaction entre molécules, le coefficient de diffusion mesuré est le coefficient d'autodiffusion.

Les expériences de FRAP sont réalisées sur un microscope confocal. Les observations microscopiques permettent de cibler les expériences de FRAP sur les zones de phase lamellaires orientées, afin de distinguer les coefficients de diffusion parallèles et perpendiculaires à la direction de l'empilement des bicouches. Dans ce travail, de façon générale, les expériences sont réalisées sur des zones homéotropes pour mesurer le coefficient de diffusion dans le plan des bicouches (D_{\perp}).

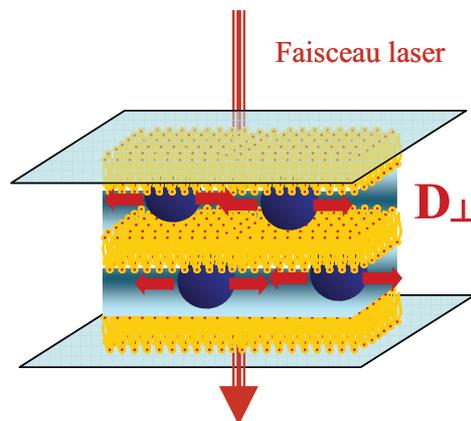


Figure 36 : Représentation d'une expérience de FRAP sur système de phase lamellaire orienté homéotrope qui permet de mesurer D_{\perp} .

Les expériences sont réalisées sur un microscope Leica SP2 avec un objectif à immersion à huile x 63 (ouverture numérique 1.4). Les échantillons sont photoblanchis pendant un temps τ (1 à 10 secondes), sur une zone de rayon $R \approx 2\mu\text{m}$, grâce au laser du microscope confocal à pleine puissance. Une acquisition d'image est réalisée à un temps t après le photoblanchiment. Le traitement de cette image permet de calculer le coefficient de diffusion de l'espèce marquée. Il est réalisé selon les bases suivantes : la largeur de la tâche du laser au temps initial est considérée comme ponctuelle et la perméabilité à travers les bicouches est supposée négligeable. Ainsi, grâce à la loi de Fick dans le plan perpendiculaire à l'axe optique, il est possible de calculer la variation de concentration d'espèces photoblanchies en fonction du temps et de l'espace :

$$c(r, t) = \frac{c_0}{4\pi D_{\perp} t} \exp\left[-\frac{r^2}{4D_{\perp} t}\right] \quad \text{Equation 18}$$

avec r la distance au centre de la zone de photoblanchiment, D_{\perp} le coefficient de diffusion de l'espèce dans le plan des bicouches et c_0 une constante proportionnelle à la concentration d'espèces fluorescentes et à la puissance de photoblanchiment. Cette équation est valide pour un temps de photoblanchiment extrêmement court. Pour un temps de photoblanchiment de durée τ , on peut écrire :

$$I(r, t, \tau) = \int_0^{\tau} \frac{I_0}{t - \tau_1} \exp\left[-\frac{r^2}{4D_{\perp}(t - \tau_1)}\right] d\tau_1 \quad \text{Equation 19}$$

Avec $t > \tau$, et I_0 une constante de normalisation. Cette équation peut également s'écrire :

$$I(r, t, \tau) = I_0 \left(E_1\left[\frac{r^2}{4D_{\perp} t}\right] - E_1\left[\frac{r^2}{4D_{\perp}(t - \tau)}\right] \right) \quad \text{Equation 20}$$

avec E_1 la fonction exponentielle intégrale. Ainsi, en extrayant le profil d'intensité passant par le centre de tâche de photoblanchiment et en l'ajustant numériquement grâce à l'équation 20, il est possible de calculer le coefficient de diffusion perpendiculaire.

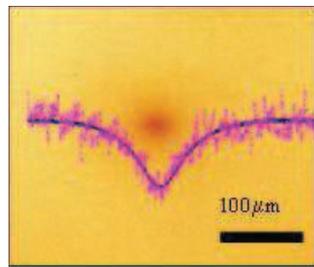


Figure 37 : Traitement de l'image de FRAP après photoblanchiment. En rose profil de fluorescence au niveau de la ligne en pointillés et en bleu l'ajustement par l'équation 20.

Afin d'obtenir une statistique raisonnable les expériences sont reproduites une dizaine de fois.

c) Diffraction des rayons X (DRX)

Dans ce travail de thèse la technique de diffraction des rayons X³³ est utilisée succinctement, pour mesurer la périodicité des phases lamellaires. Les phases lamellaires sont des phases cristal liquide lyotropes, caractérisées par un empilement de couches, d'épaisseurs finies, rectilignes, réfléchissantes et parallèles, répondant aux conditions de Bragg (figure 38).

$$2.d.\sin(\theta) = n.\lambda$$

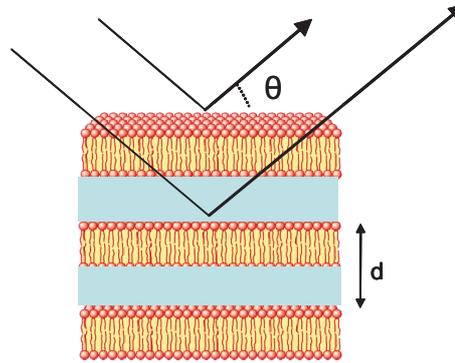


Figure 38 : Relation de Bragg et représentation de la diffraction des rayons X sur une phase lamellaire lyotrope.

La relation de Bragg définit les conditions d'interférences constructives entre deux rayons. Ainsi, en balayant les différents angles à longueur d'onde fixée, des pics de diffractions apparaissent aux conditions de Bragg et permettent de déterminer la périodicité de la phase lamellaire d . Nos échantillons étant sous forme de « poudre », chaque grain de poudre peut être vu comme un petit cristal.

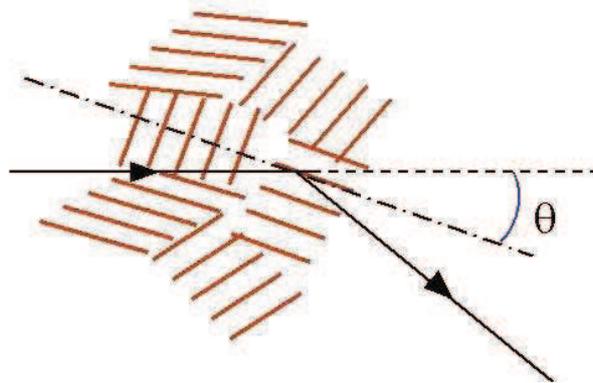


Figure 39 : Représentation schématique de la diffraction des rayons X sur un échantillon de phase lamellaire sous forme de poudre

En considérant que toutes les orientations possibles des grains existent dans l'échantillon, il y a diffraction dans toutes les directions correspondant à un cône d'angle 2θ ayant pour axe l'axe du rayonnement incident. Ainsi, en plaçant un détecteur bidimensionnel perpendiculairement au faisceau incident, on observe des anneaux concentriques, pour des valeurs de q telles que :

$$q_n = (n+1) \cdot \frac{\pi}{d} \quad \text{Equation 21}$$

avec n entier. Les images obtenues sont ensuite traitées par regroupement circulaire pour obtenir un spectre de diffusion $I(q)$. Dans l'étude des phases lamellaires par diffraction des rayons X, nous nous intéressons principalement aux pics de Bragg, constituant le facteur de structure, caractéristique de l'ordre cristallin des phases lamellaires. Cependant

l'intensité diffusée est également modulée par le facteur de forme qui est la figure de diffraction des motifs individuels du réseau.

Le montage utilisé est celui du laboratoire : Les rayons X sont délivrés par un tube RX céramique délivrant un faisceau à la longueur d'onde de cuivre (1.54 Å) de diamètre 400 µm. Le faisceau est ajusté par un monochromateur composé de miroirs de Gobel croisés et par trois collimateurs circulaires (750-400-1000 µm). Et la détection est réalisée par un détecteur bidimensionnel HI STAR muni d'un compteur proportionnel à fil. De façon générale les mesures sont réalisées avec une puissance du générateur de 40 kV et 20 mA.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ Marshak, Kadonaga, Burgess, Knuth, Brennan, Lin, *"Strategies for Protein Purification and Characterization"* **1996**, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ² Constantin, Schnell, *"Spectrométrie de masse, principe et applications"* **1986**, Tec et Doc.
- ³ Kasarda, Mecham, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 445.
- ⁴ Mellman, Fuchs, Helenius, *Annual Review of biochemistry* **1986**, 55, 663-700.
- ⁵ Boulay, Doms, Wilson, Helenius, *The EMBO Journal* **1987**, 6, 2643-2650.
- ⁶ Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell, *"Biologie moléculaire de la cellule"* **1997**, De Boeck Université s.a.
- ⁷ Page web : <http://stlbgb.apinc.org/spip.php?article21>.
- ⁸ Lafrance, Marion, Pézolet, *Biochemistry* **1990**, 29, 4592-4599.
- ⁹ Shank, Su, Brglez, Boss, Dewey, Boston, *Plant Physiology* **2001**, 126, 267-277.
- ¹⁰ Gelbart, *"Micelles, membranes, microemulsions and monolayers"* **1994**, Springer-Verlag New York Inc.
- ¹¹ Dubreuil, *Thèse de l'Université Paris 6*, **2001**.
- ¹² Freyssingéas, *Thèse de l'Université Bordeaux I*, **1994**.
- ¹³ Moreau, *Thèse de l'Université Bordeaux I*, **2004**.
- ¹⁴ Corbett, Cho, Golan, *Biophys. J.* **1994**, 66, 25-30.
- ¹⁵ Bohn, Heinz, Lüthje, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, 387, 35-41.
- ¹⁶ Mageney, Dupres, Bernard, *J. Colloid Interface. Sci.* **2007**, 305, 250-255.
- ¹⁷ Hollas, *"Modern spectroscopy"* **1992**, John Wiley and Sons Ltd.

-
- ¹⁸ Urbanova, Setnicka, Volka, Jun, Weaver, Schulz, Boese, Drwes, " *Fourier Transform Vibrational Circular Dichroism FT-VCD Spectroscopy* ", **2000**, Bruker, Application note, 52.
- ¹⁹ Saccani, *Thèse de l'Université Bordeaux 1*, **2003**.
- ²⁰ Tu, " *Raman spectroscopy in biology* ", **1982**, John Wiley & Sons.
- ²¹ Berne, Pecora, " *Dynamic light scattering : With applications to chemistry, biology and Physics* " **2000**, Dover Publications.
- ²² Aigouy, de Wilde, Frétygny, " *Les nouvelles microscopies : A la découverte du nanomonde* " **2006**, Collection Echelles, Belin.
- ²³ Morris, Kirby, Gunning, " *Atomic Force Microscopy for Biologists* " **1999**, Imperial College Press.
- ²⁴ de Mul, Mann, *Langmuir* **1998**, 14, 2455-2466.
- ²⁵ Winsel, Honing, Lunkenheimer, Geggel, Witt, *Eur. Biophys. J.* **2003**, 32, 544-552.
- ²⁶ Herman, " *Optical Diagnostic for thin film processing* " **1996**, Academic Press.
- ²⁷ Buffeteau, *Thèse de l'Université Bordeaux 1*, **1988**.
- ²⁸ Blaudez, *Thèse de l'Université Bordeaux 1*, **1993**.
- ²⁹ Ferraro, Basile, " *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* " **1982**, Academic press.
- ³⁰ Blaudez, Turlet, Dufourcq, Bard, Buffeteau, Desbat, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, 92 (4), 525-530.
- ³¹ Wilson, " *Confocal Microscopy* ", **1990**, Academic press.
- ³² Page web du Centre de Recherche Public Henri Tudor:
<http://projects.santec.lu/bioinfo/imaging/tutorial/part3>
- ³³ Als-Nielsen, McMorrow, " *Elements of Modern X-Ray Physics* " **2001**, John Wiley & Sons, Ltd.

CHAPITRE III : ASSEMBLAGE DES γ - ET ω - GLIADINES EN MILIEU AQUEUX

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux propriétés d' (auto)-assemblage des protéines de réserve de blé dans des milieux aqueux à pH neutre. Etant donné l'insolubilité des prolamines dans l'eau après leur extraction, peu de travaux ont été réalisés dans ce type de milieu, bien qu'il s'agisse de l'environnement biologique. Dans un premier temps, afin de mimer le contexte des protéines de réserve néo-synthétisées dans le lumen du réticulum endoplasmique, avant leur assemblage sous forme de corpuscule protéique, nous avons étudié la solubilité et le mode d'assemblage de ces protéines en solution diluée dans un tampon à pH neutre. Ensuite, dans le but de reproduire les milieux protéiques denses des CP, un outil de micro-évaporation utilisant un circuit microfluidique a été testé pour concentrer progressivement les solutions diluées de protéines. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au comportement des protéines de réserve à l'interface air-eau. En effet, au sein du réticulum endoplasmique, les protéines néo-synthétisées sont entourées par de nombreuses membranes, qui sont liées à la géométrie de l'organite. Ainsi l'étude des protéines de réserve à l'interface air-eau constitue une première étape avant l'étude de ces dernières à l'interface membrane-eau. De plus, la compression de monocouches de protéines à l'interface air-eau permet de simuler le procédé d'agrégation via une interface et de se rapprocher des conditions biologiques de "macromolecular crowding" (encombrement macromoléculaire).

Pour justifier l'étude des protéines de réserve de blé dans l'eau, des essais préliminaires ont été réalisés par spectroscopie pour montrer que ce type de protéines évolue remarquablement en termes de structure secondaire selon le solvant utilisé, et que les résultats de la littérature obtenus sur ces protéines solubilisées dans de l'acide acétique ou dans un mélange eau-éthanol ne sont pas suffisants dans le cadre de notre problématique.

A. Etude préliminaire

Des études préliminaires de la structure secondaire des protéines de réserve, en milieu tampon et en solution dans un mélange eau-éthanol, ont été réalisées par spectroscopie infrarouge et dichroïsme circulaire vibrationnel, puis comparées aux données de la littérature. L'objectif de cette étude est de voir si une certaine modularité des structures secondaires existe suivant le solvant utilisé, et par voie de conséquence si des modes spécifiques d'assemblage peuvent apparaître en milieu aqueux, consécutivement à des changements de structure secondaire et tertiaire.

1. Spectroscopie infrarouge

Des essais par spectroscopie infrarouge en mode ATR ont été réalisés pour montrer les évolutions de structure secondaire de la γ -gliadine en fonction du type de solvant. Deux types de solvants ont été utilisés : l'eau (ultrapure), et un mélange eau-éthanol qui est un bon solvant des gliadines. Pour nous affranchir des bandes d'absorption de l'eau, nous avons utilisé des solvants deutérés. La figure 1 présente le spectre infrarouge de la γ -gliadine en solution dans D₂O-EtOD à deux concentrations (4 % et 40 % en masse), et dans D₂O (40 % en masse). Les gliadines n'étant pas solubles dans l'eau, nous n'avons pas pu réaliser de solution homogène à 4 %, et nous avons donc travaillé avec une pâte à 40 %.

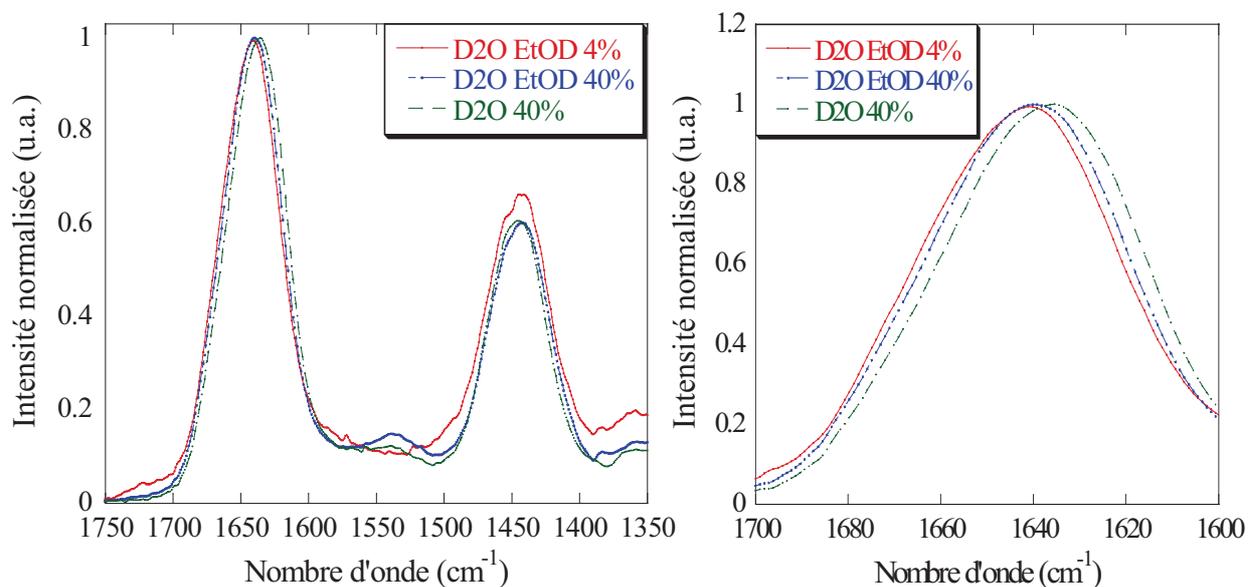


Figure 1 : Spectres infrarouge (FTIR-ATR) de la γ -gliadine en solution ($C=4\%$, p/p) dans l'eau-éthanol (45 :55 , v/v) , et sous forme de pâte ($C=40\%$, p/p) dans l'eau-éthanol et dans l'eau (Solvants deutérés). A gauche, bande amide I et bande de vibration des CN - A droite, zoom sur la bande amide I.

Deux bandes intenses sont observées sur le spectre de gauche : la bande amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) et la bande amide II' ($\sim 1450\text{ cm}^{-1}$). En solvant deutéré, les groupes amides ne sont plus couplés avec la vibration des NH, et la bande amide II devient une bande amide II' dominée par les vibrations des liaisons CN. La bande amide II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$), qui correspond principalement aux vibrations de la liaison NH, apparaît quasiment nulle sur le spectre. Cela

signifie que notre échantillon a bien été deutéré (transformation des liaisons NH en liaisons ND), et que tous les domaines de la protéine ont pu être accédés par le solvant. Une certaine flexibilité ou ouverture de la structure secondaire de la γ -gliadine est ainsi indiquée.

Concernant la structure secondaire de la protéine, la largeur de la bande amide I traduit une grande variété de structures secondaires de la protéine, quelles que soient les conditions. Dans l'eau-éthanol deutéré, le maximum d'intensité est à 1640 cm^{-1} pour la solution diluée et à 1639 cm^{-1} pour la pâte. Cette gamme de longueur d'onde indique une majorité de structures désordonnées. Le léger décalage vers les basses fréquences du maximum d'intensité de la bande amide I laisse suggérer une quantité un peu plus grande de structures de type feuillets β dans l'échantillon le plus concentré. Pour l'échantillon préparé avec de l'eau deutérée, un décalage remarquable du maximum d'intensité est mesuré. Le maximum d'intensité à 1635 cm^{-1} est caractéristique d'une majorité de feuillets β dans l'échantillon. Il y a donc une augmentation des structures de type feuillets β lorsque l'on passe d'un solvant eau-éthanol deutérés à l'eau deutéré. Cette observation confirme celle préalablement établie par Pézolet *et al*¹. En effet ces derniers montrent que sous forme de pâte aqueuse, les prolamines sont structurées sous forme de coudes β , d'hélices α , et de feuillets β intra- et intermoléculaires alors que sous forme soluble dans l'acide acétique il y a beaucoup moins de feuillets. Les auteurs suggèrent ainsi que sous forme de pâte, les protéines de réserve interagissent via des feuillets β alignés entre eux, qui correspondraient aux domaines répétés des prolamines. Cependant, ces études ont toutes été réalisées par spectroscopie infrarouge qui est une technique peu précise dans certains cas, car les bandes d'absorption de certaines structures secondaires se superposent. C'est pourquoi nous avons complété nos études structurales par des expériences de dichroïsme circulaire vibrationnel.

2. Dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD)

Pour réaliser des expériences de VCD, les solutions de protéines ne doivent pas être plus concentrées que 5 % en masse pour limiter l'adsorption du rayonnement incident. Ainsi nous avons travaillé à cette concentration dans l'eau-éthanol, et pour le solvant "eau" nous avons préalablement préparé une pâte à 40 % que nous avons immergé dans l'eau. Tout comme en spectroscopie infrarouge, des solvants deutérés ont été utilisés.

La figure 2 présente les spectres obtenus pour les deux types de solvants. Plusieurs méthodes d'analyse de spectres VCD, basées sur des approches statistiques, ont été testées pour traiter ces spectres, mais les résultats n'ont pas convergé. Cela peut être dû à la nature peu structurée des gliadines non prise en compte par les méthodes de prédiction établies sur la base de données obtenues sur des protéines globulaires. L'exploitation des spectres a donc été limitée à une analyse qualitative. Pour déterminer les types de structures secondaires présentes dans les deux échantillons, nous avons comparé nos spectres à ceux obtenus pour des protéines de structures déterminées². Sur nos spectres, nous observons deux bandes positives (autour de 1676 cm^{-1} et 1650 cm^{-1}) et deux bandes négatives (1661 cm^{-1} et $1630\text{-}1619\text{ cm}^{-1}$). Le doublet caractérisé par une bande négative à 1661 cm^{-1} et une bande positive à 1650 cm^{-1} est attribué à des hélices α . Il est présent dans les deux échantillons. Par ailleurs, l'intense bande négative

aux basses fréquences peut-être attribuée à des feuillets β , ou à des structures étendues de type PPII (cf annexe A). En effet, les protéines majoritairement structurées en feuillets β présentent des spectres VCD avec une bande négative positionnée entre 1620 et 1630 cm^{-1} , et les protéines avec des structures étendues "désordonnées" ont une bande négative positionnée autour de 1635 cm^{-1} , accompagnée d'une large bande positive, peu intense, autour de 1660 cm^{-1} . Nous pouvons ainsi suggérer qu'il y a un mélange de structures de type PPII et de feuillets β dans les deux échantillons, mais que les proportions sont différentes. Il y aurait une diminution des structures PPII au profit de feuillets β lorsqu'on passe d'un solvant eau-éthanol à un solvant eau. Ce résultat confirme celui que nous avons obtenu par spectroscopie infrarouge tout en le précisant.

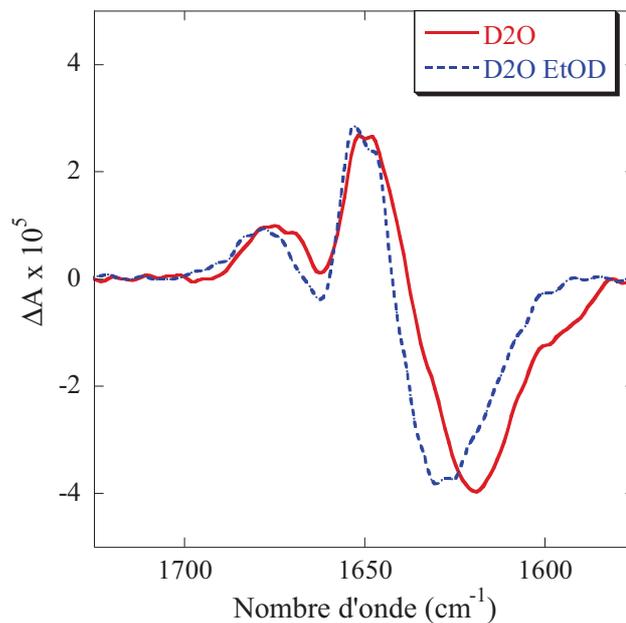


Figure 2 : Spectres VCD de la γ -gliadine en solution dans l'eau et l'eau:éthanol. (Solvants deutérés)

Des études réalisées par dichroïsme circulaire sur les peptides correspondants aux deux domaines de la γ -gliadine³ ont montré que les hélices α se trouvaient dans le domaine C-terminal, non répété et globulaire de la protéine, alors que le domaine N-terminal, répété, présentait soit des coudes β soit des hélices de type PPII selon la température. En considérant que les structures de type PPII sont liées au domaine N-terminal de la protéine, nous pouvons conclure que c'est le domaine répété de la γ -gliadine qui est sensible aux variations de solvant et donne lieu à la formation de feuillets β . Ce résultat est en accord avec les études réalisées par spectroscopie IR sur des ω -gliadines⁴ (domaine unique répété) et des polypeptides recombinants issus du domaine répété de la ω -gliadine⁵. En effet, ces études montrent que les ω -gliadines présentent de plus en plus de feuillets β avec le taux d'hydratation (jusqu'à 35% en eau) et que ce serait la séquence répétée qui favoriserait les interactions intermoléculaires de type feuillets β .

B. Assemblage en volume

1. Solubilité en milieu aqueux

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la solubilité des γ - et ω -gliadines dans des solvants aqueux à pH neutre (tampon phosphate pH 7.2) pour mimer le contexte biologique. Le point isoélectrique de ces protéines étant relativement proche de la neutralité ($pI_{\gamma\text{-gliadine}}=8.5$, $pI_{\omega\text{-gliadine}}=5.06^*$), une solubilité très partielle est attendue.

Dans cette étude, les protéines lyophilisées (γ - et ω -gliadines) et les solutions tampons de force ionique I^\dagger ont été mélangées à une concentration C_i en protéines, et agitées pendant un temps t . Les mélanges ont ensuite été centrifugés pendant 30 minutes à 1000 rpm et le surnageant a été prélevé. Le surnageant a été étudié par spectroscopie UV-Visible afin de déterminer la concentration en protéines (C_f), et par diffusion dynamique de la lumière pour déterminer la taille des objets en solution. Enfin, des expériences d'AFM ont été entreprises pour caractériser les objets en solution. Trois paramètres de solubilisation ont été étudiés : la force ionique I du solvant (tampon phosphate pH 7.2), la concentration de protéines introduite dans le mélange C_i et le temps d'agitation t . Ces études ont été réalisées sur les deux types de gliadines : la γ - et la ω -gliadine.

Note : Une grande partie de nos expériences réalisées en solution aqueuse a été invalidée du fait de la mise en évidence d'une contamination et prolifération bactérienne dans nos échantillons au cours du temps. En conséquence l'étude réalisée sur des échantillons en présence d'un agent bactériostatique (NaN_3 , 200 ppm, soit $I = 50$ mM), présentée ci-dessous, pourra paraître succincte, en raison de la découverte tardive de cette contamination.

a) Effet de la concentration initiale

La figure 3 présente l'évolution de la concentration mesurée dans le surnageant (C_f) en fonction de la concentration en protéines introduite dans le mélange (C_i). Ces expériences ont été réalisées avec un tampon phosphate 0.05 M et un temps d'agitation (t) de 15 heures. Ces résultats montrent qu'une partie des gliadines peut-être solubilisée dans le tampon considéré et que la quantité de protéines solubilisée augmente de façon quasi-linéaire avec la concentration initiale. 10 % des protéines sont solubilisées dans le cas de la γ -gliadine, et 25 % dans le cas de la ω -gliadine.

De façon générale, la solubilité d'un soluté est caractérisée par une concentration critique C_c correspondant à la concentration maximale de soluté pouvant être solubilisé dans un solvant donné.

Ainsi, pour $C_i < C_c$ alors $C_f = C_i$

et pour $C_i \geq C_c$ alors $C_f = C_c$.

* Points isoélectriques théoriques déterminés à partir des séquences présentées dans le chapitre 1.

† $I = \frac{1}{2} \sum C Z^2$ avec C la concentration en ions et Z la valence des ions.

Dans notre cas nous avons une évolution linéaire de $C_i = f(C_f)$, mais avec une pente nettement inférieure à 1. En considérant que la solubilité des protéines suit le comportement énoncé ci-dessus, nos résultats suggèrent que nos lots de protéines purifiées contiennent plusieurs populations de protéines⁶. En effet, bien qu'un seul pic soit observé par chromatographie en phase inverse, la caractérisation de nos lots de protéines par spectrométrie de masse (SM) a montré qu'il existait deux populations distinctes dans le cas de la γ -gliadine (cf chapitre 2): une population à 34614 g/mol (19 %) et une population à 35185 g/mol (81 %). Dans le cas de la ω -gliadine, une seule population a été mise en évidence par spectrométrie de masse, mais avec une erreur plus importante. Par ailleurs un gel d'électrophorèse 2D a montré la présence de différentes gliadines de masses identiques mais de charges différentes dans chacune des fractions purifiées. Ainsi la solubilité des γ - et ω - gliadines peut être expliquée par le polymorphisme existant dans chaque fraction purifiée.

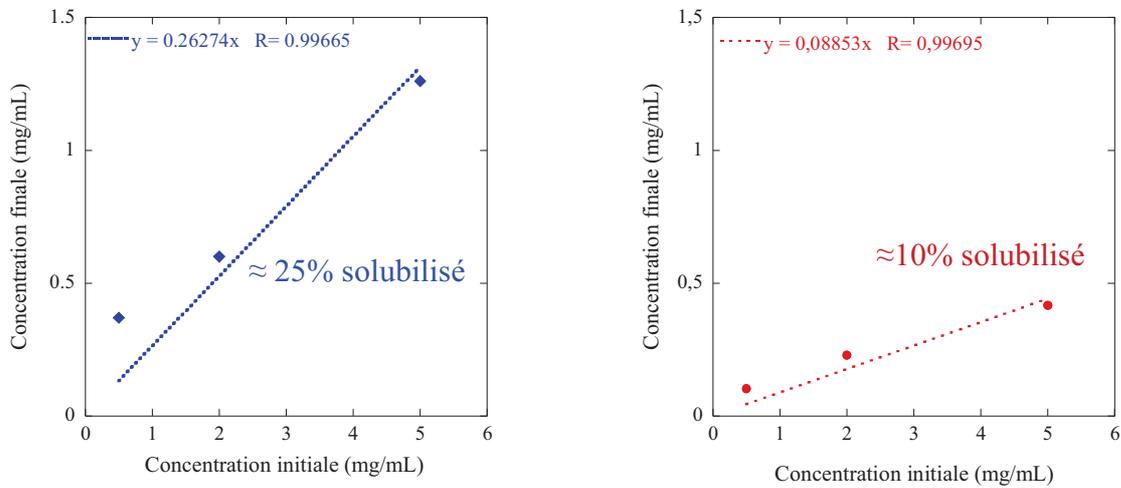


Figure 3 : Concentration en protéines du surnageant en fonction de la concentration initiale. A gauche, mesures réalisées sur la ω -gliadine. A droite, mesures réalisées sur de la γ -gliadine. (Durée d'agitation : 15 h – Force ionique 0.05 M)

b) Effet du temps de solubilisation

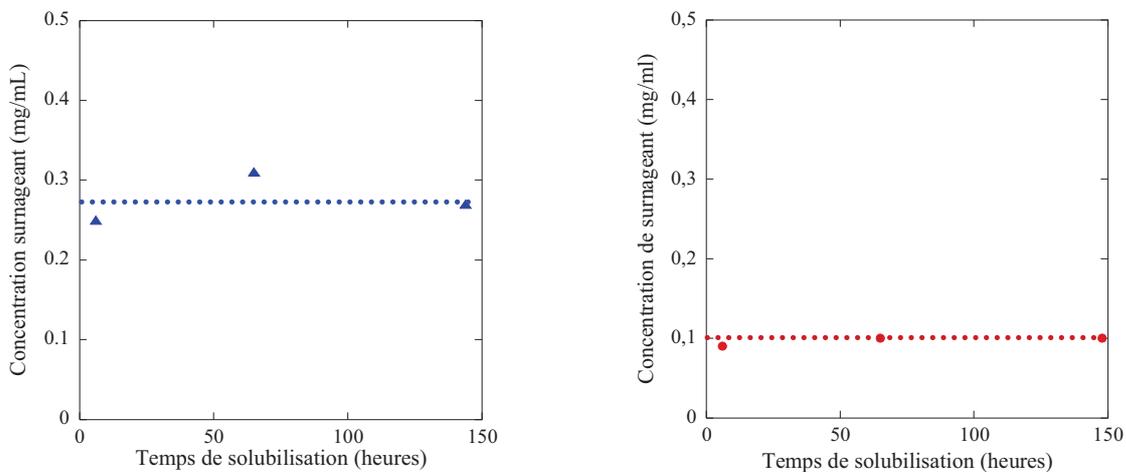


Figure 4 : Concentration du surnageant en fonction du temps d'agitation. A gauche, mesures réalisées sur la ω -gliadine. A droite, mesures réalisées sur la γ -gliadine. (Concentration initiale en protéines: 0.5 mg/ml – Force ionique 0.05 M)

La figure 4 présente la concentration du surnageant en fonction du temps d'agitation de l'échantillon. Les mesures montrent que la concentration en protéines du surnageant est constante en fonction du temps de solubilisation quel que soit le type de gliadine. Le temps d'agitation minimum testé étant de 6 heures, la cinétique de solubilisation se réalise en une durée inférieure à 6 heures.

c) Effet de la force ionique

La figure 5 présente l'évolution de la concentration en protéines du surnageant en fonction de la force ionique du tampon phosphate. Sur l'axe des ordonnées est présentée la valeur obtenue en eau ultrapure (force ionique nulle). Dans le cas de la ω -gliadine, à faible force ionique, on observe une augmentation de la solubilité, puis à partir de 1 mM, une diminution est observée. Ce comportement est commun à toutes les protéines et il est expliqué de la façon suivante⁷ : à faible force ionique, les protéines sont entourées de contre-ions qui diminuent l'énergie libre électrostatique et accroissent la solubilité de la protéine, il s'agit de l'effet dissolvant ("salting in"). A force ionique plus élevée, plusieurs phénomènes sont proposés : une répulsion électrostatique générale entre les sels et l'intérieur apolaire de la protéine, une interaction préférentielle des sels avec l'eau qui affecterait la structure de l'eau, et l'augmentation de tension de surface de l'eau par les sels. Il s'agit de l'effet de relargage ("salting-out") utilisé en particulier pour la séparation des protéines. Dans notre cas, le changement de régime a lieu pour une force ionique relativement faible. Cela peut s'expliquer par le faible nombre de résidus chargés contenus dans la séquence de la ω -gliadine, ce qui nécessite peu de contre-ions pour changer de régime. Dans le cas de la γ -gliadine, nous observons également une diminution de la solubilité aux hautes forces ioniques. Cependant aux forces ioniques plus faibles, un comportement anormal est observé et attribué à une erreur expérimentale.

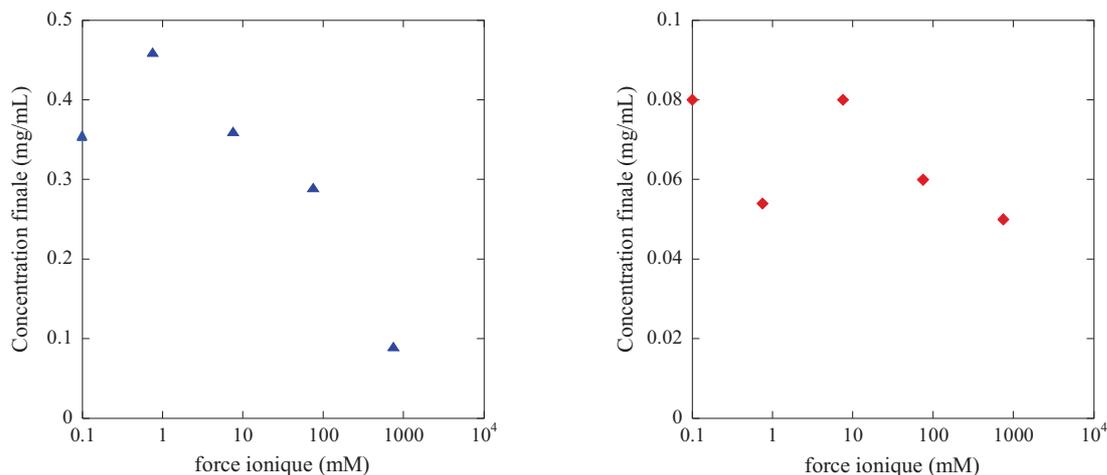


Figure 5 : Concentration en protéines du surnageant en fonction de la force ionique du tampon. Sur l'axe des ordonnées est indiquée la mesure obtenue en eau ultrapure. A gauche, mesures réalisées sur la ω -gliadine. A droite, mesures réalisées sur de la γ -gliadine. (Concentration initiale : 0.5 mg/ml – temps d'agitation : 15 h)

2. Formes d'assemblages ?

Le caractère peu soluble des prolamines en milieu aqueux nous a incité à faire des observations en microscopie optique pour déterminer la nature des protéines en solution (monomères, multimères). En microscopies à contraste de phase et lumière polarisée, les solutions apparaissent homogènes et isotrope, ce qui signifie que les objets en solution ont une taille inférieure à 500 nm. Des expériences ont donc été réalisées en diffusion dynamique de la lumière et microscopie à force atomique de manière à sonder des échelles d'observation plus petites.

a) Diffusion dynamique de la lumière

Des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées sur les surnageants préparés selon le protocole défini précédemment ($C_i = 5$ mg/ml) et filtrés sur $0.8 \mu\text{m}$. Les figures 6 et 7 présentent les résultats obtenus pour des solutions diluées de γ -gliadines ($C_f = 0.44$ mg/ml), et de ω -gliadines ($C_f = 1.88$ mg/ml) en eau ultrapure.

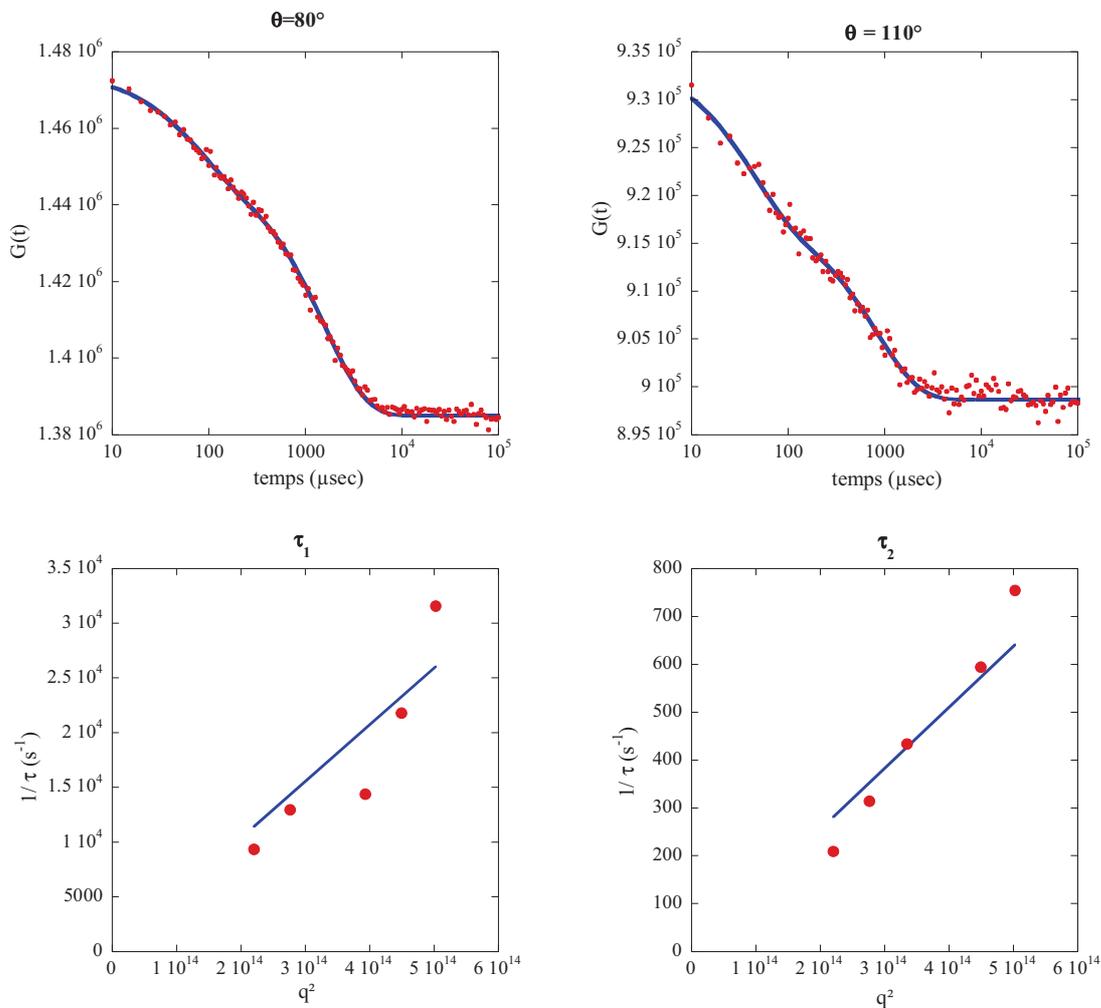


Figure 6 : Résultats expérimentaux de DLS obtenus sur des solutions de γ -gliadines en solution dans l'eau ultrapure. En haut, fonctions d'auto-corrélation à $\theta=80^\circ$ et 110° , ajustées par des fonctions bi-exponentielles. En bas, Représentation de l'inverse des temps caractéristiques $1/\tau$ en fonction de q^2 .

Des exemples de fonctions d'auto-corrélation $g(\tau)=f(\tau)$ obtenues à $\theta = 80^\circ$ et 110° , ajustées par des fonctions bi-exponentielles, ainsi que les courbes $1/\tau = f(q^2)$ pour les deux types de gliadines sont présentées (figure 6 et 7). Les fonctions d'auto-corrélation apparaissent un peu bruitées, bien que les temps d'acquisition aient été très longs (plusieurs heures à chaque angle). Cependant les courbes sont relativement bien ajustées par des fonctions de type bi-exponentielles, ce qui signifie que nos échantillons contiennent deux types de populations en taille. Deux temps caractéristiques (τ_1 et τ_2) ont été obtenus pour chaque angle d'acquisition, ils sont présentés sous la forme $1/\tau = f(q^2)$ afin de déterminer les coefficients de diffusion correspondants (pente de la droite passant par l'origine). La relation entre $1/\tau$ et q^2 apparaît linéaire dans tous les cas, ce qui confirme le comportement Brownien de ces deux populations dans nos échantillons, et nous permet de calculer les rayons hydrodynamiques de chacune des deux populations.

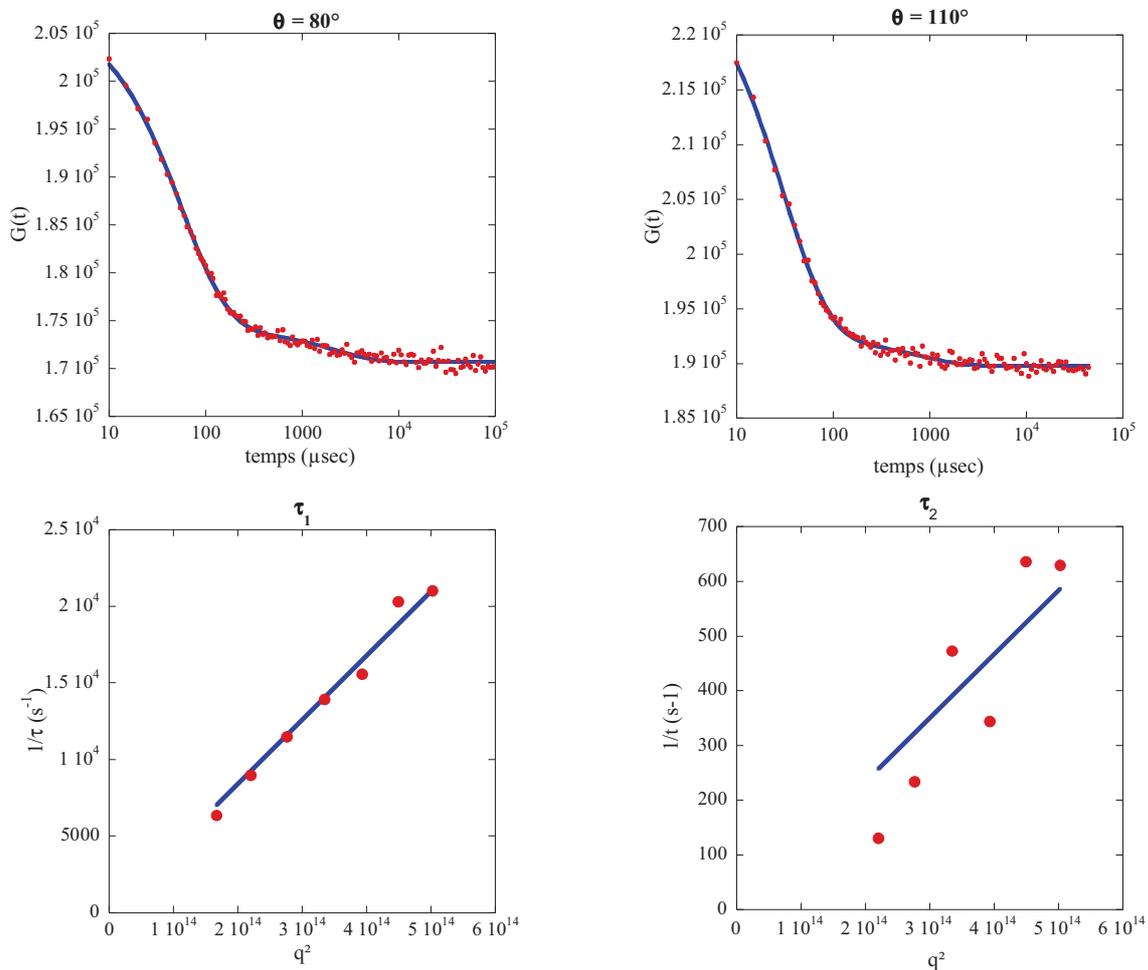


Figure 7 : Résultats de DLS obtenus sur des solutions de ω -gliadines en solution dans l'eau ultrapure (a) Fonctions d'auto-corrélation à $\theta=80^\circ$ et 110° , ajustées par des fonctions bi-exponentielles (b) Représentation de l'inverse des temps caractéristiques $1/\tau$ en fonction de q^2 .

Le tableau 1 récapitule les résultats obtenus en diffusion dynamique de la lumière pour des solutions diluées de γ - et ω -gliadines ($C_i = 5 \text{ mg/ml}$), en solvant eau ultrapure et tampon

phosphate 0.5 mM. Les rayons hydrodynamiques, ainsi qu'une évaluation des proportions de chaque population y sont présentés. Afin d'estimer les évolutions de proportions de chaque population, les pourcentages des temps caractéristiques mesurés à $\theta = 80^\circ$ sont donnés.

	Eau ultrapure			Tampon phosphate 0.5mM		
	% τ_1 à $\theta=80^\circ$	R _{H1} nm	R _{H2} nm	% τ_1 à $\theta=80^\circ$	R _{H1} nm	R _{H2} nm
γ-gliadine	15	4	166	/	/	131
ω-gliadine	70	5	200	34	6.9	131

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus en DLS sur des solutions aqueuses de γ et ω -gliadines

En eau ultrapure, que ce soit pour la γ - ou la ω -gliadine deux types de populations similaires sont observées : une population avec un rayon hydrodynamique inférieur à 10 nm et une population avec un rayon hydrodynamique supérieur à 150 nm. Les proportions des populations sont différentes selon les gliadines. Il y a beaucoup plus de d'objets de petite taille dans la solution diluée de ω -gliadines que dans celle de γ -gliadines.

En tampon phosphate, nous retrouvons les deux types de populations pour la solution de ω -gliadines, mais pas pour celle de γ -gliadine qui ne contient que des objets de grande taille. Dans la solution de ω -gliadines, les proportions des deux populations sont différentes par rapport aux solutions dans l'eau ultrapure. La proportion de formes monomériques dans le tampon est inférieure à celle dans l'eau ultrapure.

Les tailles caractéristiques des populations semblent indiquer que nous avons dans les solutions un équilibre entre d'une part des protéines monomériques, et d'autre part des agrégats. En effet, les rayons de giration des gliadines, précédemment déterminés par diffusion centrale des rayons X⁸, sont de 3.8 nm pour la γ -gliadine et 4.6 nm pour la ω -gliadine (soit des rayons hydrodynamiques de 4.9 et 5.9 nm respectivement). Il semble donc raisonnable d'associer le temps court des fonctions d'autocorrélation à des protéines sous forme monomérique. Le caractère quasi-monodisperse des agrégats paraît surprenant et laisse suggérer une organisation particulière de ces objets. Si on prend en compte le caractère amphiphile des γ -gliadines (cf chapitre 1), l'hypothèse d'une micellisation peut être évoquée pour préciser le mécanisme de formation de ces agrégats monodisperses. Cependant, en considérant que le volume d'une protéine dans les agrégats, correspond à celui d'une protéine monomérique, les nombres d'agrégation des agrégats sont les suivants : ~71 500 pour la γ -gliadine et ~ 64 000 pour la ω -gliadine. Ces nombres d'agrégation sont très élevés comparé à ceux obtenus pour des micelles de tensio-actifs ou de copolymères (nombre d'agrégation de 10 à 1000). Ces nombres d'agrégation font plutôt penser à des phases denses de protéines, résultant d'une transition de phases liquide-liquide. Afin d'affiner la nature de ces agrégats et leur mécanisme de formation, des expériences complémentaires de stabilité dans le temps pourront être réalisées en modulant la concentration initiale en protéines.

b) Observations en microscopie à force atomique (AFM)

Pour observer les agrégats de gliadines, des observations par AFM ont été réalisées en collaboration avec Hassan Saadaoui (CRPP). De façon préliminaire, les expériences ont été réalisées à sec, en mode "tapping", sur des solutions de γ -gliadines. La procédure utilisée consistait à déposer une goutte de solution aqueuse de γ -gliadines (solution diluée $C = 0.01$ mg/ml), sur un substrat, puis à retirer l'excès de solvant. Deux types de substrats ont été testés : le graphite (HOPG) qui est hydrophobe, et le mica qui est hydrophile.

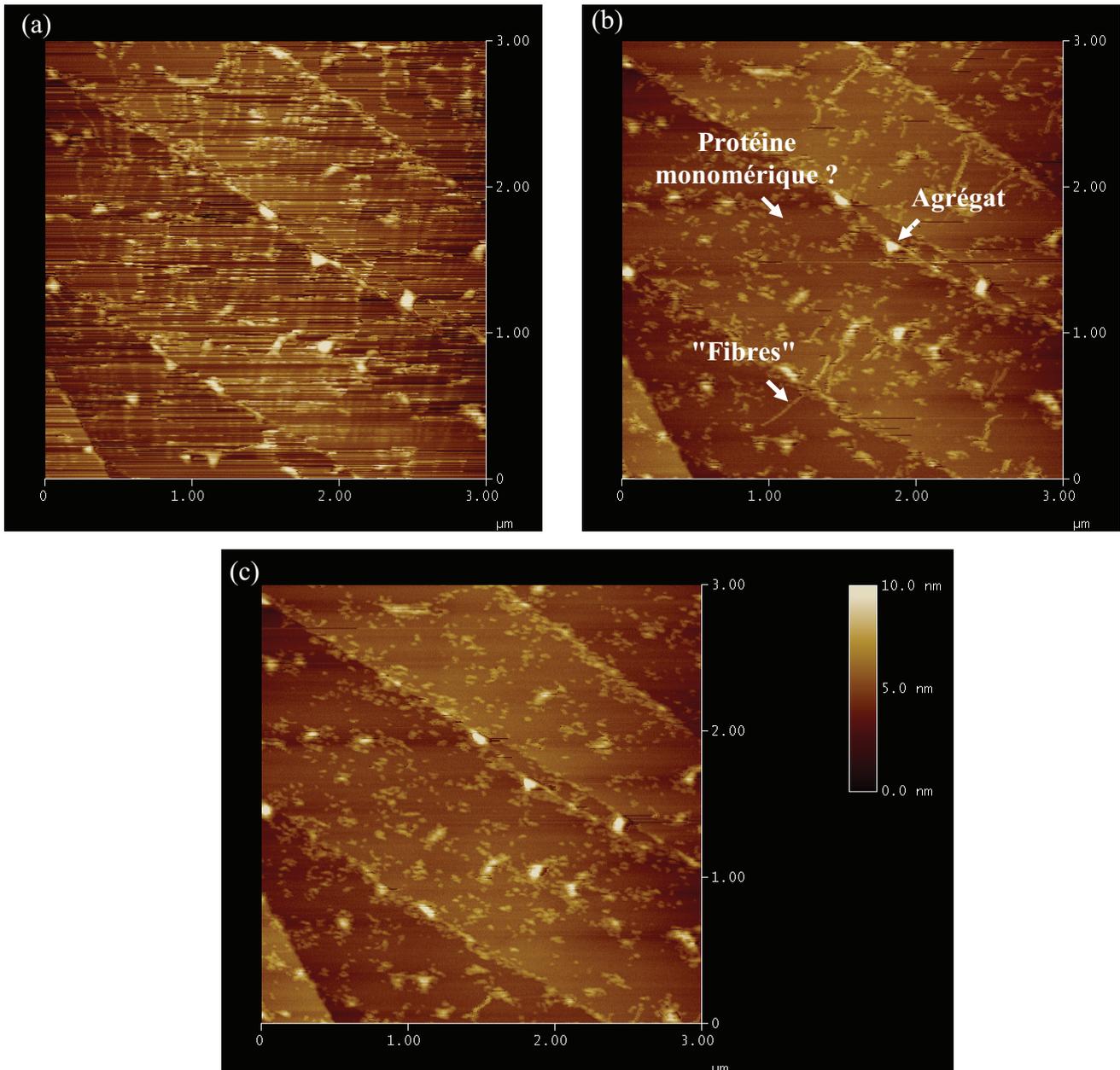


Figure 8 : Clichés AFM à sec d'une solution aqueuse de γ -gliadines déposée sur un substrat de HOPG (images de hauteur) (a) Premier balayage de la surface (b) Deuxième balayage de la surface (c) Quatrième balayage de la surface - Images 3x3 μm.

La figure 8 présente les images topographiques réalisées successivement sur un substrat de graphite. La première image, de faible résolution, indique la présence de structures très allongées et d'épaisseur constante, et quelques objets d'épaisseur plus élevée (petits agrégats ?), souvent au niveau des marches du substrat. Les structures allongées ont des longueurs pouvant aller jusqu'à 500 nm de long et des épaisseurs de 1.6 ± 0.2 nm. La longueur de ces "filaments" laisse suggérer un assemblage polymérique. En effet, une gliadine seule, même totalement dépliée, aurait une longueur d'environ 40 nm, en considérant que la taille moyenne d'une liaison peptidique est 0.132 nm et que la γ -gliadine possède environ 300 résidus. Cependant, l'épaisseur de ces filaments est cohérente avec des épaisseurs monomériques. Ainsi il pourrait s'agir d'assemblages "bout à bout" des chaînes polypeptidiques, étalés sur la surface de graphite. Ensuite, au cours des balayages, le système semble se modifier. En effet, les structures allongées disparaissent pour laisser place à des objets plutôt isotropes, d'épaisseur constante et égale à celle des filaments, alors que les agrégats au niveau des marches ne sont pas modifiés. Les petits objets pourraient être des protéines monomériques. La disparition des fibres au cours de l'expérience peut s'expliquer soit par une adsorption de ces objets sur la pointe AFM, soit par une destruction de ces objets. La destruction de ces objets pourrait provenir d'une déstabilisation par la pointe, ou du séchage de l'échantillon. En effet, lorsque l'échantillon est placé sous la pointe AFM, l'excédant de solvant est simplement retiré par adsorption ; du solvant a ainsi pu subsister et s'évaporer au cours de l'expérience.

Ces observations confirment la présence des monomères identifiés par DLS, mais aussi l'existence d'assemblages instables sous forme de filaments. Cependant les objets de 100 à 200 nm de rayon hydrodynamique n'ont pas pu être mis en évidence. Cela peut s'expliquer par une interaction répulsive de ces objets avec le substrat hydrophobe. Un substrat de mica a donc été testé.

La figure 9 présente les observations réalisées sur un substrat de mica. Le cliché (a) présente une vue plus globale de l'échantillon, où différents types d'objets peuvent être observés : de nombreux petits objets dans le fond, comme présentés dans le cliché (b) ; des regroupements circulaires de petits objets (cliché (c)); et quelques gros objets. Le cliché (b) est typique des zones homogènes observées sur ce type d'échantillon. Ces zones présentent de nombreux objets circulaires d'épaisseur moyenne 2.5 ± 1 nm. La densité et le diamètre moyen de ces objets est variable selon les zones de l'échantillon. Les regroupements circulaires de petits objets, zoomés sur le cliché (c), ont des diamètres de l'ordre de 500 nm, et sont constitués de petits objets d'une épaisseur de 1 nm, alors que les gros objets ont des épaisseurs de 10 à 40 nm. Les petits objets ont des épaisseurs et une expansion latérale limitée qui permet de les identifier à des monomères, ou à des agrégats constitués de quelques monomères. Par ailleurs, le diamètre des regroupements circulaires correspond à celui des agrégats mis en évidence par DLS, mais l'épaisseur ne peut pas correspondre à celle des agrégats s'étant adsorbé sur la surface de mica. Il pourrait éventuellement s'agir d'"empreintes" des agrégats qui se seraient adsorbés puis désorbés sur le substrat. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de gros objets partiellement épais (10 à 40 nm d'épaisseur). Ces gros objets ont une épaisseur limitée qui pourrait laisser suggérer que les agrégats en volume sont gonflés d'eau et peu denses en protéines.

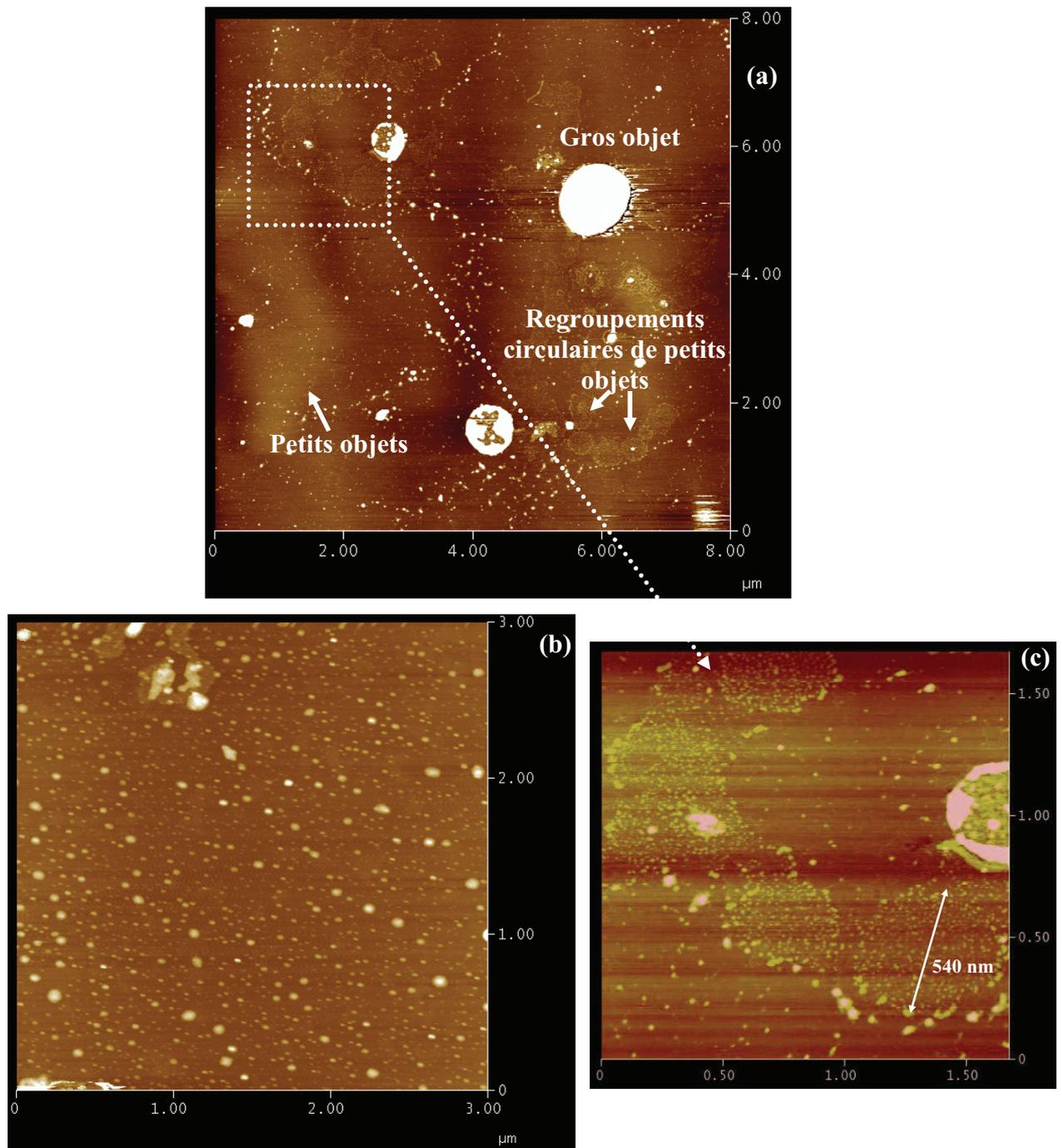


Figure 9 : Clichés AFM à sec d'une solution aqueuse de γ -gliadines déposée sur un substrat de mica (images de hauteur) (a) Vue globale - Image 8x8 μm . (b) Zone homogène constituée de petits objets- Image 3x3 μm . (c) Zoom sur les regroupements de petits objets circulaires - Image 1.75x1.75 μm .

Ainsi, ces essais d'AFM suggèrent différents états d'association des γ -gliadines. Sur un substrat hydrophobe, un état instable des gliadines sous forme de filaments a pu être identifié, alors que sur du mica, il semblerait que les agrégats de 100 à 200 nm de rayon préalablement identifiés par DLS soient observables. En considérant que les gros objets observés sur mica sont identiques à ceux identifiés par DLS, l'épaisseur de ces objets mesurée par AFM suggère que les agrégats en volume sont gonflés d'eau. Concernant les filaments, ils pourraient être le

résultat de l'interaction des protéines avec le substrat, la question de leur existence dans la solution, en volume, se pose. Pour avoir, une vision d'objets en solution, l'AFM n'est pas la technique la mieux adaptée, car les solutions sont déposées sur un substrat qui est séché, ainsi l'interaction des objets avec le substrat est primordiale, d'autant plus que nous travaillons avec des systèmes mous. Des essais de cryo-fracture et de cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) ont été tentés, mais n'ont pas abouti. Les images de cryo-TEM manquaient de contraste tandis que les répliques de cryo-fracture ont présenté des défauts dans leur fabrication.

3. Système de concentration contrôlée de solutions diluées

Nous avons jusqu'ici décrit les résultats obtenus sur des solutions diluées de protéines en solution aqueuse. Afin de mimer le comportement de ces protéines dans les systèmes denses que représentent les corpuscules protéiques, nous avons cherché une méthode permettant d'atteindre des régimes concentrés tout en limitant la quantité de protéine utilisée. Les résultats sont décrits ci-dessous.

a) Microévaporateur

Pour concentrer des solutions aqueuses de gliadines, des expériences sur systèmes microfluidiques ont été réalisées au Laboratoire du Futur à Bordeaux (CNRS/Rhodia). Le microévaporateur⁹, développé récemment par J. Leng, est un système microfluidique qui permet de concentrer progressivement, de façon contrôlée, de petits volumes de solution (quelques μL). Il s'agit d'un micro-canal en polydiméthylsiloxane (PDMS), recouvert d'une membrane fine faisant l'interface avec un flux d'air contrôlé, et relié à un réservoir de solution très diluée (figure 10). L'évaporation du solvant par la membrane induit une concentration de la solution et un flux depuis le réservoir vers le bout du canal. Ce dispositif permet ainsi d'explorer un diagramme de phases en concentration avec de très petites quantités de matière. Ces systèmes peuvent ensuite être étudiés par microscopies optiques et spectroscopie Raman.

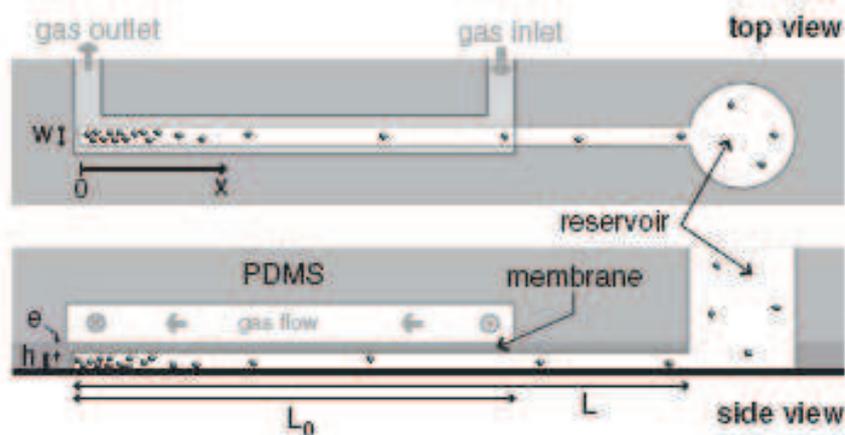


Figure 10: Schéma du micro évaporateur¹². Dimensions typiques : $e = 10 \mu\text{m}$, $h = 20 \mu\text{m}$, $w = 200 \mu\text{m}$, $L_0 = 10 \text{mm}$.

b) Microscopie optique

Des solutions diluées de gliadines, préparées selon le protocole précédemment décrit, ont été concentrées dans des puces de micro-évaporation. Des essais qualitatifs ont été réalisés sur des solutions de γ -gliadines ($C_f = 0.2$ mg/ml) en eau ultrapure et à différentes forces ioniques (1.3 et 3.5 nM). Pour établir la force ionique du solvant, les solutions tampon n'ont pas été utilisées car le dispositif concentre toutes les espèces en solution, et l'utilisation de ces solutions aurait induit une force ionique variable en fonction du taux d'évaporation. Pour pallier à cette difficulté, un volume fini de solution saline (NaCl) a été introduit dans les canaux préalablement à l'ajout de la solution de protéines en eau ultrapure dans le réservoir. Cette procédure permet d'introduire une quantité finie de sels qui se concentre au bout du canal. Au temps initial, toutes les solutions apparaissent optiquement homogènes tout le long du canal. Ensuite, au cours de l'évaporation du solvant, des gouttelettes apparaissent puis croissent en taille par mûrissement et coalescence.

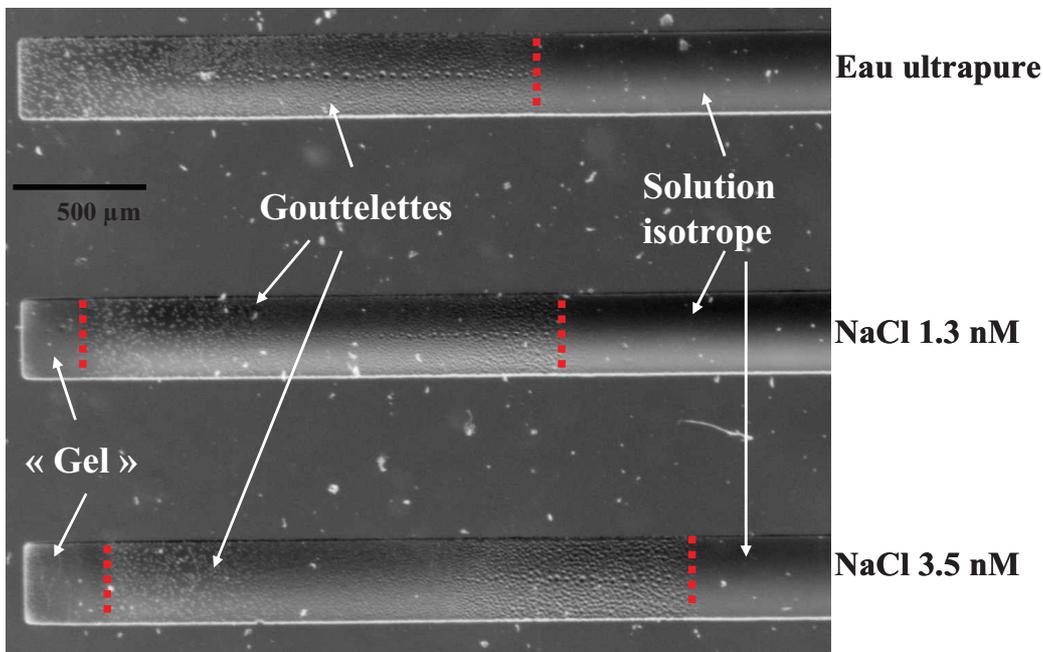


Figure 11 : Observation microscopique de trois micro-canaux où des solutions de γ -gliadines ($C = 0.2$ mg/mL), de diverses salinités, ont été concentrées en parallèle. En haut, solution en eau ultrapure ; au milieu, solution avec 1.3 nM de NaCl ; en bas, solution avec 3.5 nM de NaCl.

La figure 11 présente les observations microscopiques réalisées sur les trois canaux contenant les solutions aux différentes forces ioniques. L'évaporation des différentes solutions étant menée en parallèle, les taux d'évaporation dans les différents canaux sont identiques. De plus, compte tenu du dispositif, les concentrations en protéines sont croissantes le long du canal, depuis le réservoir jusqu'au bout du canal. Plusieurs domaines peuvent être distingués : un domaine homogène et isotrope du côté du réservoir, un domaine bi-phasique constitué de gouttelettes dispersées dans un fond homogène, enfin un domaine monophasique au fond des canaux ayant une force ionique non nulle. Les intensités de fluorescences observées sur des expériences réalisées avec des γ -gliadines marquées (TRITC), ont permis d'identifier les trois

domaines : le premier domaine est une solution diluée de gliadines ; le deuxième domaine un système bi-phasique constitué de phases denses de protéines (gouttelettes) dispersées dans une phase diluée ; et le dernier domaine une phase dense de protéines. Aucune biréfringence n'a pu être détectée lors de l'observation entre polariseurs et analyseurs croisés, ainsi nous avons qualifié la phase dense de "gel". Les changements de domaines apparaissent à différentes positions dans les canaux. Cela suggère des transitions de phases pour différentes concentrations en protéines. La transition de phases liquide-liquide, qui se traduit par l'apparition des gouttelettes, a lieu à des concentrations d'autant plus faibles que la force ionique de la solution est élevée. Cette observation est en accord avec les mesures de solubilité réalisées précédemment. La phase gel, monophasique, apparaît également d'autant plus rapidement que la force ionique est élevée. Une ébauche du diagramme de phase (concentration, force ionique) de la γ -gliadine dans l'eau peut ainsi être réalisée. Cependant il faut prendre des précautions avec ces observations, car le procédé d'évaporation doit induire une variation de force ionique le long du canal. Pour avoir une force ionique constante, il serait plus juste d'observer un point du canal en fonction du temps d'évaporation.

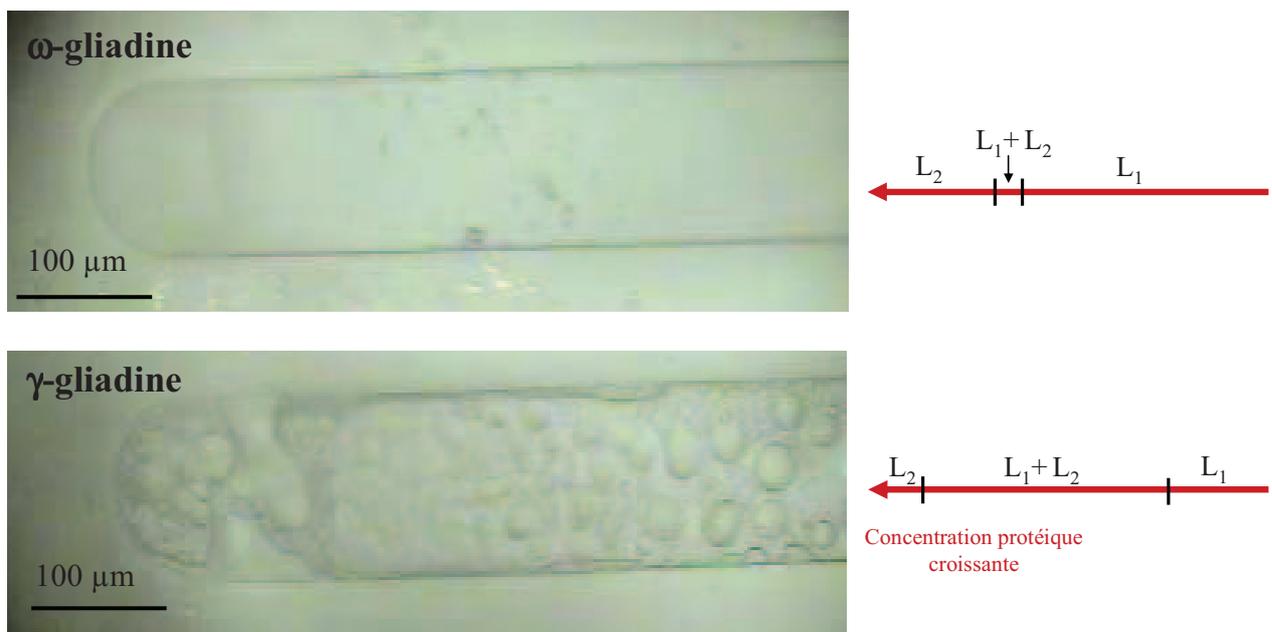


Figure 12 : A gauche, observations microscopique de micro-canaux où ont été concentrées des solutions de γ -gliadines (en bas) et ω -gliadines (en haut). A droite proposition d'explication des différents comportements observés par des diagrammes de phase. (L_1 : phase diluée, L_2 : phase concentrée)

La figure 12 présente les observations réalisées sur des extrémités de micro-canaux, dans lesquels ont été concentrées des solutions de γ - et ω -gliadines ($C_f=0.2$ mg/ml) en eau ultrapure. Dans le cas de la γ -gliadine on peut voir des gouttelettes qui se sont adsorbées sur les interfaces et qui ont coalescé pour former de larges domaines homogènes. Dans le cas de la ω -gliadine, il n'y a pas eu formation de gouttelettes, la phase dense s'est directement formée à partir de l'extrémité du canal. Cette différence de comportement peut être attribuée à un domaine étroit de coexistence des phases dense (L_2) et diluée (L_1) dans le diagramme de

phases de la ω -gliadine, contrairement à la γ -gliadine où le domaine de coexistence serait beaucoup plus large (cf schéma de droite, figure 12).

c) Spectroscopie Raman Confocale

Une étude des différentes phases de gliadines observées dans les micro-canaux a été initiée par spectroscopie Raman. L'expérience a montré que le meilleur rapport signal sur bruit était obtenu pour une excitation à 782 nm dans le cas de nos systèmes.

La figure 13 présente les spectres Raman des γ - et ω -gliadines à l'état solide (lyophilisé). Afin de pouvoir comparer les spectres, les intensités ont été normalisées par l'intensité de la bande amide I. Comme l'indique la figure, la majorité des raies a pu être attribuée¹⁰. Les bandes amides I, III, les raies intenses des résidus aromatiques, la raie des ponts disulfures dans le cas de la γ -gliadine, et la bande d'élongation des CH, et des CN des prolines, peuvent être distinguées. La position de la bande amide I suggère majoritairement des structures désordonnées et des coudes β dans le cas de la ω -gliadine, et majoritairement des structures désordonnées et des hélices α dans le cas de la γ -gliadine. Par ailleurs, la position de la bande des ponts S-S à 510 cm^{-1} suggère une conformation gauche-gauche-gauche¹¹, qui est la conformation énergétiquement la plus stable. L'échantillon à l'état solide étant isotrope, les intensités des raies peuvent être comparées d'un échantillon à l'autre. Les raies des phénylalanines sont clairement plus intenses dans le cas de la ω -gliadine, que dans le cas de la γ -gliadine. Cette observation est en accord avec les pourcentages de phénylalanines dans ces protéines (Tableau 2). La bande à 1450 cm^{-1} présente également une intensité plus élevée dans le cas de la ω -gliadine. Cela s'explique par le plus grand pourcentage de prolines dans sa séquence primaire.

	γ -gliadine		ω -gliadine	
Phénylalanine (F)	15 (dont 13 dans domaine répété)	4.8 %	25	8.9%
Tryptophane (W)	3 (dont 1 dans domaine répété)	1 %	1	0.4%
Tyrosine (Y)	2 (0 dans domaine répété)	0.6 %	6	2.1%
Proline (P)	54 (dont 39 dans domaine répété)	17.5%	75	26.8%

Tableau 2 : Composition en acides aminés aromatiques et prolines des γ - et ω -gliadines selon les séquences référencées Q6EEW9 et Q9FUW7 dans Uniprot.

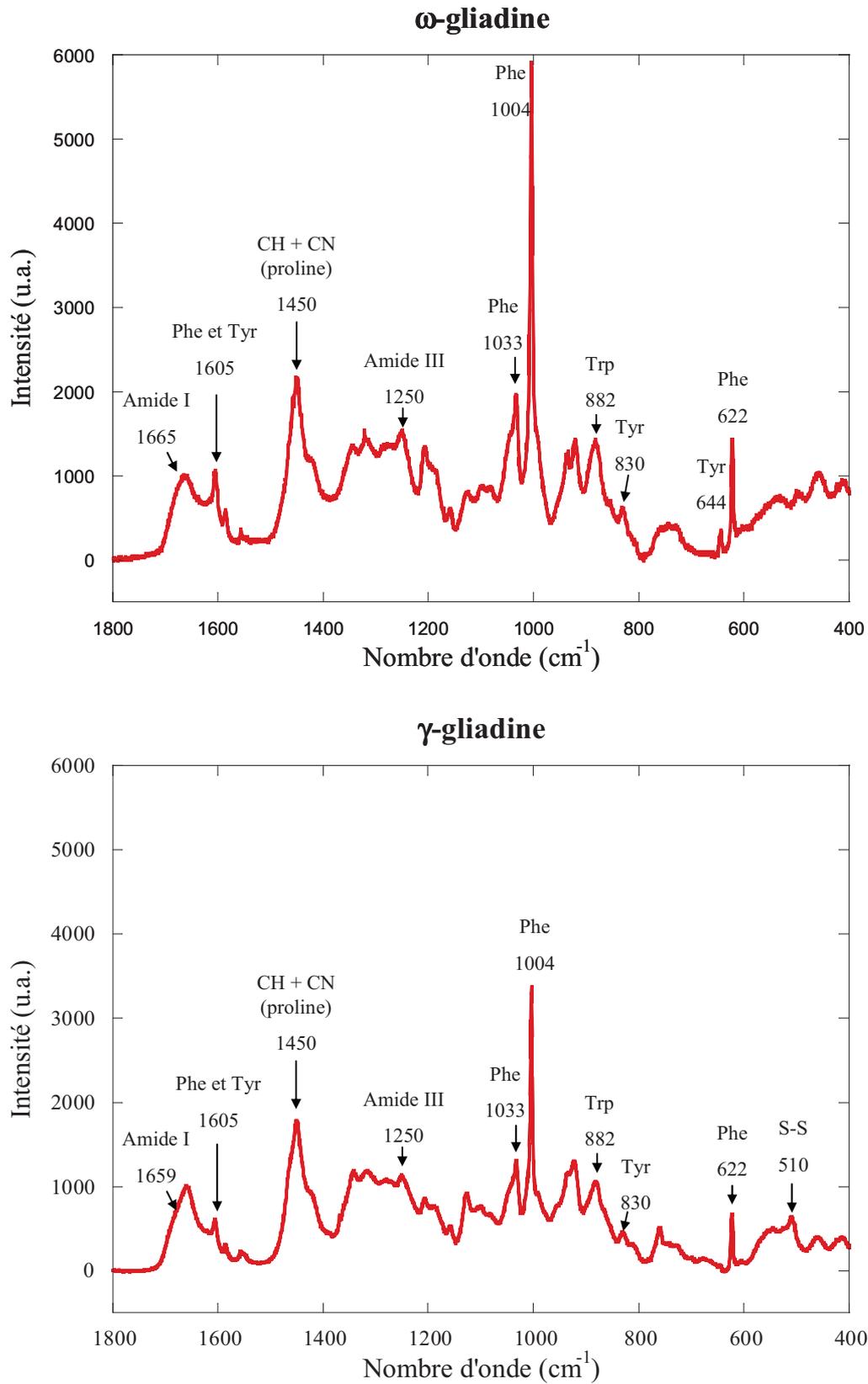


Figure 13: Spectres Raman des γ et ω -gliadines sous forme lyophilisée.

La figure 14 présente deux types de spectres Raman obtenus sur de la γ -gliadine concentrée dans un micro-canal. Ces spectres sont observés pour deux types de zones : la zone A qui semble correspondre à des domaines homogènes en volume et denses en protéines, et la zone B, moins proche de l'extrémité du canal, qui semble correspondre à des domaines où les phases denses sont adsorbées sur les surfaces de PDMS du canal.

Sur le spectre de la zone A, les bandes intenses des phénylalanines, des tryptophanes, de l'amide I, et de la bande de vibration des CH et CN sont reconnues. Une bande à 712 cm^{-1} , qui est attribuée au PDMS constituant le canal, est également identifiée. De plus, une raie intense à 1355 cm^{-1} , qui n'est pas présente dans le spectre de la protéine à l'état solide, est observée. Cette raie, attribuée au tryptophane, apparaît intense lorsque les résidus tryptophane, non exposés au solvant, changent d'environnement¹².

Sur le spectre de la zone B, beaucoup moins de raies sont observées, et les rapports d'intensités entre les différentes raies sont remarquablement différents. La variation du rapport d'intensité entre les bandes du tryptophane peut être attribuée à une variation d'intensité de la bande à 1358 cm^{-1} , qui est sensible à l'environnement de ces résidus. Cependant, les intensités des raies de la phénylalanine ne sont pas influencées par des facteurs extérieurs. Les raies à 1005 et 620 cm^{-1} correspondent à des modes de vibrations ayant des directions approximativement perpendiculaires, puisque la raie à 1005 cm^{-1} correspond à la "respiration" du cycle aromatique, alors que la raie à 620 cm^{-1} correspond à une déformation du cycle¹³. Le degré d'interaction entre le rayonnement incident et la molécule est dépendant de l'angle entre le vecteur électrique de la radiation et la forme du tenseur de polarisabilité, de même que l'intensité Raman diffusée dépend de la direction d'observation¹⁴. La variation du rapport d'intensité entre ces deux bandes peut ainsi être attribuée à un changement d'orientation moyenne de ces résidus. Les fortes intensités sont attendues pour des dipôles induits orientés parallèlement à la direction du vecteur électrique de la radiation. Le rapport d'intensité des raies de phénylalanines dans la zone A (4.6) est du même ordre que celui observé dans la protéine à l'état solide (4.3), alors que dans la zone B, le rapport est plus faible (2.8). Ces observations suggèrent que les résidus phénylalanines sont isotropes dans les zones A, et anisotropes dans les zones B. En effet une orientation préférentielle des résidus phénylalanine, avec le plan des cycles aromatiques perpendiculaires à la surface de PDMS, aurait lieu dans les zones B. La majorité des phénylalanines dans les γ -gliadines étant situé le long du domaine répété, ce domaine doit présenter une orientation partielle. De la même façon, les très faibles intensités des bandes amide I et de vibration des CH et des CN, observées sur le spectre de la zone B, peuvent être attribuées à des orientations spécifiques de ces groupes. Cela indique que les directions des liaisons C=O et des liaisons CH et CN (des prolines) sont orientées plutôt perpendiculairement à l'interface eau-PDMS. L'ensemble de ces résultats suggère une orientation spécifiques des γ -gliadines dans les zones de type B. On peut penser que cette orientation des protéines est induite par leur adsorption aux interfaces hydrophile-hydrophobe, eau-PDMS.

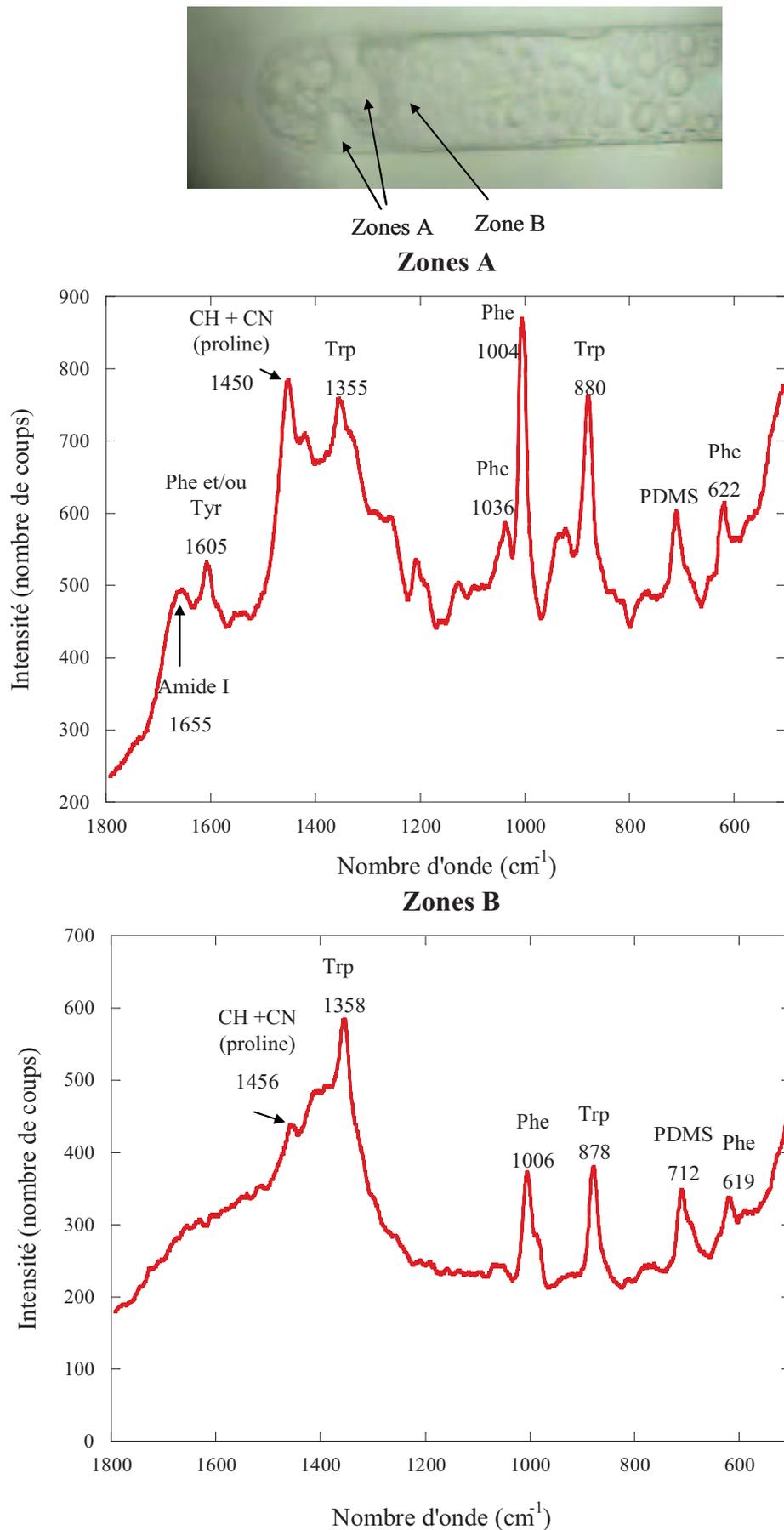


Figure 14 : Spectres Raman typiques des zones A et B définies sur le cliché de microscopie optique.

4. Bilan

L'ensemble de ces expériences préliminaires montrent les possibilités d'étude des modes d'assemblage des protéines de réserve dans un milieu aqueux. Les gliadines, couramment considérées comme insolubles dans des milieux aqueux à pH neutre, montrent une certaine capacité à se solubiliser dans ces milieux. Ce caractère partiellement soluble avait quelque fois été évoqué dans la littérature, mais peu caractérisé^{15,16}. Un pourcentage de fraction soluble constant en fonction de la concentration initiale semble indiquer qu'il y ait plusieurs sous-catégories de gliadines dans chaque fraction purifiée. Par ailleurs, l'étude des solutions diluées de gliadines, par DLS et AFM, a permis de mettre en évidence le caractère biphasique des solutions. En effet des monomères ont pu être observés en équilibre avec des agrégats protéiques gonflés d'eau, le rapport volumique entre les deux types d'objets étant variable selon le type de gliadine et la force ionique du solvant. Cet équilibre entre espèces monomériques et polymériques s'explique par la coexistence d'une phase diluée et d'une phase concentrée en protéines dans le diagramme de phases de ces gliadines, la phase dense étant sous forme de gouttelettes dispersées dans la phase diluée. Après quelques heures, ces gouttelettes apparaissent stables dans le temps, cependant une étude du vieillissement des solutions pourrait être envisagée. D'autre part, un état d'association sous forme de filaments instables, pouvant correspondre à une étape transitoire de l'assemblage des gliadines, a pu être observé par AFM sous certaines conditions, et pourrait être davantage étudié.

Ensuite, pour explorer le diagramme de phases des gliadines en solution dans l'eau, un système microfluidique permettant de concentrer les solutions diluées a été testé. Les observations microscopiques ont permis de mettre en évidence l'apparition de différentes phases en fonction de la concentration en protéines : à faible concentration, un système monophasique de solution diluée ; pour des concentrations intermédiaires un système biphasique correspondant à la coexistence de solutions diluée et concentrée ; enfin pour de très fortes concentrations une phase dense de type gel. Par microscopies optiques, à faible concentration la solution apparaît homogène et monophasique, cependant les mesures de DLS indiquent qu'il s'agit déjà d'un système bi-phasique constitué de gouttelettes de phase dense (diamètre ~ 200 nm) en équilibre avec une solution diluée de monomères. La transition de phases liquide-liquide aurait ainsi lieu à des concentrations inférieures à celles utilisées pour nos solutions diluées.

Des différences de comportement ont pu être observées entre γ - et ω -gliadines. Les ω -gliadines apparaissent plus solubles dans l'eau que les γ -gliadines, ce qui est en accord avec les mesures d'hydrophobicité estimées à partir des structures primaires. De plus, aucun domaine de coexistence des phases diluée et dense n'a pu être observé par microscopie optique dans le cas des ω -gliadines. Les grosses gouttelettes de phases denses de γ -gliadines pourraient être mieux stabilisées en raison d'un arrangement spécifique des molécules de γ -gliadines à l'interface phase diluée-phase dense. En effet, contrairement à la ω -gliadine, la γ -gliadine possède deux domaines d'hydrophobicités distincts, qui pourraient stabiliser l'interface entre les deux phases. Enfin, les propriétés interfaciales des γ -gliadines ont été mises en évidence dans les canaux de microfluidique. Une adsorption des phases denses sur les parois de PDMS a pu être observée et les études par Spectroscopie Raman confocale

semblent indiquer une orientation privilégiée des protéines à ces interfaces. Ainsi, la forte aptitude des γ -gliadines à s'adsorber aux interfaces semble importante dans les modes d'auto-assemblage de ces protéines.

C. Assemblage des γ - et ω - gliadines à l'interface air-eau.

Les études par spectroscopie Raman confocale réalisées sur des phases denses de gliadines générées par un système microfluidique suggèrent une orientation spécifique des gliadines aux interfaces hydrophile-hydrophobe. Afin de préciser cette observation, des études ont été réalisées à l'interface air-eau à l'aide d'une balance de Langmuir. Cette approche permet d'étudier l'assemblage des gliadines à une interface hydrophile-hydrophobe dans un environnement aqueux. De plus, la compression de la couche interfaciale à l'aide des barrières mobiles d'une cuve de Langmuir permet de simuler le processus d'agrégation ayant lieu *in vivo* lors de la mise en place des corpuscules protéiques. Des isothermes de compression de gliadines à l'interface air-eau ont ainsi été réalisées, et les films de gliadines ont été étudiés tout au long de la compression par microscopie à angle de Brewster et spectroscopie PM-IRRAS.

1. Essais préliminaires

Dans un premier temps, les propriétés d'adsorption à l'interface air-eau des gliadines ont été étudiées en fonction de la nature de la sous-phase. Deux types de sous-phases ont été testés : un tampon phosphate 0.05 M pH 7.2, dans lequel les gliadines sont majoritairement insolubles, ainsi que de l'acide acétique dilué (0.05 M), solvant dans lequel les gliadines sont majoritairement solubles. Des mesures de pression de surface ont été réalisées à l'aide d'une petite cuve circulaire en téflon de 5 cm de rayon et 0.3 cm de profondeur, contenant 8 ml de sous-phase. Les protéines préalablement solubilisées à 1 mg/ml dans un mélange eau-éthanol (45 : 55) ont été injectées à la surface de l'eau à l'aide d'une seringue Hamilton.

La figure 15 présente l'évolution de la pression interfaciale en fonction de la quantité de protéines injectée, pour les deux types de sous-phases et de gliadines. Les évolutions des pressions interfaciales sont beaucoup plus importantes dans le cas de la sous-phase à pH neutre, qu'avec l'acide acétique. Ainsi, l'activité de surface des gliadines apparaît bien plus importante dans le cas d'un tampon à pH neutre, et s'explique aisément par la différence de solubilité des gliadines dans ces deux solvants. De plus, pour les deux types de solvants, les γ -gliadines présentent une activité de surface plus importante que les ω -gliadines, ce résultat est également en accord avec les différences de solubilité des deux types de gliadines. Dans le cas de la sous-phase à pH neutre, l'évolution de la pression en fonction de la quantité injectée présente deux régimes : une croissance linéaire et importante dans un premier temps, puis une stabilisation de la pression interfaciale. La stabilisation de la pression interfaciale a lieu à ~ 20 mN/m pour la γ -gliadine et ~ 8 mN/m pour la ω -gliadine. Ces valeurs peuvent être considérées comme les pressions d'équilibre de surface des gliadines pour le système considéré.

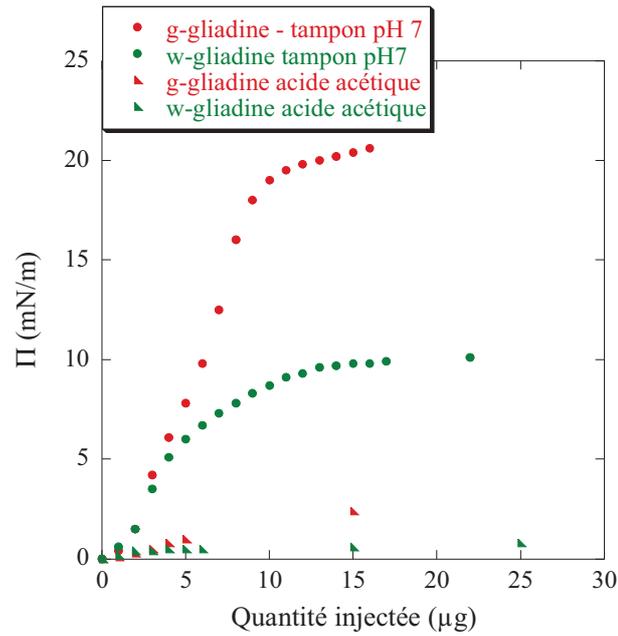


Figure 15 : Evolution de la pression interfaciale en fonction de la quantité de gliadines injectée. Effet de la nature des gliadines injectées et de la sous-phase.

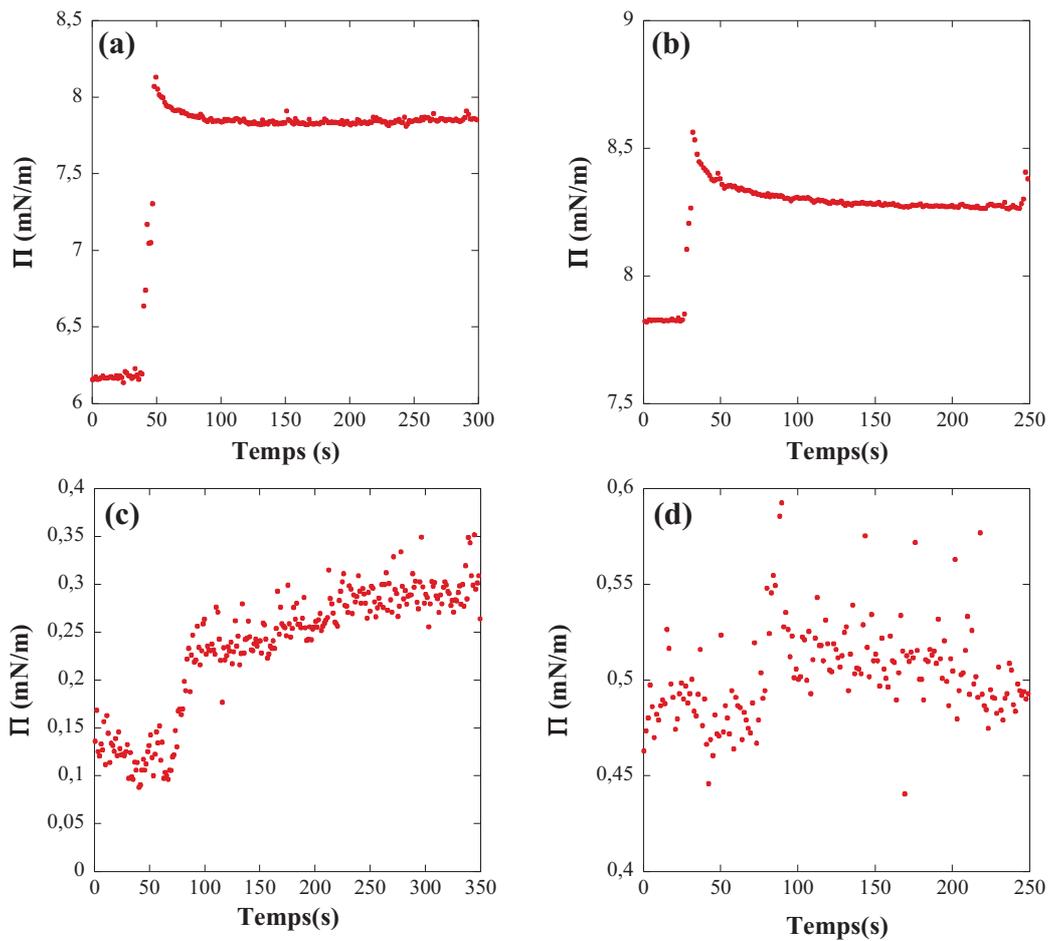


Figure 16 : Evolution de la pression interfaciale en fonction du temps après injection d'un μ l de solution de gliadines à l'interface air-eau. (a) γ -gliadine sur une sous phase tampon phosphate pH 7.2, 0.05M, (b) ω -gliadine sur une sous-phase tampon phosphate, (c) γ -gliadine sur une sous-phase acide acétique, (d) ω -gliadine sur une sous-phase acide acétique.

La figure 16 présente des évolutions typiques de pression interfaciales suite à l'injection de γ - et de ω -gliadines dans les différents types de sous-phases. Dans le cas de la sous-phase tampon à pH neutre, une augmentation de pression interfaciale brusque et intense est observée, puis la pression se stabilise rapidement suite à une faible décroissance. Dans le cas de la sous-phase acide acétique, l'augmentation de pression est assez brusque mais peu intense, et se stabilise lentement par une faible augmentation de pression. Ces comportements sont également expliqués par les différences de solubilité des gliadines dans ces deux solvants.

Pour la suite des études, une sous-phase de tampon phosphate 0.05 M, pH 7.2 a été utilisée afin de se rapprocher davantage du contexte biologique.

2. Isothermes de compression et microscopie à angle de Brewster

Des isothermes de compression des gliadines ont été réalisées à l'interface air-eau à l'aide d'une cuve de Langmuir en Téflon munie d'une barrière mobile pilotée par un logiciel Nima. La sous-phase était constituée d'un tampon phosphate pH 7.2, 0.05 M, préalablement passé sur un filtre en microfibrilles de verre (GF/F Watman). Les gliadines préalablement solubilisées dans un mélange eau-éthanol (45 : 55) et filtrées sur 0.45 μm , étaient injectées à l'interface air-eau à l'aide d'une seringue Hamilton. Après un temps de mise à l'équilibre de 10 minutes environ, les films de protéines ont été comprimés avec une vitesse de 10 $\text{cm}^2/\text{minute}$, ce qui correspond à 83 $\text{\AA}\cdot\text{molécule}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la γ -gliadine et 50 $\text{\AA}\cdot\text{molécule}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la ω -gliadine. En parallèle de la compression, les films interfaciaux ont pu être observés par microscopie à angle de Brewster.

Juste après l'injection, les gliadines forment des films homogènes et stables, comme illustré sur les figures 17 (a) et (b). L'uniformité du niveau de gris indique que les films ont des épaisseurs uniformes sans défaut détectable à la résolution du microscope. Lors de la compression, les films sont optiquement uniformes, et apparaissent de plus en plus lumineux. Ces changements de réflectance peuvent être dus à une variation d'indice optique du film, mais surtout à des variations d'épaisseur. La mobilité des films semble décroître avec la compression, et indique des films protéiques sous forme de gel. A très hauts taux de compression, des bandes linéaires peuvent être observées (figure 17 (c) et (d)). Ces bandes ont des largeurs micrométriques et présentent des variations d'épaisseur de quelques nanomètres. Ce phénomène peut être attribué à un flambage des films protéiques^{17,18}.

En considérant un indice de réfraction de 1.47 pour les films interfaciaux de gliadines, les évolutions d'épaisseur des films en fonction des aires moléculaires ont été tracées sur la figure 18. Pour les deux types de gliadines, les épaisseurs de films, évoluent de 1.5 à 9 nm. Cette gamme d'épaisseur est en accord avec une monocouche de protéines étant donné les tailles moléculaires des gliadines. Ces valeurs d'épaisseurs sont approximatives, cependant il est possible d'ajuster l'évolution des épaisseurs par une loi de puissance :

$$e=C.A^b$$

avec e l'épaisseur du film protéique, A l'aire moléculaire, C une constante et b l'exposant de la loi puissance.

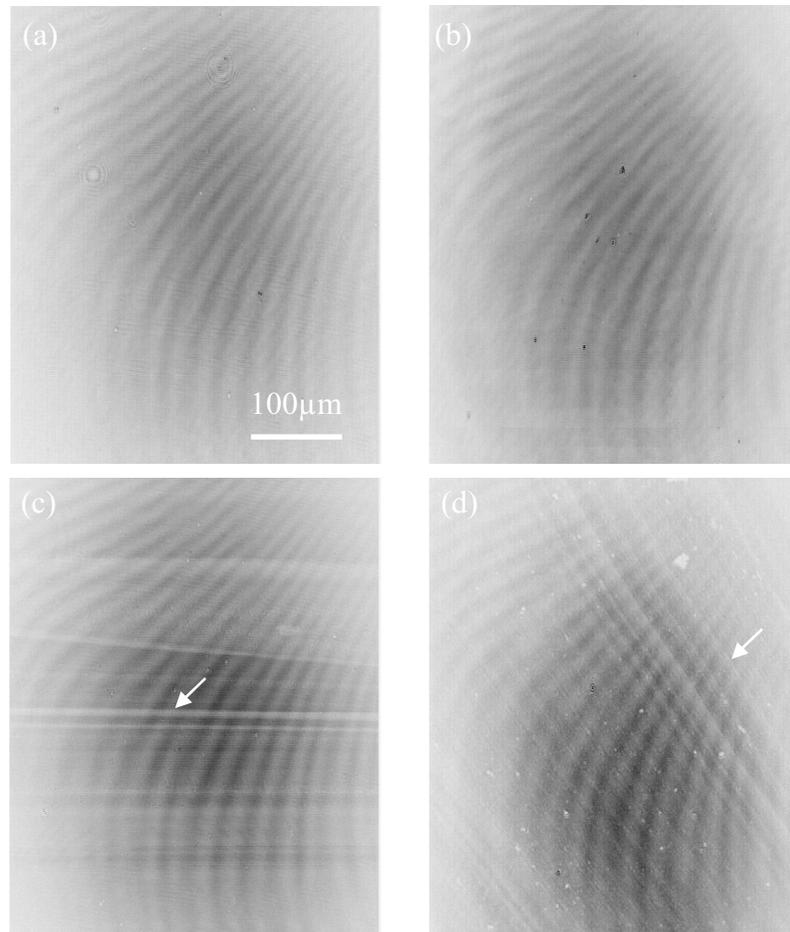


Figure 17 : Clichés de Microscopie à Angle de Brewster de gliadines à l'interface air-water (a) γ -gliadines, $\Pi = 6 \text{ mN/m}$, $TE = 1/50 \text{ s}$ (b) ω -gliadines $\Pi = 6.7 \text{ mN/m}$, $TE = 1/50 \text{ s}$ (c) γ -gliadines $\Pi = 29 \text{ mN/m}$, $TE = 1/1000 \text{ s}$ (d) ω -gliadines $\Pi = 15 \text{ mN/m}$, $TE = 1/2000 \text{ s}$. (Π : pression interfaciale, TE : Temps d'exposition).

L'évolution des épaisseurs du film de γ -gliadines est bien ajustée par une loi en puissance avec un exposant $b = -1$ (figure 18 (a)). Cela signifie que

$$e.A=V=C$$

Le volume moléculaire (V) peut donc être considéré constant tout au long de la compression. Cette invariance du volume moléculaire indique une constance du niveau d'hydratation du film, et une préservation de la majeure partie des molécules de gliadines à l'interface air-eau, si on considère un indice optique constant. Le volume moléculaire mesuré est de $\sim 60 \text{ nm}^3/\text{molécule}$. Cette valeur est faible comparée à la valeur précédemment obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles sur des γ -gliadines solubilisées dans un bon solvant⁸ ($\gg 200 \text{ nm}^3/\text{molécule}$). Cette différence peut être attribuée aux différentes conformations adoptées par la γ -gliadine dans les différentes conditions de solvant. Il a été précédemment observé que les gliadines avaient une structure plus étendue dans les bons solvants¹⁹. De plus,

le volume moléculaire des γ -gliadines mesuré à l'interface air-eau est en accord avec le volume calculé pour des protéines solubles repliées de même masse molaire²⁰.

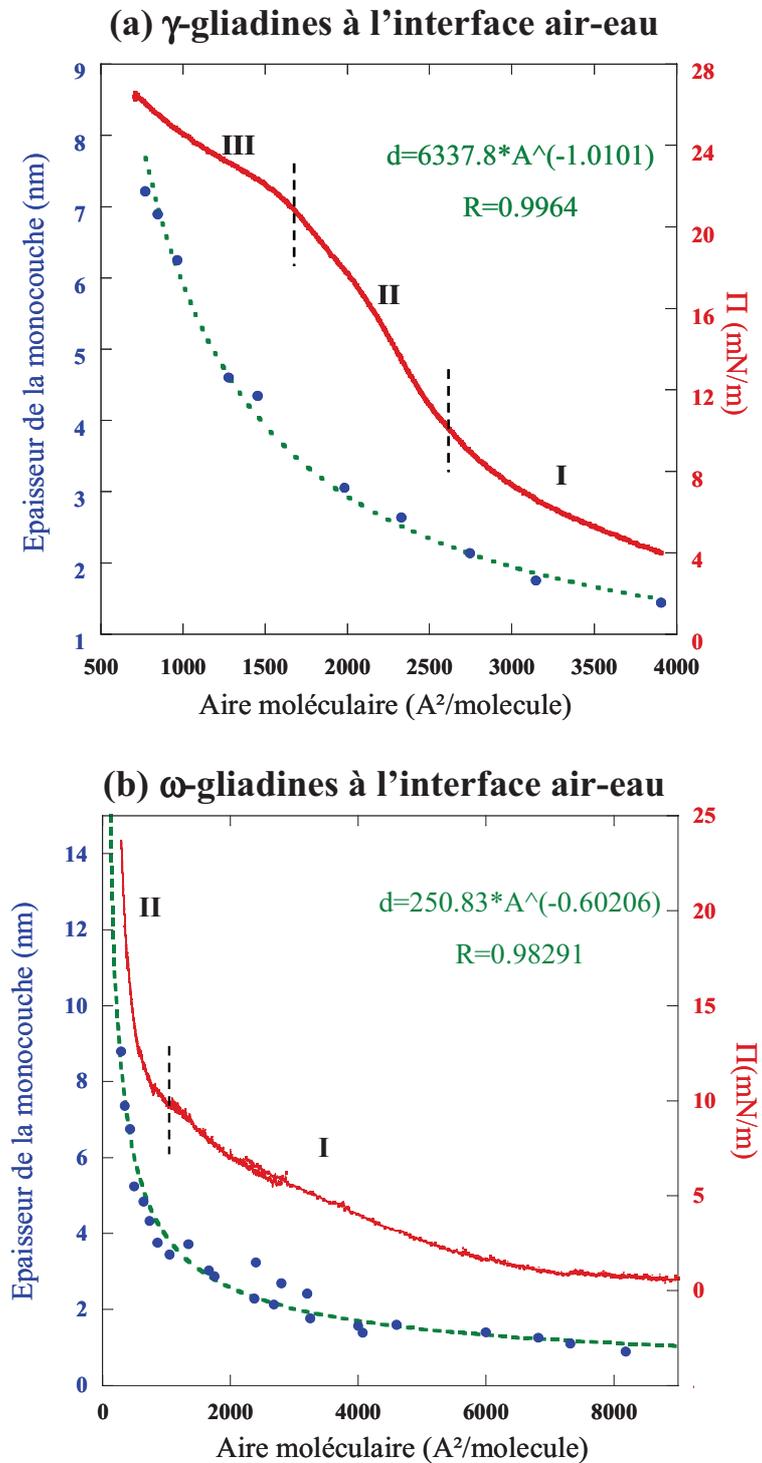


Figure 18 : Isothermes de compression $\Pi=f(A)$ (—) et épaisseurs des films interfaciaux : Points expérimentaux (•) et ajustement par une loi en puissance (---)
(a) γ -gliadines, (b) ω -gliadines.

Les données expérimentales d'épaisseur des ω -gliadines en fonction de l'aire moléculaire sont bien ajustées par une loi en puissance avec un exposant $b=-0.6$ (figure 18 (b)). Cela signifie que le volume du film interfacial évolue en fonction de l'aire de la façon suivante :

$$V=e.A=C.A^{0.4}$$

Ainsi, le volume du film diminue lorsque l'aire décroît, si on suppose l'indice de réfraction du film constant. Cette évolution peut être attribuée à une perte de ω -gliadines dans la sous-phase ou à une densification de la couche interfaciale.

Les isothermes de compressions des γ - et ω -gliadines sont aussi présentées dans la figure 18. Ils présentent des changements de pente qui définissent trois régimes dans le cas de la γ -gliadine, et deux régimes dans le cas de la ω -gliadine. Aux hautes aires moléculaires, dans le premier régime, les pentes sont faibles, puis dans un second régime, les pentes augmentent. Ce comportement fait penser à des transitions de phase 2D de molécules simples, lors du passage liquide expansé – liquide condensé. Dans le troisième régime de l'isotherme de γ -gliadine, la pente est moins grande que dans le second régime. Selon les mesures d'épaisseur il n'y a pas de perte de protéines à l'interface, donc cette diminution de pente de l'isotherme peut être attribuée à une accumulation des protéines dans l'épaisseur. Par ailleurs, pour les deux types de gliadines, les pressions obtenues au début des derniers régimes correspondent aux pressions d'équilibre déterminées précédemment (chapitre 3 C-1). Cela suggère que les derniers régimes sont instables. Cette instabilité est confirmée par l'observation d'une diminution de la pression interfaciale lorsque le mouvement de la barrière de compression est stoppé. Par ailleurs, cette instabilité apparaît être corrélée à l'apparition des bandes linéaires observées en microscopie (figure 18 (c), (d)).

3. Mesures PM-IRRAS

a) FTIR (ATR) de γ - et ω -gliadines à l'état solide.

Dans la littérature, les spectres infrarouge des gliadines ont été présentés, mais souvent, exclusivement dans la région des bandes amide I et II^{21,1,4}. La figure 19 présente les spectres infrarouges des γ - et ω -gliadines à l'état solide dans un domaine de longueurs d'onde de 1800 à 1300 cm^{-1} , où peuvent être observées les bandes amide I ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$), II ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$), ainsi qu'une bande à $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$. Cette dernière bande est généralement attribuée aux vibrations des liaisons CH. Cependant, en considérant le haut taux de prolines dans les gliadines (17.5% dans la γ -gliadine), cette bande peut être attribuée aux vibrations de CN des résidus proline. En effet, quelques auteurs^{22,23,24} ont corrigé l'attribution de cette bande intense, également observée sur les spectres infrarouges de la polyproline. De plus, des calculs *ab initio* réalisés par Dominique Cavagnat (ISM – Bordeaux I) ont permis de confirmer l'attribution de cette bande. Nous pouvons également remarquer que l'aire intégrée de cette bande, normalisée par celle de la bande amide I, apparaît approximativement proportionnelle à la quantité de prolines dans chaque fraction de gliadine ($\sim 17.5 \%$ de prolines dans la γ -gliadine²⁵, et 29% dans la ω -gliadine²⁶). Par ailleurs, les prolines contribuent également à la variation d'intensité de la bande amide II puisque cet acide aminé n'a pas de mode amide II.

Comme précédemment observé, les bandes amides des γ -gliadines sont dominées par la contribution des hélices α (1651 cm^{-1} et 1540 cm^{-1}), alors que les bandes amides des ω -gliadines sont décalées vers les basses fréquences à cause des feuillets β .

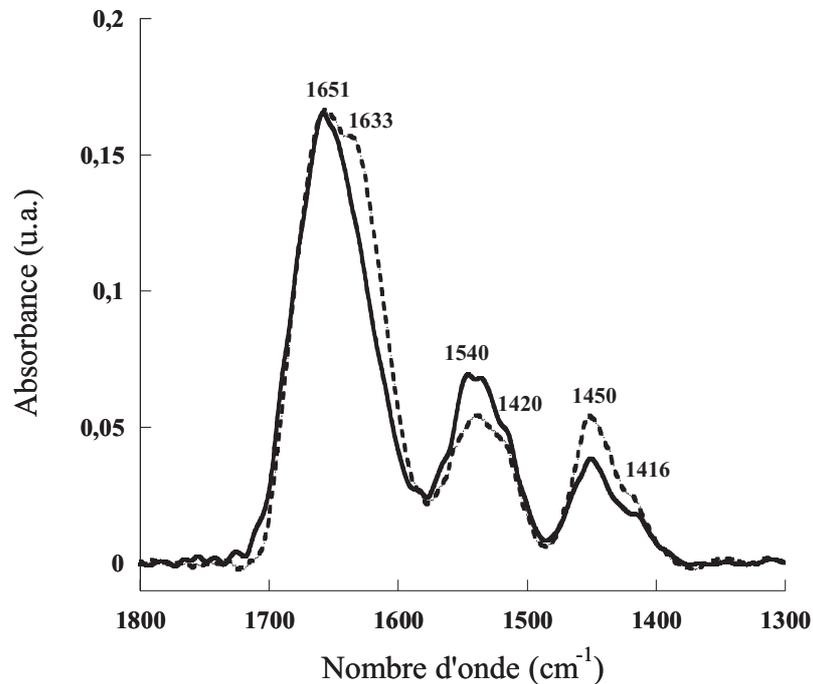


Figure 19 : Spectres d'absorption infrarouge de la ω -gliadine (---) et de la γ -gliadine (—)

Une contribution significative à 1651 cm^{-1} peut être également observée sur le spectre de la ω -gliadine. Cette contribution a été interprétée différemment selon les auteurs. En effet, Pezolet *et al*¹ ont attribué cette bande de façon classique aux hélices α , mais d'autres auteurs ont réfuté cette hypothèse car le signal des hélices α n'a pas été détecté par dichroïsme circulaire²⁷, et la très grande proportion de prolines dans les ω -gliadines devrait défavoriser la formation des hélices. Ainsi, Wellner *et al*⁴ ont attribué cette contribution à la grande proportion de résidus glutamine présente dans les ω -gliadines. Cependant, la formation d'hélices α peut être considérée car les glutamines ont une bonne capacité à former des hélices²⁸, et il a été suggéré que les prolines puissent être initiatrices d'hélices, plutôt que destructrices de ces dernières²⁹. De petites hélices, formées entre les résidus de prolines, peuvent ainsi être suggérées. De grandes boucles, connectant les structures β peuvent aussi être proposées^{30,31}. Cette dernière hypothèse est renforcée par une étude de dynamique moléculaire sur un octapeptide du domaine répété de la ω -gliadine, qui présente un repliement original du peptide contenant des feuillets et des coudes β ³².

b) Spectres PM-IRRAS

Les films de gliadines à l'interface air-eau ont été caractérisés tout au long de la compression par spectroscopie PM-IRRAS. Afin de faciliter l'interprétation des spectres, les spectres ont été traités de façon à ce qu'ils aient des intensités indépendantes de la concentration due à la réduction d'aire interfaciale, et ainsi observer les pertes de matière à l'interface. Pour cela, chaque spectre a été multiplié par l'aire de surface disponible pour le film protéique lors de

l'acquisition, car l'intensité des bandes d'absorption en PM-IRRAS (I) est proportionnelle à la concentration de surface (N/A) et à l'orientation des moments de transition $f(\alpha)$:

$$I \propto N/A * f(\alpha)$$

Avec N le nombre de molécules et A l'aire surfacique.

La figure 20 présente un spectre PM-IRRAS typique de gliadines à l'interface air-eau. Ces spectres présentent les bandes amides I et II, la bande de vibration de CN des prolines, et quelques bandes de faible intensité dans la région 1000-1300 cm^{-1} . Dans cette région, une bande positive à 1067 cm^{-1} , une bande négative à 1290 cm^{-1} et une très faible bande positive à 1240 cm^{-1} peuvent être indentifiées. Ces bandes sont attribuées aux sels phosphates de la sous-phase : les bandes à 1240 et 1067 cm^{-1} sont associés aux vibrations symétriques et antisymétriques des PO_2^- , alors que la bande à 1090 cm^{-1} est associée aux vibrations antisymétriques des PO_3^{2-} . Comme les spectres de gliadines sont normalisés par le spectre de la sous-phase, ces bandes indiquent une augmentation du ratio $\text{PO}_2^-/\text{PO}_3^{2-}$ à l'interface par rapport au système sans protéines. Ainsi, il y aurait une acidification du pH interfacial lors de l'addition de gliadines.

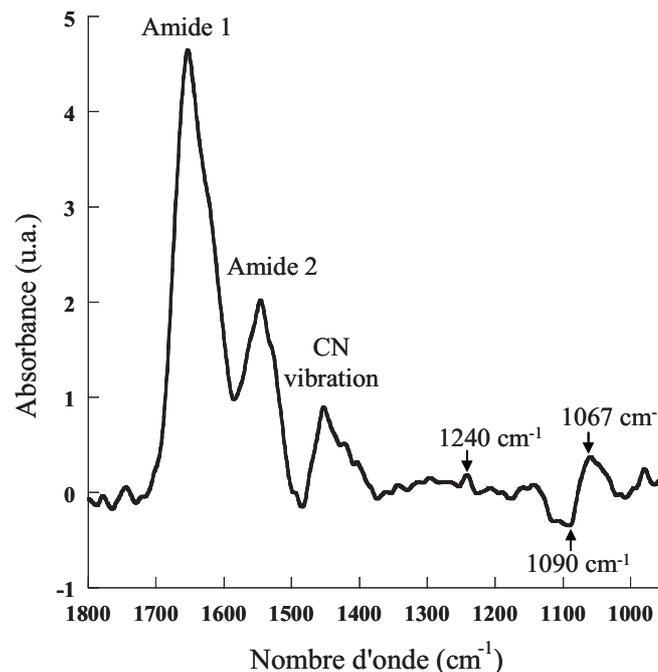


Figure 20 : Spectre PM-IRRAS typique de gliadines à l'interface air-eau.

(1) γ gliadines

La figure 21 présente les spectres PM-IRRAS du film de γ -gliadines à l'interface air-eau tout au long de la compression, ainsi que l'isotherme de compression associée. Ces spectres sont le résultat de deux expériences (représentées avec deux niveaux de gris sur l'isotherme) réalisées avec différentes quantités de gliadines injectées à l'interface air-eau, afin de couvrir une grande gamme d'aires moléculaires.

Dans la première expérience, dans le régime des hautes aires moléculaires (spectres 1 et 2), la bande amide I est décomposée en deux bandes principales : l'une à 1653 cm^{-1} , attribuée aux

hélices α et l'autre à 1669 cm^{-1} attribuée aux coudes β . De plus, des contributions à 1685 et 1619 cm^{-1} attribuées à des feuillets β anti-parallèles, et une contribution à 1635 cm^{-1} attribuée aux coudes β parallèles peuvent être observées. La grande proportion de coudes β observée est caractéristique d'un état peu replié des protéines³³. En comprimant la couche interfaciale (spectres 2-4), la contribution des hélices α à 1653 cm^{-1} devient plus importante. Les molécules de γ -gliadines, initialement peu structurées à l'interface air-eau doivent se replier lors de la compression. Ce comportement a été préalablement observé avec d'autres protéines à l'interface air-eau³⁴.

Les deuxième et troisième régimes de l'isotherme de compression (spectres 4-9), ont été obtenus lors de la deuxième expérience, dans laquelle la quantité initiale de protéines injectées à l'interface, était plus importante. Le dernier spectre de la première expérience (spectre 4), et le premier spectre de la seconde expérience sont raisonnablement corrélés, mais un décalage en fréquence de la contribution des hélices α est observé (depuis 1653 à 1658 cm^{-1}). Selon Novskava et Chirgadze³⁵, la fréquence des hélices α augmente lorsque le nombre de résidus impliqués dans l'hélice décroît. Ainsi, les hélices α apparaissent plus longues à la fin de la première expérience, qu'au début de la deuxième. Cela peut être expliqué par le fait que dans la première expérience, les gliadines sont progressivement repliées avec la compression, alors que dans la seconde expérience, le repliement des protéines en hélices est gêné par la grande concentration de protéines directement injectée à l'interface air-eau. Pendant les second et troisième régimes de l'isotherme de compression, il n'y a pas de modifications majeures des spectres de γ -gliadine à l'interface air-eau. Cependant un décalage progressif du maximum de la bande amide I lors de la compression (de 1658 à 1655 cm^{-1}) peut être observé et attribué à un petit allongement des hélices α . De plus, entre 2500 et $1500\text{ Å}^2/\text{molécule}$ (spectres 4-6), on peut noter l'apparition et la croissance de bandes à 1645 et 1628 cm^{-1} correspondant respectivement aux structures désordonnées et aux feuillets β . La formation de feuillets β doit être le résultat d'interactions intermoléculaires, alors que l'allongement des hélices est attribué à la structuration de la γ -gliadine en réponse au manque de place à l'interface. Pézolet *et al.* ont montré que les protéines du gluten dans un état pâteux, contenaient plus de feuillets β intra- et inter-moléculaires, et moins de coudes β et d'hélices α , qu'en solution dans de l'acide acétique où les gliadines sont partiellement dépliées. A de plus faibles aires moléculaires, entre 1500 et $400\text{ Å}^2/\text{molécule}$, l'isotherme de compression est modifiée lors de l'arrêt de la barrière mobile. Pendant l'acquisition des spectres, nous pouvons observer une diminution de la pression interfaciale, due à la relaxation du film protéique. Dans le dernier régime de l'isotherme de compression (spectres 7-9), les structures secondaires apparaissent inchangées. De plus, les bandes de vibration des CN (1450 cm^{-1}) normalisées ont des aires à peu près constantes. Contrairement aux bandes amides qui peuvent avoir des aires modifiées par les orientations des structures secondaires, les groupes CN ont peu de chance d'être orientés, la vibration d'élongation des CN sera donc proportionnelle à la concentration de gliadine à l'interface. Ainsi, la concentration interfaciale de gliadines, normalisée par l'aire moléculaire, apparaît constante. Cela confirme le fait que les γ -gliadines sont totalement maintenues à l'interface air-eau, quel que soit le niveau de compression.

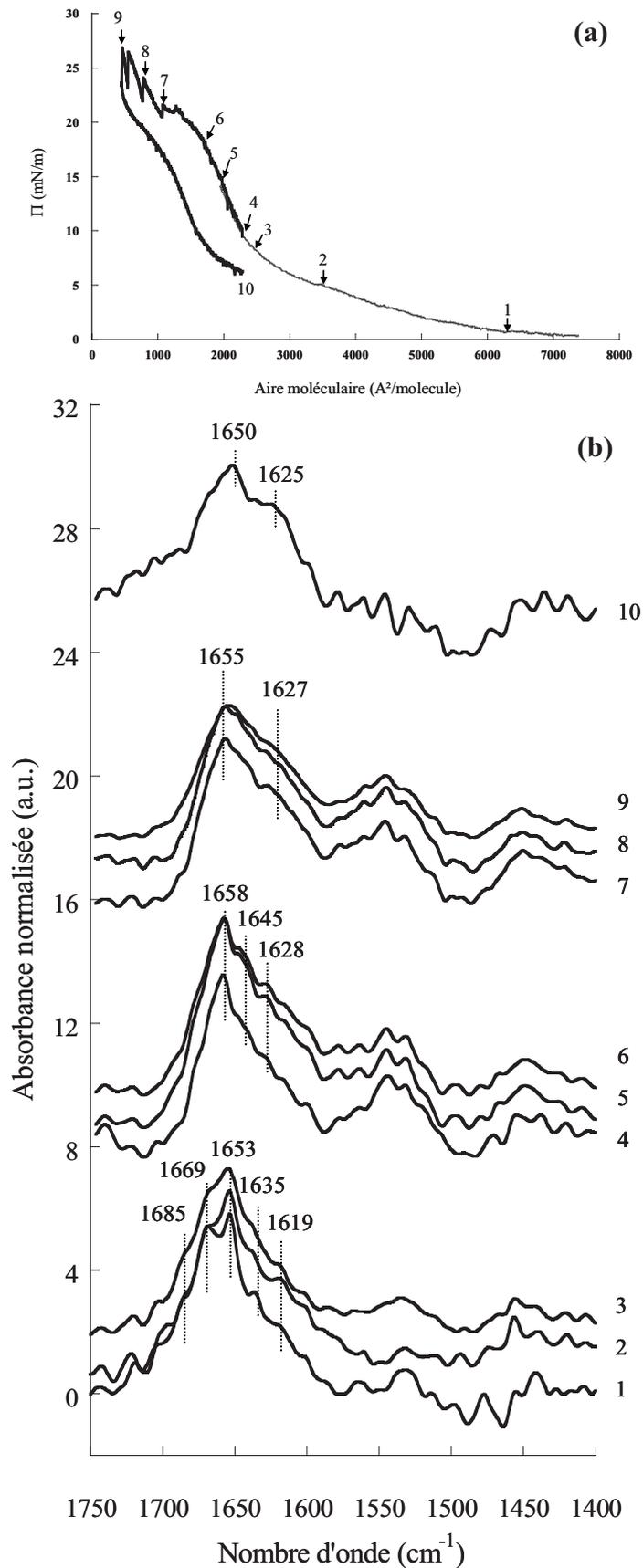


Figure 21 : Spectres PM-IRRAS de γ gliadines à l'interface air-eau. (a) Isotherme de compression $\Pi=f(A)$ pour la localisation des acquisitions PM-IRRAS (b) Spectres PM-IRRAS rassemblés selon les trois régimes de l'isotherme.

La décompression du film de gliadines a été réalisée pendant la deuxième expérience. Un comportement d'hystérésis est observé sur l'isotherme de compression, et peut être attribué à une lente relaxation du film interfacial. Le spectre 10 montre qu'après décompression, le film interfacial ne retrouve pas sa structure initiale. La bande amide I est caractérisée par d'importantes contributions à 1665, 1650 et 1625 cm^{-1} , attribuées respectivement aux coudes β , aux longues hélices α , et aux feuilletts β . Il y a une très faible contribution des structures désordonnées (1640 cm^{-1}). Ainsi, seules les structures secondaires stabilisées par des liaisons hydrogènes sont maintenues après décompression.

Par ailleurs, des informations concernant l'orientation des structures secondaires peuvent être obtenues en utilisant les rapports d'intensité entre amide I et amide II (I_{AI} / I_{AII}). En effet, il a été montré, par des simulations, que les hélices α présentaient différents spectres PM-IRRAS selon leur orientation par rapport à l'interface³⁶. La figure 22 présente ces spectres pour différents angles θ entre la normale à l'interface et l'axe principal des hélices. Ainsi, lorsque l'hélice est parallèle à l'interface ($\theta = 90^\circ$), nous pouvons observer une bande amide I positive et intense, et une bande amide II positive et de faible intensité, alors que lorsque l'hélice est perpendiculaire à l'interface ($\theta = 0^\circ$), on peut observer une bande amide I négative et une bande amide II positive et intense.

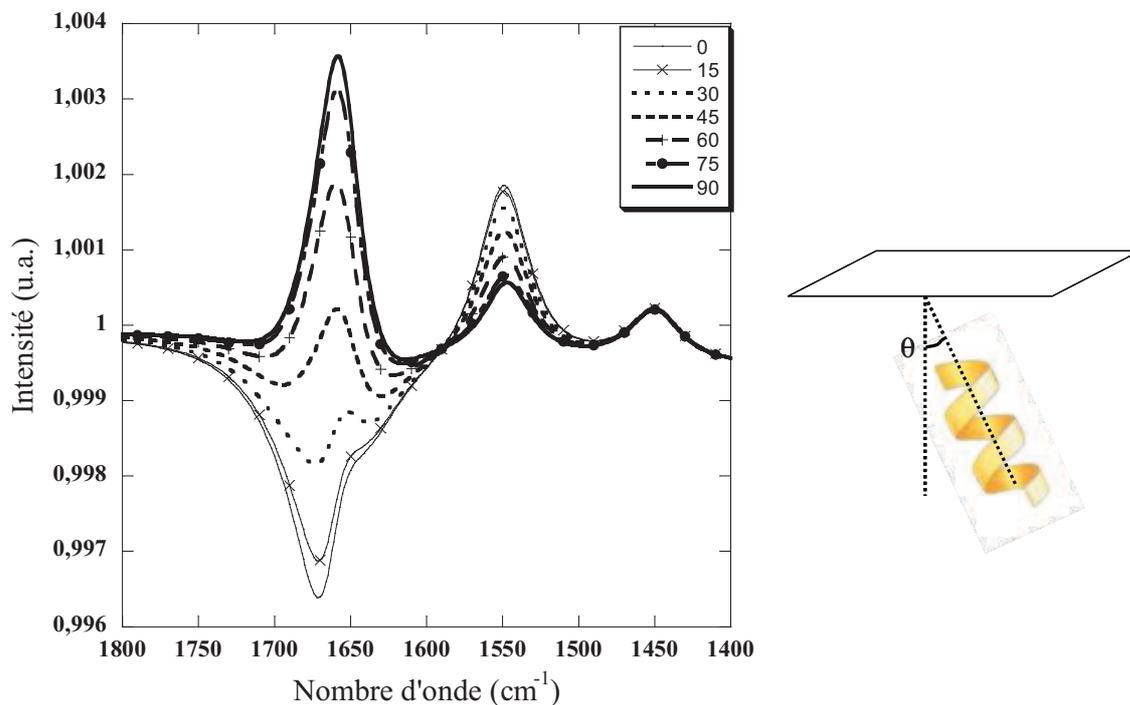


Figure 22 : Simulation de spectres PM-IRRAS d'hélices α orientées d'un angle θ par rapport à la normale de l'interface.

A gauche les spectres, à droite un schéma de représentation de l'angle θ .

Les spectres PM-IRRAS de γ -gliadines à l'interface air-eau sont dominés par la contribution des hélices α . De plus, les coudes β qui présentent une forte contribution aux grandes aires moléculaires, sont de petites structures qui ne présentent pas de propriétés d'orientation

massives. Ainsi on peut considérer que les évolutions des rapports I_{AI} / I_{AII} observées sont principalement dues aux orientations des hélices α . Aux très hautes aires moléculaires (spectres 1-2), les bandes amides II ont de très faibles intensités alors que les bandes amide I sont intenses. Ce fort rapport I_{AI} / I_{AII} peut être attribué à l'orientation préférentielle des hélices parallèlement à l'interface air-eau. Ensuite, dans le premier régime de l'isotherme, le rapport I_{AI} / I_{AII} décroît de 7 à 4.7. Selon les simulations présentées, cette évolution serait due à un léger redressement des hélices de 90 à 75° par rapport à l'interface. Enfin, dans les deuxième et troisième régimes, aucun changement majeur d'orientation des structures n'est observé puisque le rapport I_{AI} / I_{AII} est constant.

(2) ω -gliadines

La figure 23 présente les spectres PM-IRRAS des films de ω -gliadines à l'interface air-eau tout au long de la compression, ainsi que l'isotherme de compression associée. Cette figure est le résultat de trois expériences représentées sur l'isotherme par les différents niveaux de gris (figure 23 a).

Aux grandes aires moléculaires (spectre 1-2), les bandes amides ont bruitées et perturbées par une bande négative entre 1550 et 1650 cm^{-1} . Cela est attribué à la très faible concentration en protéines et à la perturbation de l'eau interfaciale par les protéines hydratées, combiné d'un effet optique^{37,38,39}. Cet effet optique est attribué à la bande d'absorption de l'eau, centrée approximativement à 1640 cm^{-1} . La position de cette bande correspond à la gamme de longueurs d'ondes où les spectres PM-IRRAS bruts présentent un changement abrupt caractérisé par une bande positive suivie immédiatement d'une bande négative. Ce comportement est dû à une variation brusque de l'indice de réfraction de l'eau dans cette gamme de fréquences. Sur les spectres 2 et 3, la bande amide I présente des contributions autour de 1665 et 1620 cm^{-1} qui peuvent être attribuées à des coudes β dans l'eau⁴⁰, et une contribution à 1630 cm^{-1} attribuée aux feuilletts β . L'augmentation de la contribution à 1652 cm^{-1} représentée dans le spectre 4 peut être attribuée aux glutamines et aux hélices α , ou à de larges boucles. L'évolution des spectres de ω -gliadines pendant le premier régime de l'isotherme (spectres 1-4) montre que les protéines deviennent plus structurées avec la compression, soit en hélices α et feuilletts β , soit en larges boucles connectant les structures β . Ainsi, lors du premier régime de compression, les ω -gliadines seraient initialement peu repliées à l'interface (car il y a beaucoup de coudes β), puis se replieraient avec la compression.

Dans le deuxième régime de l'isotherme (spectres 5-7), les spectres PM-IRRAS présentent des bandes amide I de plus en plus dominées par des contributions à basses fréquences (dans la gamme 1620-1630 cm^{-1}), attribuées aux feuilletts β . Parallèlement, les intensités des bandes de vibration des CN diminuent de façon significative. Cela confirme que des molécules de ω -gliadines plongent dans la sous-phase, comme précédemment déduit de l'évolution de l'épaisseur du film interfacial.

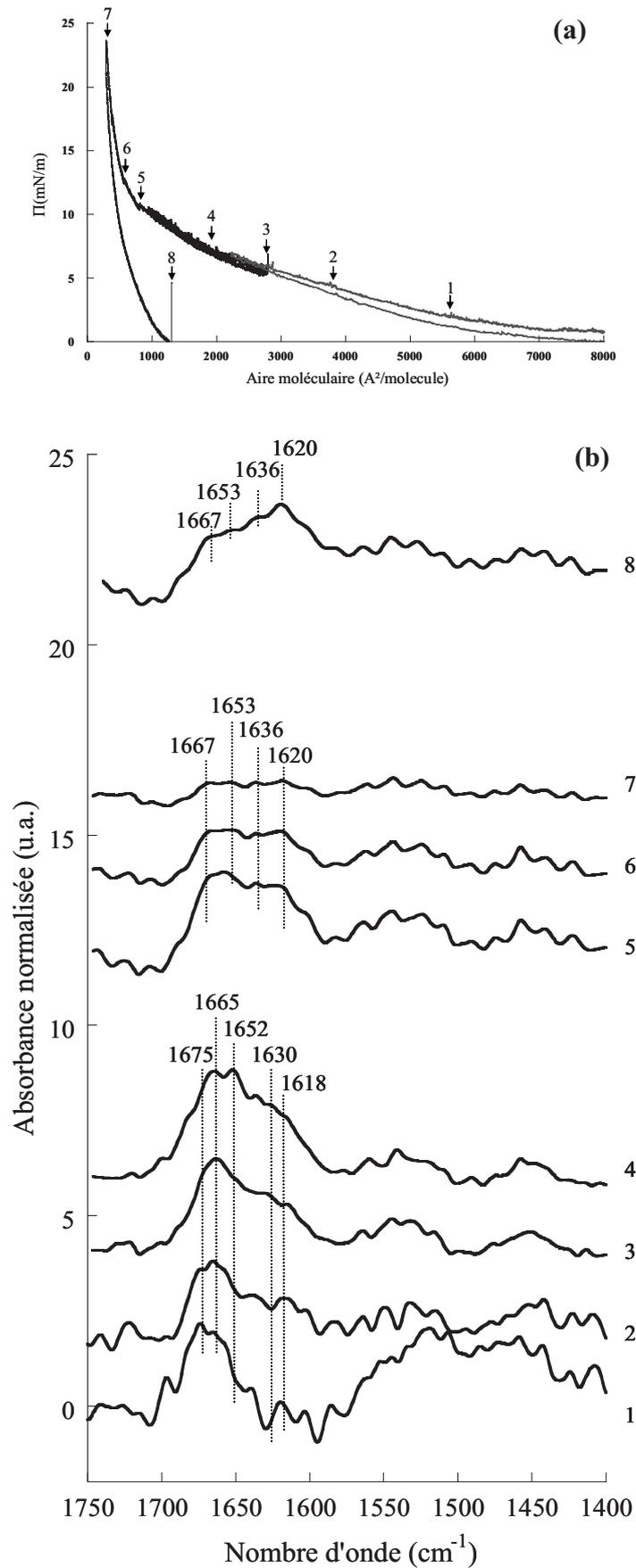


Figure 23 : Spectres PM-IRRAS des ω -gliadines à l'interface air-eau. (a) Isotherme de compression $\Pi=f(A)$ pour la localisation des acquisitions PM-IRRAS (b) Spectres PM-IRRAS rassemblés selon les deux régimes de l'isotherme.

Lors de la troisième expérience nous avons suivi la décompression du film. Dans ces conditions, nous pouvons observer une rapide chute de la pression de surface à zéro, lorsque l'aire de la cuve augmente. Cela confirme qu'une partie des ω -gliadines plonge lorsqu'on atteint des pressions de surface importantes. Le spectre PM-IRRAS acquis une heure après la fin de la décompression (spectre 8) présente un signal de protéine. Bien que le signal soit bruité, la forme de la bande amide I semble très différente de celles des spectres acquis avant décompression. Les ω -gliadines ne retrouvent pas leur structure initiale, le signal de la bande amide I étant dominé par des feuillets β parallèles et antiparallèles (respectivement 1636 et 1620 cm^{-1}). Des contributions moins importantes d'hélices (1653 cm^{-1}) et de coudes (1667 cm^{-1}) sont également observées. Ainsi, la majorité des structures organisées sont maintenues après décompression, comme dans le cas de la γ -gliadine.

c) Simulations

Afin d'appuyer les interprétations des résultats de PM-IRRAS, quelques spectres expérimentaux ont été comparés à des combinaisons de spectres simulés des principales structures secondaires : hélices α , feuillets β , coudes β et structures désordonnées. Ces spectres sont présentés dans les figures 22 et 25.

Tout comme les hélices α , les feuillets β présentent différents spectres selon leur orientation par rapport à l'interface⁴¹. Les feuillets β ont deux moments de transition pour l'amide I : l'amide I' positionnée à 1685 cm^{-1} qui est orientée le long de la chaîne peptidique, et l'amide I à 1625 cm^{-1} qui est orientée selon les liaisons hydrogènes inter chaînes, perpendiculairement à l'amide I' (cf figure 24). En volume, le ratio $I_{AI'}/I_{AI} \sim 10$. A l'interface air-eau, ce ratio évolue selon l'orientation des feuillets par rapport à l'interface, orientation décrite par deux angles : θ , l'angle entre la direction de la chaîne peptidique principale et le plan de l'interface, et ψ , l'angle entre la direction des liaisons hydrogènes et le plan de l'interface.

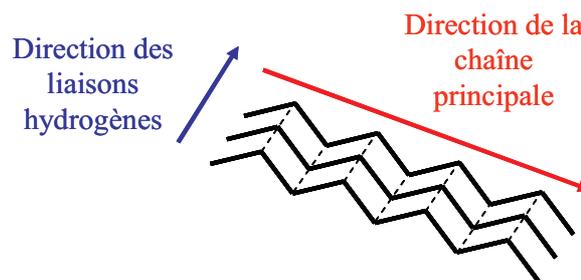


Figure 24 : Représentation schématique d'un feuillet β et des directions utilisées pour déterminer son orientation par rapport à l'interface.

Trois principales orientations des feuillets β peuvent être distinguées :

- A plat sur l'interface ($\theta = 0^\circ$, $\psi = 0^\circ$). Cette orientation donne une bande amide I' positive de faible intensité (1685 cm^{-1}), et une bande amide I positive de forte intensité (1625 cm^{-1})
- Perpendiculaire à l'interface, avec les chaînes peptidiques parallèles à l'interface ($\theta = 0^\circ$, $\psi = 90^\circ$). Cette orientation donne une bande amide I' positive et une bande amide I négative et intense.

- Perpendiculaire à l'interface, avec les chaînes peptidiques perpendiculaires à l'interface ($\theta = 90^\circ$, $\psi = 0^\circ$). Cette orientation donne une bande amide I' négative et une bande amide I positive et intense.

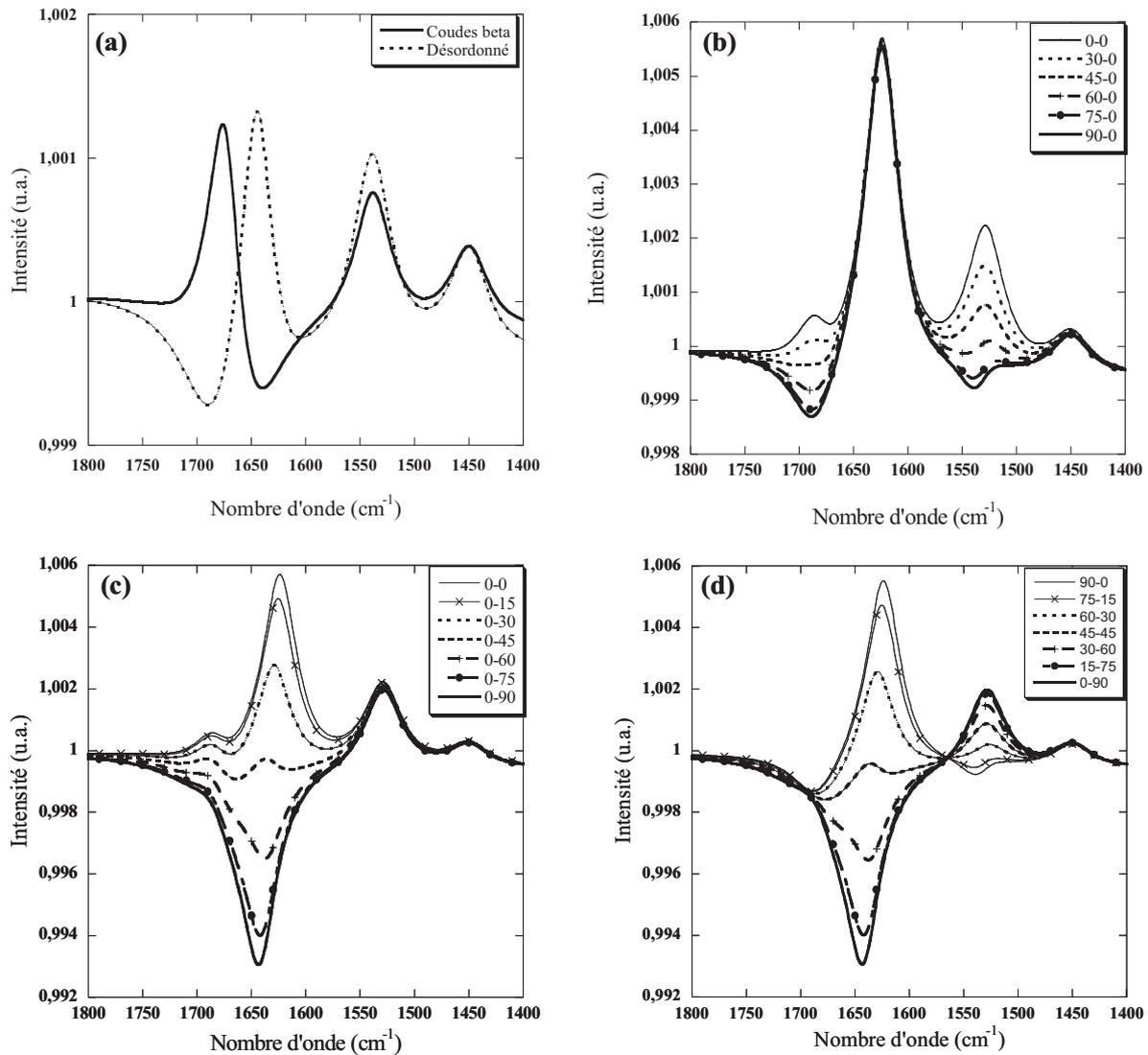


Figure 25 : Simulations de spectres PMIRRAS de coudes β et structures désordonnées (a) puis de feuillets β avec différentes orientations par rapport à l'interface : (b) $0 < \theta < 90^\circ$, $\psi = 0^\circ$, (c) $\theta = 0^\circ$, $0 < \psi < 90^\circ$, (d) $0 < \theta < 90^\circ$, $0 < \psi < 90^\circ$.

Les spectres simulés ont été obtenus par un programme développé pour modéliser la réflectivité des systèmes de couches adsorbées⁴² et étendu aux systèmes anisotropes suivant la méthode matricielle de Berreman⁴³. Les constantes optiques de l'eau utilisées sont celles obtenues par les simulations de Bertie et Lan⁴⁴, et celles des structures secondaires proviennent de Buffeteau *et al.*⁴⁵.

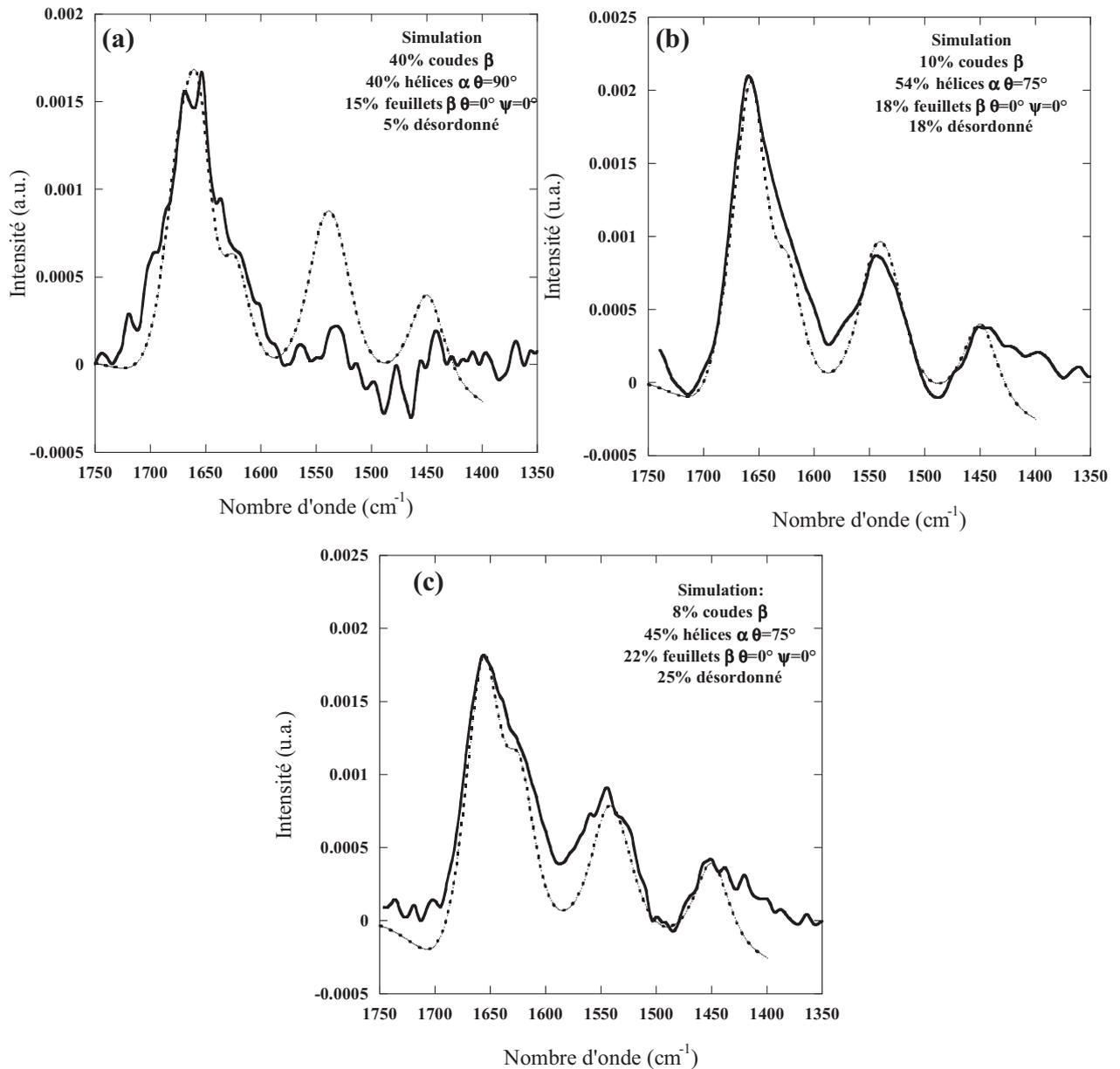


Figure 26 : Comparaison des spectres PM-IRRAS simulés et expérimentaux, de γ -gliadines à l'interface air-eau, à différents niveaux de compression : (a) $A = 6000 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (b) $A = 2300 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (c) $A = 600 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$.

La figure 26 présente la comparaison de quelques spectres expérimentaux de γ -gliadines (6000, 2300 et 600 $\text{\AA}^2/\text{molécule}$) avec des combinaisons de spectres simulés de structures secondaires. De façon générale, les ajustements sont corrects, cependant une différence entre spectres expérimental et simulé de la figure 26 (a) est observée au niveau de l'amide II. L'absence d'amide II sur le spectre expérimental peut être expliquée par la bande négative de l'eau interfaciale qui est perturbée par les protéines hydratées, et la faible concentration interfaciale de protéines. Sur la base des simulations, nous pouvons supposer qu'à haute aire moléculaire, les coudes β sont majoritaires, et la plupart des hélices α et feuillets β sont orientés à plat sur l'interface. A la fin de la première étape de l'isotherme, la plupart des coudes β seraient transformés en structures désordonnées et en hélices α , les hélices ayant

fait une petite rotation qui les aurait conduites à un angle de 75° par rapport à la normale du plan interfacial. A la fin de la deuxième étape de l'isotherme, la proportion d'hélices aurait diminué au profit des feuillets β et des structures désordonnées. Ainsi les simulations suggèrent un faible changement d'orientation des hélices pendant la première étape de l'isotherme et des changements de proportions des différentes structures secondaires au cours des deux premières étapes de l'isotherme. De façon générale, nous pouvons observer une diminution des longueurs d'onde des principales contributions de la bande amide I depuis 1670 cm^{-1} jusqu'à 1625 cm^{-1} , ce qui suggère une diminution des coudes β au profit des feuillets β .

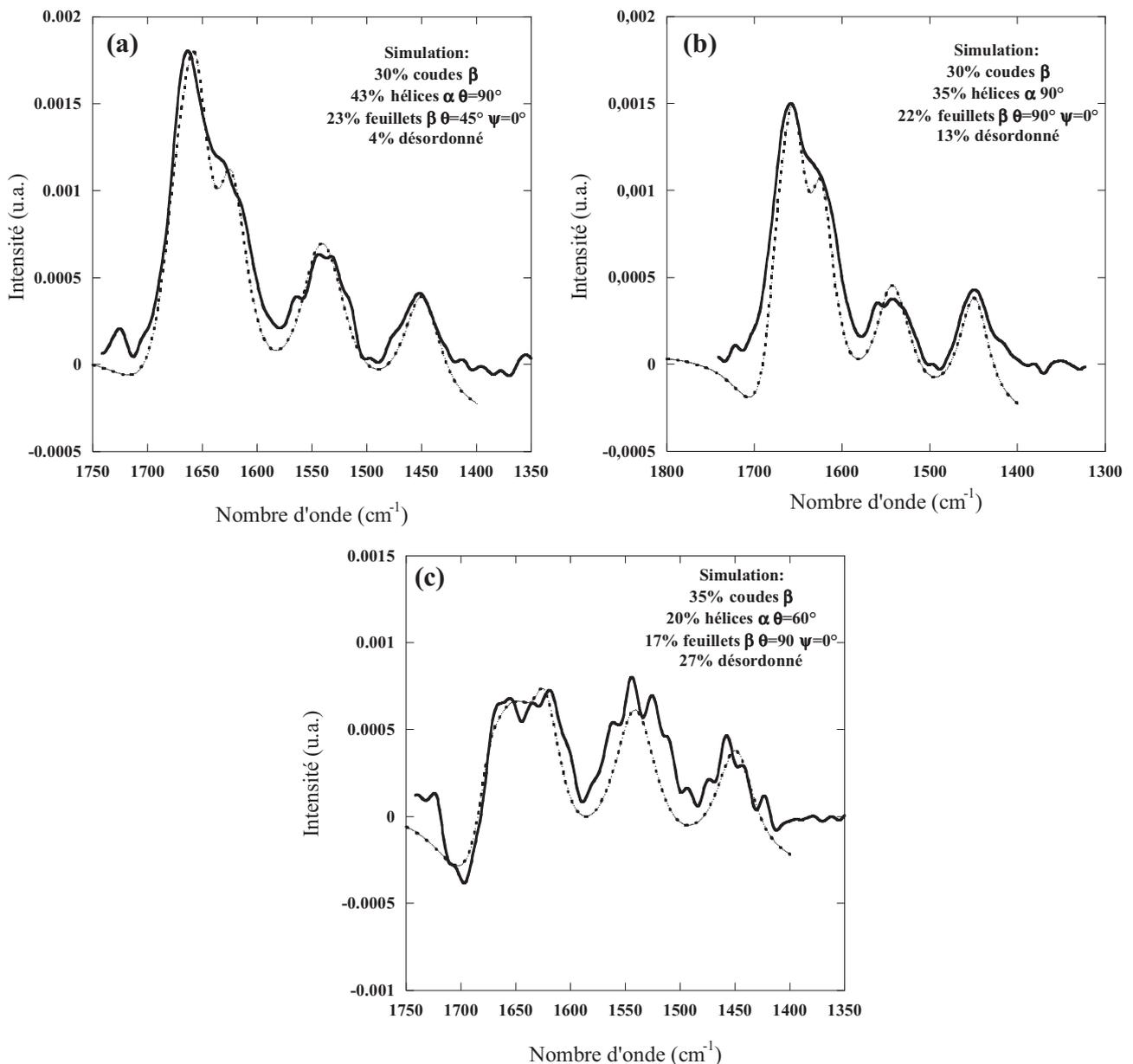


Figure 27: Comparaison des spectres PM-IRRAS simulés et expérimentaux, de ω -gliadines à l'interface air-eau, à différents niveaux de compression : (a) $A = 6000 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (b) $A = 3000 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ (c) $A = 600 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$.

La figure 27 présente la comparaison de quelques spectres expérimentaux de ω -gliadines (6000, 3000 et 600 Å²/molécule) avec des combinaisons de spectres simulés de structures secondaires. Les ajustements apparaissent relativement corrects. Sur la base de ces simulations, nous pouvons suggérer qu'à grande aire moléculaire, la structure secondaire des ω -gliadines est dominée par des coudes β et des hélices α orientées à plat sur l'interface (figure 27 (a)). Les feuilletts β sont bien ajustés avec une orientation $\theta = 45^\circ$ $\psi = 0^\circ$ qui correspond à la direction des liaisons hydrogène orientées parallèlement à l'interface et la direction principale des chaînes peptidiques orientée avec un angle de $\theta = 45^\circ$ par rapport à l'interface. A la fin du premier régime de l'isotherme, les proportions de structures secondaires n'ont pas vraiment évolué, mais l'orientation des feuilletts β a changé (figure 27 (b)). L'orientation $\theta = 90^\circ$ $\psi = 0^\circ$ signifie que les chaînes peptidiques sont orientées perpendiculairement à l'interface. A très faible aire moléculaire, les spectres singuliers de ω -gliadines sont bien ajustés avec une combinaison de coudes β , feuilletts β perpendiculaires à l'interface avec la direction des liaisons hydrogène parallèle à l'interface, hélices α orientées avec un angle de 60° par rapport à la normale de l'interface, et des structures désordonnées. Ainsi les simulations suggèrent que pendant la première étape de l'isotherme, il y a une rotation des feuilletts β qui conduit à un arrangement plus compact des structures, et que pendant la seconde étape, il y a un redressement des hélices et une diminution de leur proportion au profit des structures désordonnées.

Ainsi les simulations de spectres expérimentaux ont permis de donner les tendances générales du comportement des structures secondaires le long de la compression, en précisant, en particulier, leur changement d'orientation avec la compression de la couche.

4. Bilan

L'étude des gliadines à l'interface air-eau a permis de montrer que ces protéines s'adsorbent instantanément à l'interface, lorsque la sous-phase était composée d'un tampon phosphate à pH neutre. Cette adsorption apparaît directement liée à l'insolubilité des gliadines dans l'eau. Ainsi les gliadines forment des monocouches très homogènes dont l'épaisseur varie avec le taux de compression. L'orientation et la nature des structures secondaires sont également modifiées par la compression de la monocouche. Les mesures PM-IRRAS ont montré que pour de très grandes aires moléculaires, les gliadines adoptaient une structure peu repliée et étalée à l'interface air-eau. Ensuite, soumises à de la compression, les monocouches de γ -gliadines semblent maintenues à l'interface par quelques changements de structures et d'orientation de ces structures. En effet, la grande proportion de coudes β diminuerait au profit de feuilletts β , qui permettraient de maintenir les molécules dans un contact proche pour leur assemblage. Puis, à partir de ~ 1500 Å²/molécule, les structures ne semblent plus modifiées, la croissance de la pression interfaciale ralentit, et l'épaisseur du film continue à croître. Ces éléments nous laissent suggérer un modèle d'empilement dans l'épaisseur des γ -gliadines. Cette hypothèse est en accord avec l'analyse des isothermes de compression de γ -gliadines par des concepts de lois d'échelle, réalisées par Hargreaves *et al.*⁴⁶. Par ailleurs, les ω -gliadines apparaissent moins stables à l'interface air-eau. Soumises à la diminution d'aire

moléculaire, les structures secondaires s'orientent de façon à minimiser l'aire interfaciale des molécules, puis des molécules de ω -gliadines sont éjectées dans la sous-phase. Ainsi, contrairement aux γ -gliadines, les ω -gliadines apparaissent incapables de s'accumuler à l'interface air-eau. Cette différence de comportement peut être expliquée par la différence d'hydrophobicité déduite de la composition en acides aminés. Selon la structure primaire des γ -gliadines, le domaine C-terminal, non répété serait responsable de la grande activité de surface de ces protéines, alors que le comportement des ω -gliadines semble indiquer que le domaine répété présente une capacité à s'organiser par la rotation des structures secondaires.

L'étape suivante de notre étude consiste à injecter des gliadines sous une monocouche de lipides afin de mimer davantage le contexte biologique. Ainsi, une expérience a été réalisée pour définir les différences de comportement entre des gliadines injectées à l'interface air-eau ou dans la sous-phase. La figure 28 présente les isothermes de compression de la γ -gliadine pour les deux types d'injection. Ils sont identiques quel que soit le mode d'injection.

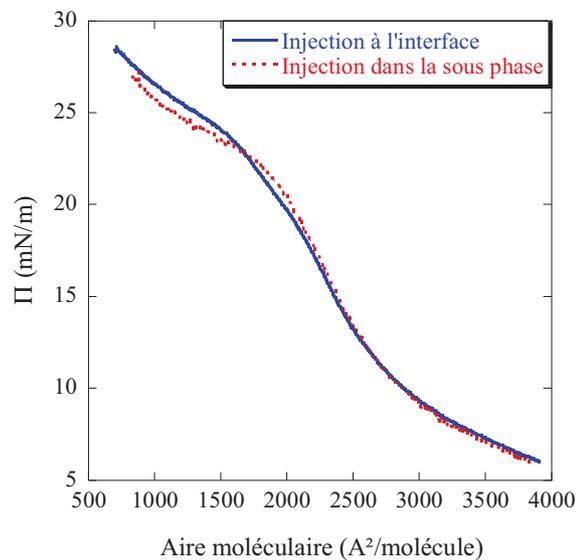


Figure 28 : Isothermes de compression de γ -gliadine injectée selon différentes méthodes : en rouge, injection de la solution de protéines dans la sous-phase, en bleu, injection de la solution de protéines à l'interface air-eau.

Les résultats obtenus à l'interface air-eau constituent ainsi une bonne base pour l'étude des gliadines injectées sous une monocouche de lipides.

D. Conclusion

Dans ce chapitre, les modes d'assemblage des γ - et ω -gliadines ont été étudiés dans des milieux aqueux, en volume et sur des surfaces hydrophobes. Que ce soit en volume ou à l'interface air-eau, des systèmes denses ont pu être obtenus progressivement à partir de systèmes dilués. Ces systèmes permettent de mimer le contexte biologique, où les protéines de réserve sont synthétisées sous forme monomérique dans le RE, pour ensuite s'assembler progressivement sous forme d'agrégats denses, les corpuscules protéiques⁴⁷.

Pour les systèmes dilués étudiés, les gliadines forment des monocouches à l'interface air-eau, alors qu'en volume, un équilibre est observé entre formes monomériques et phases denses formant des gouttelettes nanométriques. Bien que les ω -gliadines apparaissent plus solubles dans les milieux aqueux que les γ -gliadines, le comportement général de ces deux types de gliadines apparaît identique dans les systèmes dilués. Cependant, pour les systèmes concentrés, des différences importantes apparaissent. En volume, dans le microévaporateur, nous pouvons observer par microscopie optique, la croissance de nombreuses gouttelettes de phase dense de γ -gliadines, alors qu'avec les ω -gliadine on voit une phase dense unique se former à partir du bout du canal.

A l'interface air-eau, pour de fort taux de compression, la γ -gliadine est maintenue à l'interface sous forme de couche épaisse pouvant être formée par empilement des protéines, alors que la monocouche de ω -gliadines s'effondre dans la sous-phase. Ces différences de comportement peuvent être attribuées aux propriétés interfaciales de ces protéines. Ces deux types de gliadines sont peu solubles dans l'eau, mais la γ -gliadine est plus hydrophobe de part son domaine répété globulaire. De plus la structure primaire de la γ -gliadine suggère un comportement amphiphile qui pourrait être à l'origine de la stabilisation des gouttelettes denses en volume et des couches épaisses à l'interface air-eau. En termes de structure secondaire, il semblerait que le domaine répété soit labile par rapport au domaine non répété stabilisé par des ponts disulfures. Ainsi le domaine répété serait capable de s'organiser sous forme de structures différentes selon les conditions. De plus, aux interfaces, des orientations spécifiques attribuées à ce domaine ont pu être observées.

Ces observations permettent de supposer que le domaine répété, présent dans l'ensemble des protéines de réserve, soit à l'origine du compactage important de ces protéines dans le contexte biologique, par une organisation des structures secondaires en termes de forme et d'orientation. Le domaine non répété, globulaire, présent dans la majorité des prolamines, serait à l'origine de la stabilisation de systèmes denses, notamment aux interfaces. Etant donné l'importance des propriétés interfaciales dans l'assemblage de ces protéines, le chapitre suivant est consacré à l'étude des gliadines au voisinage d'interfaces "biologiques", les membranes lipidiques.

BIBLIOGRAPHIE

¹ Pézolet, Bonenfant, Dousseau, Popineau, *FEBS Lett.* **1992**, 299, 247-250.

² Pancoska, Yasui, Keiderling, *Biochemistry*, **1991**, 30, 5089-5103.

³ Tatham, Masson, Popineau, *J. Cereal Sci.* **1990**, 11, 1-13.

⁴ Wellner, Belton, Tatham, *Biochem. J.* **1996**, 319, 741-747.

- ⁵ Sourice, Nisole, Guégen, Popineau, Elmorjani, *Biochim. Biophys. Res. Com.* **2003**, 312, 989-996.
- ⁶ De Young, Fink, Dill *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26,614-620.
- ⁷ Creighton, "*Proteins, Structures and molecular properties*" **1993**, Freeman and Company, 262-264.
- ⁸ Thomson, Miles, Popineau, Harries, Shewry, Tatham, *Biochem. Biophys. Acta* **1999**, 1430, 359-366.
- ⁹ Leng, Leonetti, Tabeling, Joanicot, Ajdari, *Phys. Rev. Lett.* **2006**, 96, 084503.
- ¹⁰ Tu, "*Raman Spectroscopy in biology*" **1982**, John Wiley & Sons, 65-115.
- ¹¹ Sugeta, Go, Miyazawa, *Chem. Lett.* **1972**, 83-86.
- ¹² Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 4664-4668.
- ¹³ Clark, Hester, "*Spectroscopy of Biological Systems*" **1986**, John Wiley & Sons, 142-143.
- ¹⁴ Tanaka, Young, *J. Mater. Sci.* **2006**, 41, 963-991.
- ¹⁵ Shimoni, Galili, *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, 31, 18896-18874.
- ¹⁶ Pence, Weinstein, Mecham, *Cereal Chemistry* **1954**, 31, 29-37.
- ¹⁷ Bourdieu, Daillant, Chatenay, Braslau, Colson, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72, 1502
- ¹⁸ Fontaine, Daillant, Guenoun, Alba, Braslau, Mays, Petit, Rieutord, *J. Phys. II France* **1997**, 7, 401-407.
- ¹⁹ Orecchioni, Duclairoir, Renard, Nakacke, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, 6, 3171-3178.
- ²⁰ Harpaz, Gerstein, Clothia, *Structure* **1994**, 2, 641-649.
- ²¹ Blanch, Kasarda, Hecht, Nielsen, Barron, *Biochemistry* **2003**, 42, 5665-5673.
- ²² Rothschild, He, Gray, Roepe, Pelletier, Brown, Herzfeld, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 9832-9835.
- ²³ Gerwert, Hess, Engelhard, *FEBS Lett.* **1989**, 261, 2, 449-454.
- ²⁴ Caswell, Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 2796-2800.
- ²⁵ Popineau, Pineau, *J. Cereal Sci.* **1985**, 3, 363-378.
- ²⁶ Popineau, Le Guerroué, Pineau, *Lebensm. Wiss. U. Technol.* **1986** 19, 266-271.
- ²⁷ Tatham, Shewry, *J. Cereal Sci.* **1985**, 3, 103-113.
- ²⁸ Park, Shalongo, Stellwagen, *Biochemistry* **1993**, 32, 7048-7053.
- ²⁹ Richardson, Richardson, *Science* **1988**, 240, 1648-1652.
- ³⁰ Malin, Alaimo, Brown, Aramini, Germann, Harold, McSweeney, Fox, *J. Prot. Chem.* **2001**, 20, 5, 391-404.
- ³¹ Wilder, Friedrich, Potts, Daumy, Francoeur, *Biochemistry* **1992**, 31, 27-31.

- ³² Areas, Cassiano, *Biophys. Chem.* **2001**, 90, 135-146.
- ³³ Smith, *Nature* **1995**, 268, 959-961.
- ³⁴ Lavoie, Gallant, Grandbois, Blaudez, Desbat, Boucher, Salesses, *Mat. Sc. and Eng. C* **1999**, 10, 147-154.
- ³⁵ Novskaya, Chirgadze, *Biopolymers* **1976**, 15, 637-648.
- ³⁶ Cornut, Desbat, Turllet, Dufourcq, *Biophys. J.* **1996**, 70, 305-312.
- ³⁷ Blaudez, Turllet, Dufourcq, Bard, Buffeteau, Desbat, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1996**, 92 (4), 525-530.
- ³⁸ Lavoie, Blaudez, Vaknin, Desbat, Ocko, Salesses, *Biophys. J.* **2002**, 83, 3558-3569.
- ³⁹ Granbois, Desbat, Salesses, *Biophys. Chem.* **2000**, 88, 127-135.
- ⁴⁰ Mantsch, Perczel, Hollosi, Fasman, *Biopolymers* **1993**, 33, 201-207.
- ⁴¹ Castano, Desbat, Laguerre, Dufourcq, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1416, 176-194.
- ⁴² Buffeteau, Desbat, *Appl. Spectrosc.* **1989**, 43, 1027-1032.
- ⁴³ Berreman, *J. Opt. Soc. Am.* **1972**, 62: 502-510.
- ⁴⁴ Bertie, Lan, *Appl. Spectrosc.* **1996**, 50, 1047-1057.
- ⁴⁵ Buffeteau, Le Calvez, Castano, Desbat, Blaudez, Dufourcq, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104: 4537-4544.
- ⁴⁶ Hargreaves, Douillard, Popineau, In: *Food Macromolecules and colloids*, Dickinson, E.; Lorient, D. Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge **1995**, 71-76.
- ⁴⁷ Altschuler, Galili, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 6677-6682.

CHAPITRE IV : INTERACTION MEMBRANE- PROTEINE DE RESERVE DE BLE

Dans ce chapitre, des études portant sur l'interaction entre protéines de réserve de blé et membranes sont présentées. Deux types d'approches ont été réalisés. Dans un premier temps, des protéines de réserve de blé ont été insérées dans des phases lamellaires de tensio-actifs. Ce type de système a permis de constituer des membranes modèles et d'étudier l'effet du confinement. Puis, dans un deuxième temps, des études ont été réalisées à l'interface air-eau à l'aide de monocouches de lipides, afin de focaliser notre étude sur l'interface membrane-eau.

A. Approche phase lamellaire

1. Approche – Formulation

L'objectif de cette approche est d'étudier l'effet du confinement de protéines de réserve au sein d'un système membranaire. En effet, le réticulum endoplasmique induit un confinement des protéines, les observations microscopiques de réticulum endoplasmique de blé montrent que le lumen est délimité par des membranes distantes de 50 à 100 nm environ¹. Le choix des tensio-actifs pour cette étude s'est porté sur le mélange C₁₂E₅/Hexanol car il permet d'obtenir des phases lamellaires dans une grande gamme de dilution, et donc de couvrir des épaisseurs de couches aqueuses (*dw*) allant de 1 à 100 nm. Les systèmes de phases lamellaires à base de phosphatidylcholine sont plus proches du contexte biologique, mais leur gamme de dilution est très limitée ($0.4 < dw < 4$ nm).

Ainsi, nous avons essayé d'insérer des protéines de réserve de blé dans des phases lamellaires de C₁₂E₅/Hexanol de différentes épaisseurs de couches aqueuses. De la γ -gliadine marquée avec de la TRITC a été utilisée comme protéine de réserve de blé modèle. Les phases lamellaires étant des systèmes à l'équilibre thermodynamique, les échantillons ont été préparés dans des tubes eppendorf par un simple mélange des composants : protéines marquée lyophilisée (0.08 %), prémix C₁₂E₅/Hexanol ($m_{C_{12}E_5}/m_{Hexanol} = 0.29$) et eau ultrapure. En connaissance du diagramme de phase du système C₁₂E₅/Hexanol/Eau (cf chapitre 2), le rapport prémix/eau a été modulé pour faire varier l'épaisseur de couche aqueuse des échantillons. Différents échantillons ont été formulés avec des fractions massiques en eau comprises entre 40 et 80 % de la masse totale (cf annexe C).

L'homogénéisation des échantillons a été supportée par une dizaine de cycles de centrifugation (tubes à l'endroit, puis tubes à l'envers, à 10 000 rpm pendant 10 minutes), et un temps de repos, à l'abri de la lumière, de une à deux semaines a été laissé aux échantillons pour qu'ils atteignent leur état d'équilibre. Les échantillons ont ensuite été étudiés à partir du moment où ils sont apparus macroscopiquement homogènes.

2. Observations microscopiques

Les échantillons ont été observés en microscopie optique à lumière polarisée et en microscopie de fluorescence. Pour cela ils ont été introduits par capillarité dans des capillaires plats de 50 μ m d'épaisseur. Afin d'éviter la déshydratation des systèmes pendant l'observation, les extrémités des capillaires ont été scellées par une colle à réticulation UV sans solvant (Epotecny). La figure 1 présente des clichés de microscopie en lumière polarisée et de fluorescence, de systèmes à différents taux d'hydratation. Le système le plus dilué présenté a une épaisseur de couche aqueuse de 15 nm. Les systèmes avec de plus hauts taux d'hydratation n'ont pas été étudiés car ils forment des systèmes biphasiques. En microscopie à lumière polarisée on observe des zones homéotropes et des stries huileuses qui sont caractéristiques des textures de phases lamellaires. Les échantillons apparaissent mieux orientés et le contraste est meilleur dans le cas des systèmes concentrés. En microscopie de fluorescence, des agrégats très fluorescents apparaissent sur un fond homogène peu

fluorescent. La quantité d'agrégats augmente avec la dilution des systèmes. Deux explications sont possibles : soit le mode de préparation des capillaires exclu les agrégats dans le cas des systèmes peu dilués (plus visqueux), soit la plus grande quantité de surface membranaire dans les systèmes moins dilués évite la formation des agrégats. Cette seconde hypothèse, implique qu'il y ait une interaction entre γ -gliadine et membrane de $C_{12}E_5$ /Hexanol.

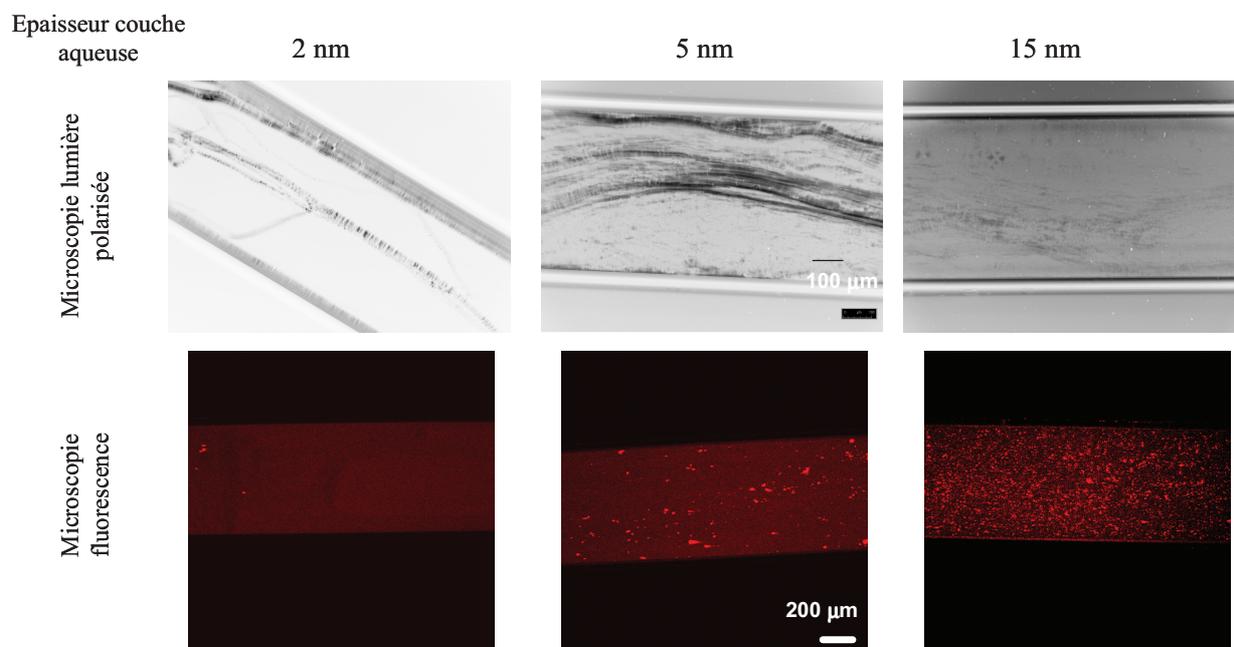


Figure 1 : Observations en microscopies optiques (lumière polarisée et de fluorescence) d'échantillons de phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol/eau dopées par de la γ -gliadine marquée avec de la TRITC.

Les observations microscopiques permettent de conclure que dans tous les cas, nous sommes en présence d'un système biphasique composé d'une phase lamellaire contenant de la γ -gliadine marquée, en équilibre avec des agrégats de protéines. L'épaisseur des couches aqueuses des phases lamellaires contenant de la γ -gliadine ($2 \text{ nm} < dw < 15 \text{ nm}$) laisse supposer que les protéines insérées se trouvent sous forme monomérique. Le rayon de giration des γ -gliadines en solution eau-éthanol est de 3.8 nm. L'insertion des γ -gliadines dans des phases lamellaires de 2 nm d'épaisseur de couche aqueuse laisse donc supposer une déformation locale de la phase lamellaire ou un changement de conformation des gliadines. Les études sur les solutions aqueuses de gliadines (cf chapitre 3) ont montré qu'une partie des γ -gliadines se solubilisait sous forme monomérique ($R_H \approx 4 \text{ nm}$). Il se pourrait que ce soit cette petite partie des γ -gliadines qui se soit insérée dans les phases lamellaires.

3. Diffraction des rayons X

Les échantillons ont été caractérisés par diffraction des rayons X afin de mesurer la périodicité des phases lamellaires. La figure 2 présente à gauche les spectres obtenus pour trois échantillons de phase lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol dopées par de la γ -gliadine marquée. On peut observer le pic de Bragg de premier ordre positionné à différents vecteurs d'onde q

en fonction de la dilution du système et une forte diffusion aux petits angles. Cette diffusion aux petits angles, d'autant plus importante que le système est dilué, peut s'expliquer par la présence des agrégats observés en microscopie de fluorescence qui apparaissaient plus nombreux avec la dilution du système. La courbe à droite représente l'évolution de la périodicité d des systèmes, en fonction de l'inverse de la fraction volumique en membrane (en considérant une densité des tensio-actifs égale à 1). Pour des raisons géométriques, la périodicité d est reliée à l'épaisseur des membranes δ par la relation :

$$d = \delta / \phi_m \quad \text{Equation 1}$$

avec ϕ_m la fraction volumique en membranes. La pente des droites donne ainsi l'épaisseur des bicouches. Dans le cas d'une phase lamellaire de $C_{12}E_5$ /Hexanol non dopée on trouve $\delta = 2.87$ nm, ce qui est en accord avec la littérature², et pour la même phase lamellaire dopée à la γ -gliadine à 0.08 %, on trouve $\delta = 2.98$ nm. Il y a donc une très légère augmentation des périodicités avec l'insertion des γ -gliadines, mais cette évolution n'est pas significative.

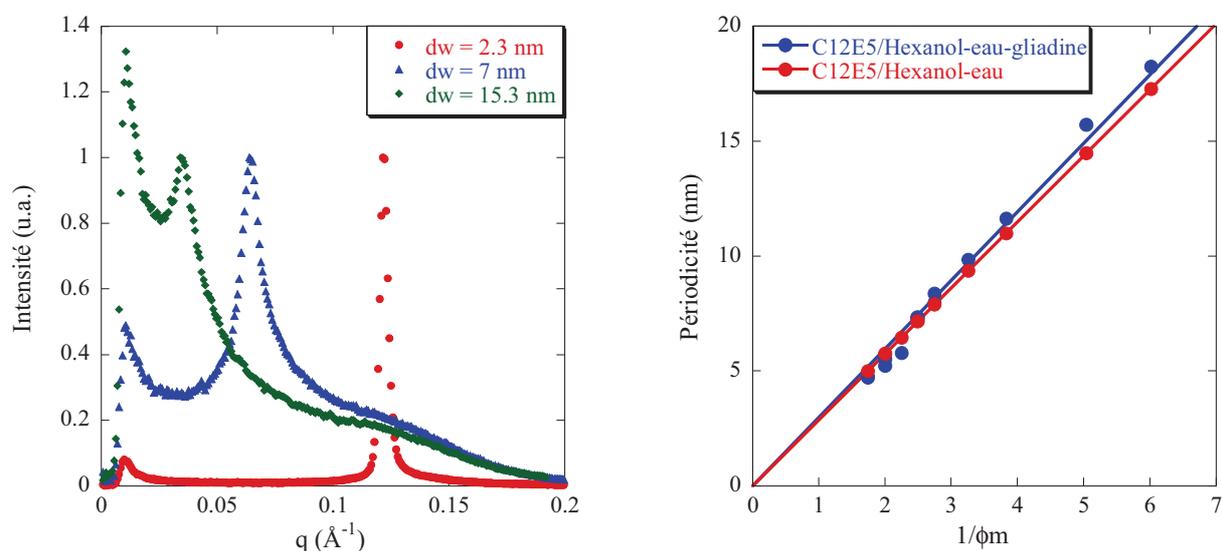


Figure 2 : Résultats obtenus en diffraction des rayons X. A gauche spectre de diffraction de trois échantillons de phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol/eau dopées par de la gliadine marquée. A droite, représentation de la périodicité des phases lamellaires dopées et non dopées en fonction de l'inverse de la fraction de membrane.

Les mesures de diffraction des rayons X montrent ainsi que la structure lamellaire de $C_{12}E_5$ /Hexanol n'est pas notablement modifiée par l'insertion de γ -gliadines.

4. FRAP

La dynamique des γ -gliadines insérées dans des phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol en fonction du confinement a été étudiée par FRAP. Pour appuyer l'analyse de ces résultats, deux autres types de molécules ont été parallèlement insérés dans ces phases lamellaires : des fluorophores libres (TRITC) et des lipides marqués (DHPE-fluorescéine). Le comportement de ces deux molécules dans ces systèmes a précédemment été étudié par Moreau *et al*³. Les coefficients de diffusion de molécules insérées dans les phases lamellaires, présentés dans ce

travail, sont des coefficients perpendiculaires (D_{perp}). Il s'agit de mesures de dynamique des molécules dans le plan des bicouches, les mesures ont donc été réalisées sur des zones orientées homéotropes avec le laser parallèle au directeur (cf chapitre 2).

a) Mesures préliminaires

Dans un premier temps, des mesures préliminaires de FRAP ont été réalisées pour évaluer la précision de la technique de mesure et l'impact d'une présence éventuelle de fluorophores libres dans nos échantillons, sur le coefficient de diffusion mesuré. Cette étude a été réalisée sur des solutions mixtes de γ -gliadines marquées et de fluorophores libres. Le solvant était un mélange eau-ethanol (45 : 55) pour solubiliser correctement les protéines, et les concentrations étaient de 0.2 mol/L. Contrairement aux mesures réalisées sur les phases lamellaires, en solution nous mesurons des coefficients de diffusion translationnels non orientés car le milieu est isotrope.

Avant d'analyser les mesures de coefficient de diffusion, nous nous sommes assuré que la dynamique des molécules était brownienne. Le mouvement brownien est caractérisé par l'évolution de la moyenne quadratique de la position d'une particule $\langle r^2 \rangle$ en fonction du temps (t). Le mode de transport est la diffusion aléatoire si et seulement si :

$$\langle r^2 \rangle \propto D.t \quad \text{Equation 2}$$

avec D le coefficient de diffusion translationnel. L'élargissement d'une tâche de photoblanchiment gaussienne doit alors être décrit par $\sigma^2 \propto D.t$, avec σ la largeur à mi-hauteur de la tâche de photoblanchiment.

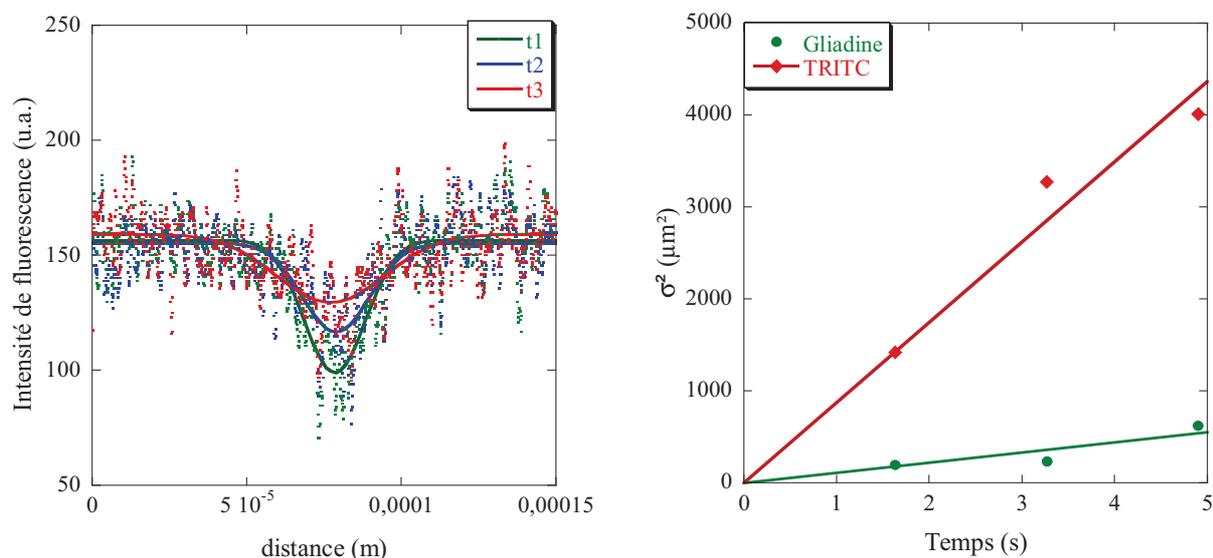


Figure 3 : Étude du caractère diffusif de la TRITC et de la γ -gliadine en solution dans l'eau-éthanol. A gauche : profils de fluorescence réalisés sur des solutions de fluorophores à différents temps après l'étape de photoblanchiment. Ajustements réalisés par des fonctions gaussiennes. A droite : évolution de la largeur à mi-hauteur des profils gaussiens en fonction du temps après photoblanchiment. \blacklozenge solution de TRITC, \bullet solution de γ -gliadines marquées.

La figure 3 présente à gauche, des profils de fluorescence expérimentaux réalisés sur des solutions de fluorophores, à différents temps après l'étape de photoblanchiment. Ces profils ont été ajustés par des fonctions gaussiennes. A droite, sont présentés les carrés des largeurs à mi-hauteur des tâches de photoblanchiment en fonction du temps, réalisées sur des solutions de γ -gliadines et de TRITC. Les profils de fluorescence expérimentaux apparaissent très bruités, car ils sont pris sur des images qui sont les résultantes de soustractions du cliché de base (pris avant le photoblanchiment, t_0), aux clichés pris aux temps t_i . Cependant, ces profils peuvent être ajustés par des fonctions gaussiennes. L'élargissement des profils en fonction du temps observé sur la figure de gauche, est quantifié sur la figure de droite pour des solutions de γ -gliadines et de TRITC. Le carré des largeurs à mi-hauteur des profils gaussiens évolue linéairement en fonction du temps, ce qui signifie que le mode de diffusion est de type Brownien pour de la γ -gliadine et de la TRITC, en solution dans un mélange eau-éthanol (45 : 55).

La figure 4 présente l'évolution du coefficient de diffusion mesuré en FRAP en fonction du pourcentage de molécules de fluorophore dans une solution eau-éthanol (45 : 55) de protéines marquées. Pour une solution de γ -gliadines pure, on mesure un coefficient de diffusion $D \approx 30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et pour une solution pure de TRITC on mesure $D \approx 190 \mu\text{m}^2/\text{s}$. L'évolution du coefficient de diffusion mesuré en fonction du pourcentage de fluorophore dans la solution de protéines n'est pas linéaire.

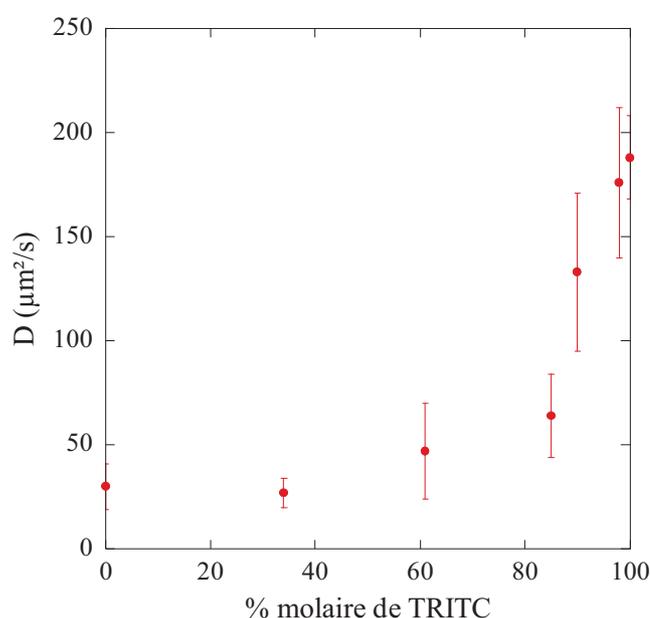


Figure 4 : Evolution du coefficient de diffusion mesuré en FRAP sur une solution eau-éthanol (45:55) contenant un mélange de gliadines marquées et de fluorophores (TRITC).

Cette évolution montre que jusqu'à 50 % de fluorophores, il y a très peu de modification de la valeur mesurée du coefficient de diffusion de la protéine. Ainsi, notre technique de FRAP est plus sensible aux espèces lentes que rapides. La présence potentielle de marqueur libre dans nos échantillons aura donc peu d'impact sur les mesures de coefficient de diffusion des protéines.

Par ailleurs, la relation de Stokes-Einstein (Equation 3) qui relie un rayon hydrodynamique moyen à un coefficient de diffusion, pour des objets sphériques browniens, permet d'évaluer les rayons hydrodynamiques de la γ -gliadine et de la TRITC mesurés par notre technique de FRAP.

$$R_H = \frac{k.T}{6.\pi.\eta.D} \quad \text{Equation 3}$$

Un rayon hydrodynamique $R_H = 2.6$ nm est mesuré pour la solution de γ -gliadine pure en considérant la viscosité du solvant $\eta = 2.8.10^{-3}$ kg.m⁻¹.s⁻¹. Cette valeur est inférieure au rayon de giration de γ -gliadine mesuré par Thomson *et al*⁴ en diffusion centrale des rayons X ($R_g = 3.8$ nm), et légèrement inférieure au rayon hydrodynamique que nous avons mesuré par diffusion dynamique de la lumière ($R_H = 3$ nm). Pour une solution pure de TRITC, nous mesurons un coefficient de diffusion $D \approx 190$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$, qui correspond à un rayon hydrodynamique de $R_H = 0.4$ nm. Cette valeur est également légèrement inférieure aux mesures faites par différents auteurs^{5,6,7} ($R_H = 0.5$ nm) sur de la rhodamine 6G. Ces mesures montrent donc que notre technique de FRAP surestime légèrement les valeurs de coefficient de diffusion, mais que les évolutions sont correctes.

b) Résultats

Dans un premier temps, le caractère diffusif des molécules insérées dans les phases lamellaires de C₁₂E₅/Hexanol a été étudié. La figure 5 présente l'évolution du carré de la largeur à mi-hauteur en fonction du temps pour un fluorophore libre, un lipide marqué et de la γ -gliadine marquée encapsulés dans une phase lamellaire de C₁₂E₅/Hexanol avec une épaisseur de couche aqueuse de 8 nm.

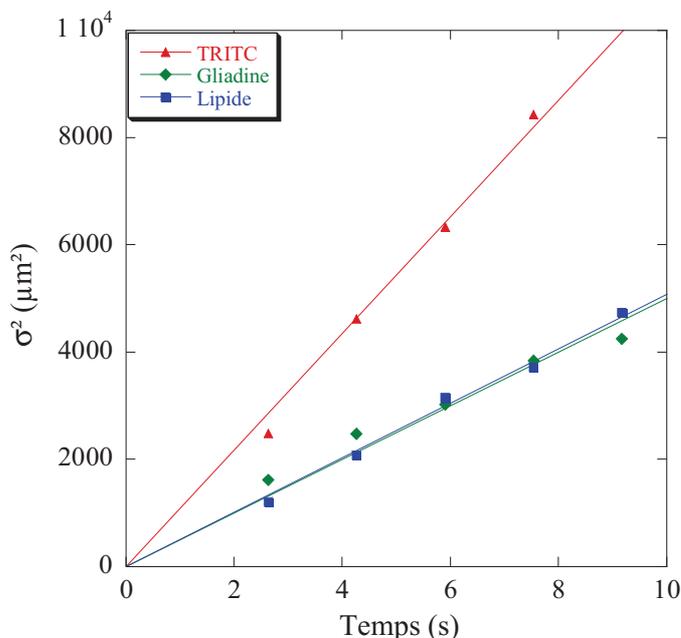


Figure 5 : Evolution de la largeur à mi hauteur du profil de fluorescence gaussien en fonction du temps, de différentes espèces insérées dans une phase lamellaire de C₁₂E₅/Hexanol-eau d'épaisseur de couche aqueuse 8 nm:
 (▲)TRITC, (◆) γ gliadine et (■)DHPE.

Les courbes du fluorophore libre et du lipide marqué montrent un comportement clairement linéaire qui atteste du caractère Brownien de ces molécules encapsulées dans des phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol. Dans le cas de la γ -gliadine, l'évolution de la largeur à mi-hauteur des profils gaussiens a été plus difficile à obtenir car l'intensité de fluorescence des systèmes était faible, et les profils de fluorescence très bruités. Cependant, un comportement raisonnablement linéaire a pu être observé. Ainsi, toutes les molécules insérées dans les phases lamellaires semblent diffuser aléatoirement.

La figure 6 présente le résultat des mesures de coefficients de diffusion de la TRITC, de la DHPE et de la γ -gliadine insérés dans des phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol de périodicité variable. Les valeurs et évolutions sont variables en fonction de la nature des molécules insérées. La TRITC présente une évolution du coefficient de diffusion en fonction de la dilution. On peut distinguer deux régimes : un premier régime confiné avec des coefficients de diffusion faibles et constants, et un deuxième régime où les coefficients de diffusion augmentent avec la dilution. Cependant, la DHPE et la γ -gliadine ne présentent pas d'évolution de leur coefficient de diffusion en fonction de la dilution, et les valeurs des coefficients de la γ -gliadine sont légèrement plus élevées que celles de la DHPE.

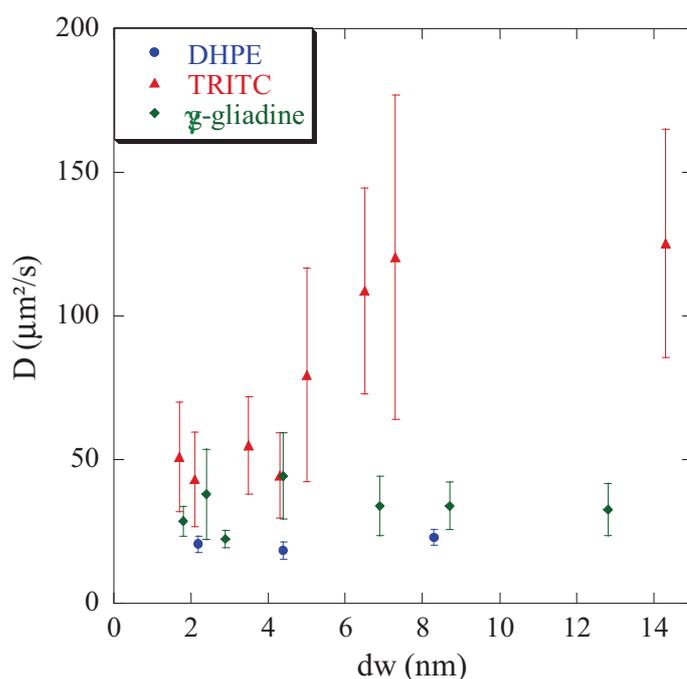


Figure 6 : Mesures des coefficients de diffusions de DHPE(●), TRITC(▲) et γ gliadines(◆) insérés dans des phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol-eau de différentes périodicités.

Le comportement de molécules hydrosolubles insérées dans des phases lamellaires lyotropes de différentes périodicités a précédemment été étudié par Moreau *et al*⁸. Cette étude montre qu'il existe deux régimes de dynamique des molécules hydrophiles confinées dans des phases lamellaires. Lorsque le confinement est tel que les épaisseurs de couches aqueuses sont inférieures au diamètre hydrodynamique des molécules insérées ($dw < 2R_H$), le régime est dit confiné. Les coefficients de diffusion sont constants, et non nuls à cause de la fluidité des

membranes. Lorsque les épaisseurs de couches aqueuses sont supérieures au diamètre hydrodynamique des molécules insérées ($dw > 2R_H$), les coefficients de diffusion évoluent avec la dilution du système selon le modèle de Faxén⁹ de diffusion d'objets entre deux murs rigides. Pour des régimes très dilués, la valeur de coefficient de diffusion tend vers le coefficient de diffusion des molécules en solution dans l'eau. Dans notre cas, la TRITC présente bien ces deux régimes, avec un changement de régime à $dw = 4$ nm et un coefficient de diffusion qui tend vers $120 \mu\text{m}^2/\text{s}$ aux hautes dilutions. Selon la relation de Stokes-Einstein, $D = 120 \mu\text{m}^2/\text{s}$ dans l'eau correspond à un diamètre hydrodynamique de 3.57 nm. Le modèle de Moreau *et al* semble donc bien s'appliquer à nos mesures, et indique que les objets en solution dans les couches aqueuses ont un rayon hydrodynamique de 2 nm environ. Cette valeur est supérieure au rayon hydrodynamique du fluorophore libre mesuré en solution dans l'eau-éthanol ($R_H = 0.4$ nm). Cela laisse donc suggérer qu'il y aurait une agrégation des molécules de TRITC dans la phase aqueuse. Cette agrégation pourrait être à l'origine des grandes barres d'erreur associées aux mesures du coefficient de diffusion dans le cas de la TRITC. Dans le cas de la DHPE, le coefficient de diffusion est constant en fonction de la dilution, puisque les molécules sont insérées dans les bicouches des membranes³. La dynamique de ce type d'objet a été modélisée par Saffman et Delbrück¹⁰ :

$$D \approx \frac{k_B T}{4\pi} \frac{\ln\left(\frac{\eta_m \delta}{\eta_0 R_H}\right) - \gamma}{\eta_m \delta} \quad \text{Equation 4}$$

avec η_m la viscosité de la membrane, η_0 la viscosité du solvant, δ l'épaisseur de la membrane et γ la constante d'Euler ($\gamma \approx 0.577$). Ainsi, pour un type de système membranaire donné (η_m , η_0 , δ fixés) le coefficient de diffusion est fixé par la taille des molécules insérées (R_H). Les mesures de coefficients de diffusion de γ -gliadines insérées dans des phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol, présentent un coefficient de diffusion indépendant de la dilution du système. D'après les mesures réalisées sur des molécules hydrophiles, ce résultat suggère que les γ -gliadines ne diffusent pas librement dans la phase aqueuse entre les bicouches. Ce comportement peut s'expliquer par le fait que ces protéines ne sont principalement pas solubles dans l'eau. De plus, nous pouvons noter que la valeur du coefficient de diffusion de ces protéines est légèrement supérieure à celle du lipide marqué. Cela montre que les γ -gliadines ne sont pas insérées dans les bicouches de $C_{12}E_5$ /Hexanol, car si c'était le cas, nous nous attendrions à une valeur de coefficient de diffusion inférieure à celle d'un lipide selon le modèle de Saffman et Delbrück (puisque la taille d'une protéine est inférieure à celle d'un lipide). Ainsi, ces mesures suggèrent que les γ -gliadines insérées dans un système confiné sont en interaction avec les membranes de tensio-actif. Cette interaction serait par ailleurs indépendante du niveau de confinement (i.e taux de dilution).

5. Etudes spectroscopiques : FTIR, Raman

Afin d'identifier de manière plus précise la nature de l'interaction qui existerait entre protéine de réserve de blé et membrane, des études spectroscopiques ont été entreprises sur les systèmes de phases lamellaires.

a) FTIR

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés en spectroscopie FTIR en mode ATR sur un cristal de Germanium. Pour limiter l'évaporation des échantillons lors de l'acquisition, un joint en silicone était disposé entre le cristal et la plaque supérieure. La figure 7 présente les spectres infrarouge de phase lamellaire de C₁₂E₅/Hexanol (dw = 8 nm) dopée et non dopée par de la γ -gliadine. On peut distinguer plusieurs bandes d'absorption, attribuées de la façon suivante :

- 3400 cm⁻¹ : large bande d'absorption liée aux vibrations d'élongation des liaisons OH contenues dans le C₁₂E₅, l'hexanol, et l'eau. Cette bande est située plutôt dans les basses fréquences de ce mode de vibration, cela signifie donc que les liaisons OH sont liées par des liaisons hydrogène intermoléculaires.
- 2900-3000 cm⁻¹ : bandes d'absorption due aux vibrations d'élongation des CH et CH₂ contenus dans le C₁₂E₅ et l'hexanol.
- 1640 cm⁻¹ : bande d'absorption principalement due aux vibrations de déformation de l'eau. La bande amide I des protéines se situe également dans cette région.
- 1460 cm⁻¹ : bande d'absorption principalement due aux vibrations de déformation des CH₃ contenus dans le C₁₂E₅ et l'hexanol.
- 1350 cm⁻¹ : Bande d'absorption due aux vibrations de déformation des OH.
- 1090 cm⁻¹ : Bande d'absorption due aux vibrations d'élongation de la liaison CO contenue essentiellement dans le C₁₂E₅, mais aussi dans l'hexanol.

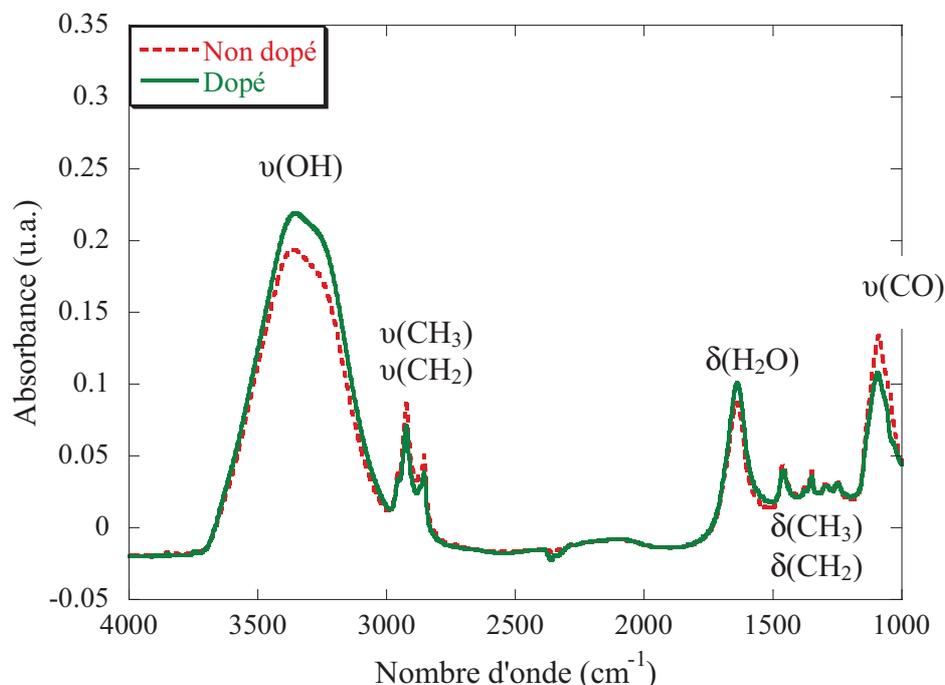


Figure 7 : Spectres infrarouge ATR de phases lamellaires de C₁₂E₅/Hexanol (dw=8nm) dopées ou non par de la γ -gliadine

Les spectres des systèmes dopés et non dopés présentent des bandes d'absorption aux mêmes longueurs d'onde, mais les intensités varient. Ces variations d'intensité peuvent être attribuées à des taux d'hydratation différents entre les deux systèmes. En effet, les échantillons ont été formulés avec le même taux d'hydratation, mais de l'évaporation a pu se produire lors de la manipulation des tubes pour les différentes expériences. Aucune information n'apparaît quant à une modification de structure de la phase lamellaire. Par ailleurs, le signal de la protéine apparaît noyé par les bandes d'absorption de l'eau (pour la bande amide I). Cela s'explique aisément par le fait qu'une très faible quantité de protéines est insérée dans la phase lamellaire. Pour essayer d'avoir davantage de signal il faudrait reformuler des systèmes avec de l'eau deutérée. En effet, les longueurs d'onde d'absorption du D₂O se situent à 2500 cm⁻¹ et 1210 cm⁻¹¹¹.

b) Raman

Des essais ont également été réalisés en spectroscopie Raman confocale. Les intensités d'absorption en spectroscopie Raman étant différentes de celles de la spectroscopie infrarouge, la détection de la protéine dans nos systèmes peut être envisagée. De plus, cette technique présente l'avantage de pouvoir cibler des zones d'échantillon sans agrégats. La figure 8 présente les spectres Raman des phases lamellaires dopées et non dopées, et de la γ -gliadine sous forme lyophilisée. Sur l'ensemble des spectres on distingue, comme en FTIR, la large bande d'absorption des vibrations d'élongation des liaisons OH et NH autour de 3300 cm⁻¹, et la bande des vibrations d'élongation des liaisons CH autour de 2900 cm⁻¹. Sur les spectres des phases lamellaires, on distingue des bandes de vibrations d'élongation des CH₂ (1440 et 1300 cm⁻¹), des bandes des vibrations de déformation des CO (886 cm⁻¹), et des bandes des vibrations de déformation des liaisons C-C entre 1025 et 1130 cm⁻¹¹².

Sur le spectre de la γ -gliadine on distingue les bandes amides I (1650 cm⁻¹) et III (1250 cm⁻¹) qui sont intenses en Raman. La bande amide I se situe à une longueur d'onde où il n'y a pas de bande d'absorption sur le spectre de la phase lamellaire de C₁₂E₅/Hexanol. Cependant la bande amide I n'est pas visible sur le spectre de la phase lamellaire dopée par de la γ -gliadine. La quantité de γ -gliadine insérée est donc trop faible pour être étudiée par spectroscopie Raman.

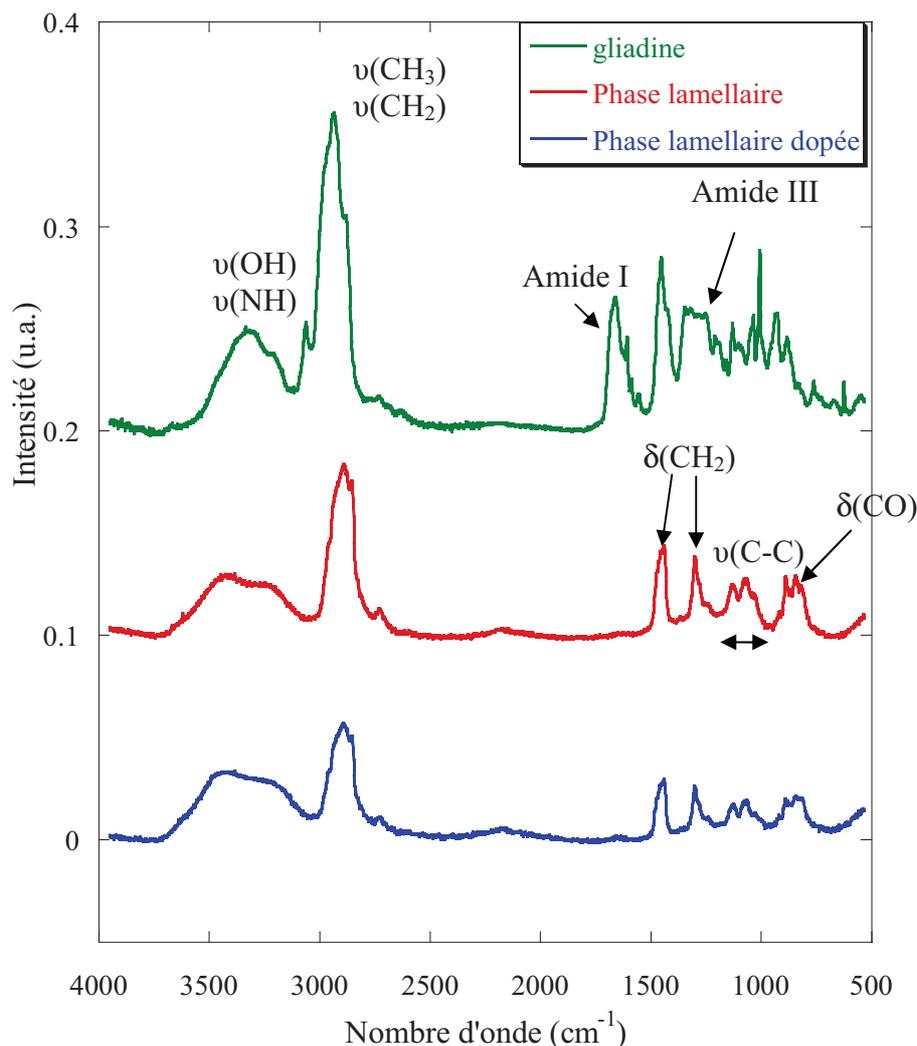


Figure 8 : Spectres Raman de γ -gliadine sous forme lyophilisée (spectre du haut), de phase lamellaire de $C_{12}E_5$ /Hexanol (spectre du milieu), et de phase lamellaire de $C_{12}E_5$ /Hexanol contenant de la γ -gliadine (spectre du bas).

6. Bilan

Les études concernant l'insertion des γ -gliadines dans des phases lamellaires ont montré qu'il était possible d'insérer une très faible quantité de ces protéines dans des phases lamellaires de $C_{12}E_5$ /Hexanol. La quantité de γ -gliadines insérées est inférieure à 0.08 % en volume (quantité introduite dans la formulation), puisque de nombreux agrégats ont été observés par microscopie de fluorescence et diffraction des rayons X. Ces mêmes techniques ont également permis de montrer que la structure lamellaire des échantillons n'avait pas notablement changé avec l'insertion des gliadines. Par ailleurs, les études de FRAP, bien que peu précises, ont permis de montrer que la dynamique des γ -gliadines n'était pas modifiée par la dilution du système de phase lamellaire. Aucun effet de confinement n'a pu être mis en évidence. La comparaison de la dynamique des γ -gliadines avec celles de molécules hydrophiles (TRITC) et lipophiles (DHPE) insérées dans les mêmes systèmes de phases lamellaires a permis de suggérer l'existence d'une interaction entre γ -gliadines et les bicouches de $C_{12}E_5$ /Hexanol. En effet, le caractère indépendant au confinement de la

dynamique des γ -gliadines nous a permis d'exclure l'hypothèse d'une diffusion libre des γ -gliadines dans les couches aqueuses entre les bicouches. De plus, la valeur des coefficients de diffusion, supérieure à celle des lipides insérés dans les bicouches, nous a permis de conclure que les γ -gliadines n'étaient pas insérées dans les bicouches de tensio-actif. Par ailleurs, une localisation des γ -gliadines au sein des bicouches se serait traduite par une augmentation de la mesure d'épaisseur des bicouches par diffraction des rayons X. Ainsi l'hypothèse retenue correspondrait à des γ -gliadines localisées à l'interface membrane-eau. Cette hypothèse permet également de justifier le fait que la quantité d'agrégats augmente avec la diminution de surface membranaire (= dilution du système). La figure 9 résume les différentes hypothèses concernant le positionnement des γ -gliadines dans les phases lamellaires, qui ont pu être validées ou exclues par les résultats de notre étude.

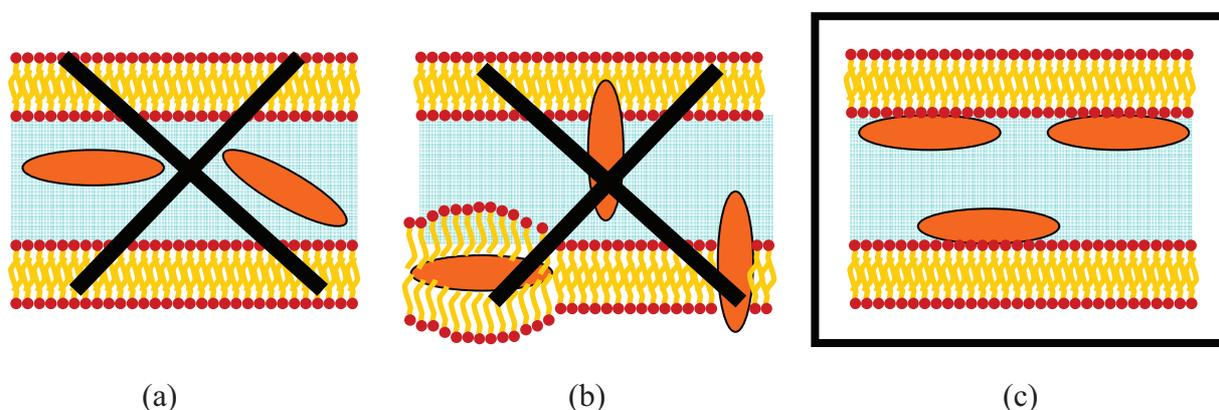


Figure 9 : Représentation schématique des hypothèses qui peuvent être émises concernant le comportement des γ -gliadines insérées dans des phases lamellaires de $C_{12}E_3$ /Hexanol suite à notre étude. (a) les γ -gliadines ne sont pas sous forme soluble dans la phase aqueuse entre les bicouches, (b) les γ -gliadines ne sont pas insérées dans les bicouches lipidiques, (c) les γ -gliadines sont localisées à l'interface membrane-eau.

Par ailleurs, il est important de noter que des γ -gliadines ont pu être insérées dans des phases lamellaires avec des épaisseurs de couches aqueuses de 2 nm. Ce sont donc des protéines dans l'état monomérique qui ont été insérées. De plus, en considérant les dimensions géométriques des γ -gliadines, mesurées en solution dans un mélange eau-éthanol¹³ (diamètre = 3.25 nm, longueur = 16.2 nm), seule l'hypothèse d'un changement de conformation de la protéine permettrait d'expliquer l'insertion des protéines dans ces phases lamellaires peu diluées. Malheureusement, les études spectroscopiques qui auraient pu fournir des informations quant à la conformation des protéines, ont été infructueuses. Davantage de protéines insérées auraient été nécessaires pour obtenir du signal.

B. Approche monocouche de Langmuir

1. Approche – protocole

Afin de focaliser l'étude de l'interaction membrane-protéine de réserve de blé sur l'interface membrane-eau, des études à l'interface air-eau ont été réalisées en collaboration avec Bernard Desbat (CBMN). Cette approche consiste à utiliser des monocouches de lipides à l'interface air-eau comme modèle membranaire et à injecter des protéines de réserve de blé dans la sous-phase (cf figure 10). Les systèmes ont été étudiés par trois techniques complémentaires : tensiométrie, microscopie à angle de Brewster et PM-IRRAS. L'intérêt de cette approche est de pouvoir moduler facilement la composition et la concentration des divers éléments (monocouche, protéine, sous-phase).

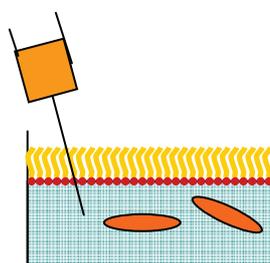


Figure 10 : Représentation schématique du protocole étude de l'interaction membrane-protéine par l'approche monocouche de Langmuir.

Pour initier l'étude, des monocouches de DMPC ont été utilisées car ce phospholipide est majoritaire dans les membranes biologiques (voir chapitre 2). Par ailleurs, son isotherme de compression à l'interface air-eau, ne présente pas de transition de phase entre 0 et 40 mN/m, ce qui a permis d'étudier l'effet de la pression interfaciale indépendamment des changements de phase. Le DMPC, préalablement solubilisé dans du chloroforme à 0.5 mg/mL, était injecté à l'interface air-eau, à l'aide d'une seringue Hamilton selon la méthode de Langmuir. Un tampon phosphate pH 7.2, 0.05 M, était utilisé pour constituer la sous-phase, de façon à mimer le contexte biologique. Ce tampon était auparavant passé sur un filtre en microfibrilles de verre (GF/F Watman). Enfin les protéines préalablement solubilisées dans un mélange eau-éthanol (45 : 55) et filtrées sur 0.45 μm , étaient injectées dans la sous-phase à l'aide d'une seringue Hamilton. De façon à limiter la consommation de matière, les expériences ont été réalisées dans une petite cuve ronde, en téflon, de diamètre 5 cm, et de profondeur 0.3 cm. Pour limiter la taille du ménisque, 8 mL de sous-phase étaient utilisés. Le tampon était introduit par injection de 12 mL, puis soustraction de 4 mL par micropipette pour maintenir un bon mouillage des bords. Cette cuve n'étant pas équipée de barrière, la pression de la monocouche de lipides était ajustée par la quantité de DMPC injectée à l'interface air-eau. Les expériences étaient réalisées à aire constante.

2. Pression de la monocouche lipidique

Dans un premier temps, l'effet de la pression interfaciale d'une monocouche de DMPC sur le comportement des gliadines injectées dans la sous-phase a été testé. Des monocouches de

DMPC ont été préparées à différentes valeurs de pression interfaciale et des solutions de γ -gliadine (40 μ l à 1 mg/ml) ont été injectées dans la sous-phase.

La figure 11 présente l'évolution de la pression interfaciale en fonction du temps, pour des pressions de monocouches de DMPC initiales égales à 20, 35 et 40 mN/m. A 20 mN/m, une augmentation brusque de la pression interfaciale est observée lors de l'injection de la solution de protéines, puis une décroissance de la pression est observée jusqu'à une valeur d'équilibre de 25 mN/m. L'augmentation de la pression interfaciale de 5 mN/m suggère une insertion des γ -gliadines à l'interface air-eau. Par contre, à 40 mN/m, la pression interfaciale n'est pas modifiée par l'injection de protéine. Il n'y aurait donc pas insertion des protéines. Pour une valeur de 35 mN/m, l'injection de protéines induit aux temps courts, une faible et brusque augmentation de la pression interfaciale (1 à 2 mN/m), puis la pression diminue pour se stabiliser autour de 35 mN/m. Cette faible évolution de la pression interfaciale semble indiquer une déstabilisation de l'interface lors de l'injection. Cependant, après équilibration, la pression initiale de la monocouche de lipides est retrouvée, il n'y aurait donc pas insertion des protéines.

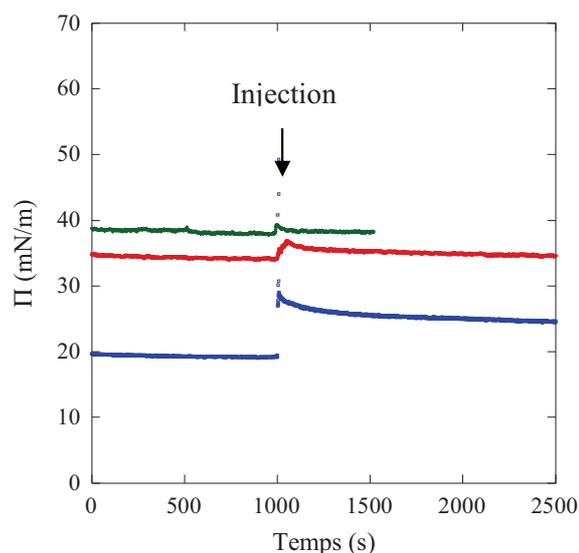


Figure 11 : Evolution de la pression interfaciale lors de l'injection de γ -gliadines sous des monocouches de DMPC à $\Pi = 20$ mN/m (bleu), $\Pi = 35$ mN/m (rouge), $\Pi = 40$ mN/m (vert).

Des expériences réalisées à l'aide d'une cuve de Langmuir équipée d'une barrière mobile, ont permis de diminuer progressivement la pression interfaciale d'une monocouche de lipide, initialement comprimée à $\Pi = 40$ mN/m, suite à l'injection d'une solution de protéines. Ainsi la valeur limite de pression à partir de laquelle les protéines s'insèrent, a pu être observée. La pression délimitant les deux types de comportement se situe autour de 25 mN/m. Ces observations suggèrent que l'insertion, ou non, de la γ -gliadine dans une monocouche de DMPC dépend de la densité de lipides à l'interface air-eau. Ce comportement a préalablement été observé pour de nombreuses protéines^{14,15}

La pression des membranes biologiques étant estimée entre 25 et 35 mN/m¹⁶, nous supposons que dans le contexte biologique, il n'y a pas d'insertion des γ -gliadines dans les bicouches. De plus cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus dans les systèmes de phases

lamellaires (chapitre 4A). Ainsi, pour la suite de l'étude nous avons focalisé notre attention sur des cas où la monocouche de lipides est comprimée à $\Pi = 35$ mN/m.

3. Observation en microscopie à Angle de Brewster

En parallèle des mesures de tensiométrie, des observations de l'interface ont été réalisées *in situ* par microscopie à angle de Brewster.

a) Monocouches de DMPC à $\Pi < 25$ mN/m

La figure 12 présente les observations réalisées lors de l'injection de γ -gliadines sous une monocouche de DMPC de pression $\Pi = 20$ mN/m. Le cliché (a) présente l'aspect d'une monocouche de DMPC seule. La texture est homogène et le niveau de gris est peu élevé car l'épaisseur de la monocouche est faible (≈ 2 nm). Le cliché (b) a été réalisé après l'injection de γ -gliadines dans la sous-phase. Il présente un fond noir et des zones plus lumineuses sous forme de larges domaines ou de petits domaines allongés. Le fond a un niveau de gris constant et égal à celui de la monocouche de DMPC. Les zones plus lumineuses ont des niveaux de gris qui correspondent à des épaisseurs de l'ordre de 4 à 6 nmⁱ, ces valeurs d'épaisseur sont du même ordre que celles observées pour des monocouches de γ -gliadines seules à l'interface air-eau à $\Pi = 20$ mN/m (cf chapitre 3). Cela suggère que nous observons des domaines de γ -gliadines insérés dans une monocouche de DMPC.

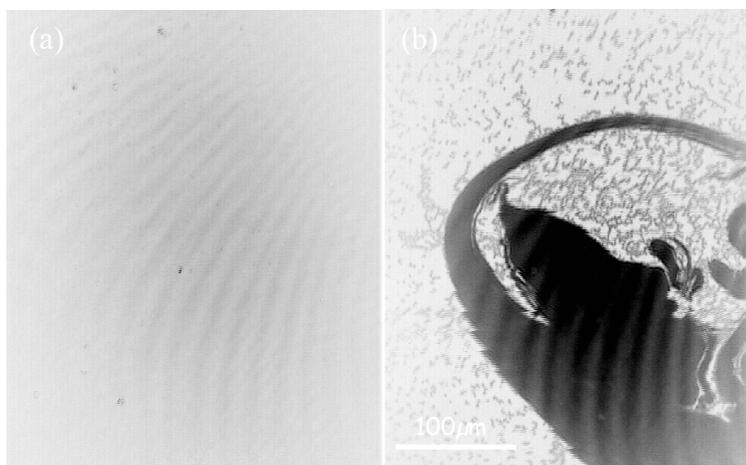


Figure 12 : Clichés de microscopie à angle de Brewster obtenus lorsque de la γ -gliadine est injectée sous une monocouche de DMPC à $\Pi = 20$ mN/m. (a) Monocouche de DMPC (b) Observations réalisées après injection de γ -gliadines dans la sous-phase (b). Vitesse d'acquisition : 1/50 s pour (a), et 1/1000 s pour (d).

Ainsi, pour une pression de surface de DMPC inférieure à 25 mN/m, nous pouvons observer l'insertion des γ -gliadines dans la monocouche de DMPC qui donne lieu à la formation d'un système biphase à l'interface air-eau.

ⁱ Epaisseur estimée à partir de la valeur de réflectance, en considérant un indice de réfraction de la couche interfaciale égal à 1.47. Relation définie dans le chapitre 2.

b) Monocouches de DMPC à $\Pi > 25\text{mN/m}$

Pour des pressions interfaciales supérieures à $\Pi = 25\text{ mN/m}$, les observations sont tout à fait différentes de celles réalisées à $\Pi = 20\text{ mN/m}$, comme le montre la figure 13.

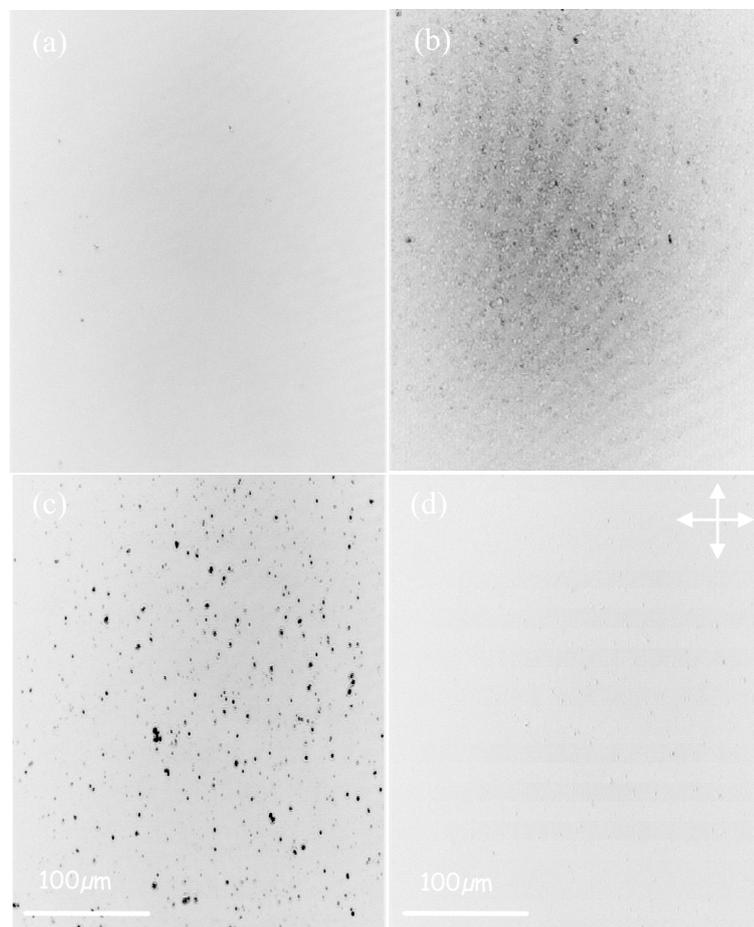


Figure 13 : Clichés de microscopie à angle de Brewster obtenus lorsque la γ -gliadine est injectée sous une monocouche de DMPC à $\Pi = 35\text{ mN/m}$. (a) Monocouche de DMPC (b) Période de scintillement après injection de γ -gliadine (c) Système stabilisé (c) Observation du système stabilisé avec polariseur et analyseur croisés. Vitesse d'acquisition : 1/50 s

Le cliché (a) est celui d'une monocouche de DMPC à 35 mN/m . La texture est homogène et peu lumineuse. Lorsque de la γ -gliadine est injectée dans la sous-phase, pendant quelques dizaines de secondes, aucun changement n'est observé. Ensuite, un "scintillement" apparaît. Il s'agit de points lumineux qui apparaissent et disparaissent à une fréquence de l'ordre de quelques apparitions-disparitions par seconde. Le niveau de gris en microscopie à angle de Brewster étant fonction de l'indice et de l'épaisseur des espèces à l'interface air-eau, ce scintillement peut être attribué à des cycles d'adsorption et de désorption de γ -gliadines à l'interface monocouche-eau. Cette étape est transitoire, au bout d'un certain temps (variable avec la quantité de protéines injectée), le système se stabilise. Ainsi, des points distincts lumineux sont observés (cliché (c)). Ces points lumineux peuvent être attribués à des agrégats de γ -gliadines situés sous la monocouche de lipides puisque la pression interfaciale n'a pas augmenté suite à l'injection de protéines. L'expansion latérale des agrégats est limitée à

quelques microns de diamètre (5-10 μm), quelle que soit la quantité de gliadines injectée. Aucun recouvrement total de la monocouche lipidique par les protéines n'a jamais pu être observé. Le cliché (d) présente l'observation du système stabilisé, réalisée entre polariseur et analyseur croisés. Une image totalement noire est obtenue. Cela signifie que les agrégats de protéines sous la monocouche de lipide ne présentent pas de rugosité et sont plutôt plats. En effet, une rugosité de ces agrégats entraînerait une diffusion et une dépolarisation de la lumière réfléchie.

Ce comportement en plusieurs étapes est identique quelle soit la concentration de gliadines injectée. Des expériences similaires réalisées avec de la ω -gliadine ont donné lieu aux mêmes types d'observations. Ainsi, pour des pressions de monocouche de DMPC supérieures à 25 mN/m, il se produit une succession de cycles d'adsorption-désorption des gliadines sous la monocouche de DMPC qui conduit à la formation d'agrégats distincts et plats sous la monocouche. A l'état d'équilibre, l'interaction entre gliadines et membrane modèles est donc confirmée. On peut ajouter que les gliadines sont injectées sous forme soluble (eau-éthanol) dans une sous-phase aqueuse (tampon pH 7) dans laquelle elles sont majoritairement insolubles. Les études spectroscopiques ont montré que les gliadines n'avaient pas la même structure secondaire dans ces deux types de solvants. Il est fort probable que l'étape transitoire de "scintillement" soit due à l'effet du passage bon - mauvais solvant des protéines lors de la dilution et de l'évaporation de l'éthanol dans la sous-phase. Nous verrons plus tard que cette dilution de l'alcool est clairement observée sur les spectres PM-IRRAS.

Remarque : De façon générale, les clichés de la figure 13 sont plus sombres que ceux de la figure 12, bien que les acquisitions aient été réalisées avec le même temps d'obturation. Cela s'explique par le fait que le laser du microscope à Angle de Brewster utilisé a subi une perte de puissance au cours des travaux de thèse.

c) Etude de l'épaisseur des agrégats

L'évolution de l'épaisseur des agrégats de protéines formés sous la monocouche de DMPC a été étudiée par une analyse des niveaux de gris des images obtenues par microscopie à angle de Brewster. En effet, à partir des relations de Fresnel, il a été montré que la réflectivité était reliée à l'épaisseur du film interfacial et aux indices de réfraction du système (sous-phase et film interfacial)^{17,18}. En considérant les indices de réfraction du système constants, l'évolution de l'épaisseur des agrégats peut être étudiée par des mesures de réflectivité. La figure 14 présente l'évolution de la réflectivité moyenne des agrégats en fonction de la qualité (γ - ou ω -gliadine) et de la quantité de gliadines injectée dans la sous-phase. La ω -gliadine forme des agrégats sous la monocouche de DMPC qui ont une réflectivité faible et constante avec la quantité de protéines injectée, contrairement à la γ -gliadine qui forme des agrégats de réflectivité plus élevée qui augmente avec la quantité de protéines injectée. Cela montre clairement une différence de comportement entre les deux types de gliadine, en termes de croissance des agrégats formés sous la monocouche de lipide.

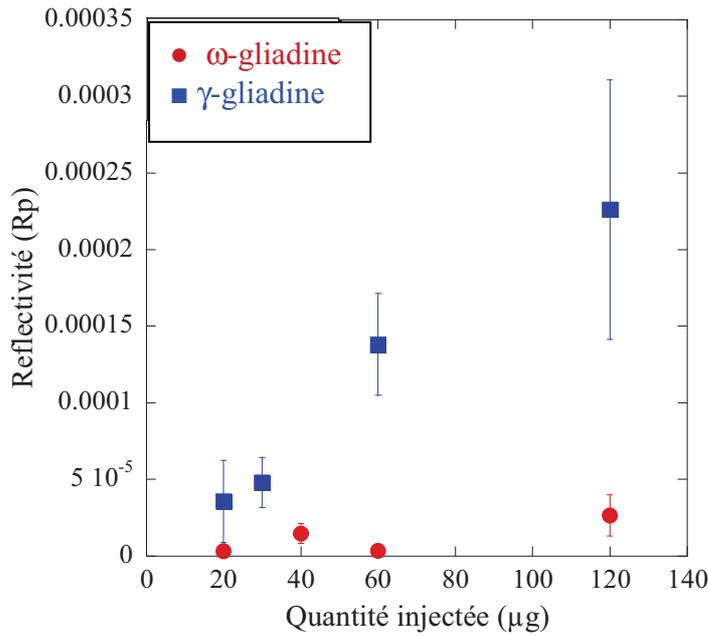


Figure 14: Représentation de l'évolution de la réflectivité moyenne des agrégats formés en fonction de la quantité de protéines injectée. ■ γ -gliadines, ◆ ω -gliadines.

La figure 15 présente l'évolution de la réflectivité en fonction de l'épaisseur d'un film interfacial, en considérant une sous-phase d'indice de réfraction égal à 1.333 et un film interfacial d'indice 1.47 (indice moyen des lipides et protéines). Deux types de longueurs d'onde ont été considérés : 532 nm pour le cas d'un laser vert, et 632.8 nm pour un laser rouge. Ces valeurs de réflectivité ont été calculées grâce à un logiciel développé par Thierry Buffeteau¹⁹. Cette figure montre clairement qu'à une réflectivité donnée correspond plusieurs épaisseurs.

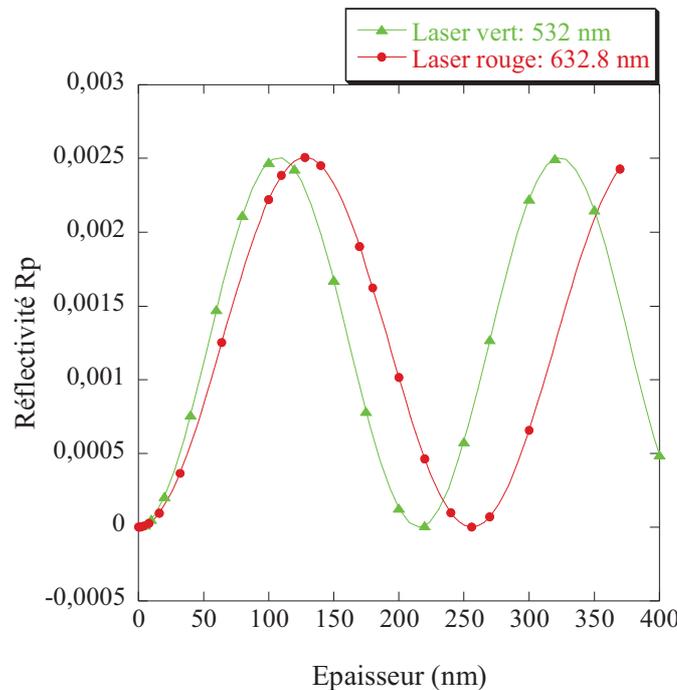


Figure 15 : Evolution de la réflectivité R_p en fonction de l'épaisseur d'objet à l'interface air-eau d'indice $n=1.47$ à différentes longueurs d'onde de laser : ▲ $\lambda=532$ nm, ● $\lambda=632.8$ nm

Idéalement, il faudrait donc travailler avec plusieurs longueurs d'onde incidentes pour déterminer une épaisseur à partir d'une valeur de réflectivité en connaissant les indices de réfraction du système. Cependant, notre dispositif étant équipé uniquement d'un laser vert, nous avons donc dû faire des hypothèses. Dans le cas de la γ -gliadine, la réflectivité augmentant avec la quantité de protéines injectée, nous avons suggéré une augmentation d'épaisseur. Dans la gamme d'épaisseurs présentées sur la figure 15, pour un laser vert, deux domaines présentent une réflectivité qui augmente avec l'épaisseur : entre 0 et 100 nm, et entre 220 et 320 nm. Cependant, en supposant que les agrégats croissent progressivement avec la quantité de protéines injectées, pour obtenir des épaisseurs d'une gamme de 200 à 300 nm, il faudrait que les réflectivités aient d'abord augmenté puis diminué pour atteindre une telle gamme d'épaisseurs. Lors de nos expériences nous n'avons jamais observé de diminution de réflectivité. De plus, pour la gamme de quantités de protéines testées, nous avons des valeurs de réflectivité très faibles, comprises entre 5.10^{-5} et 5.10^{-4} . Ces arguments nous orientent donc plutôt vers des agrégats de faible épaisseur. En utilisant la relation qui relie réflectivité et épaisseur pour des films très fins (cf chapitre 2), nous obtenons des valeurs d'épaisseur comprises entre 8 et 20 nm pour la γ -gliadine et de l'ordre de 6 nm pour la ω -gliadine. En prenant en compte l'épaisseur de la monocouche de DMPC qui est de ~ 2.5 nm, nous avons des agrégats de γ -gliadine qui croissent en épaisseur de 5.5 à 17.5 nm, et des agrégats de ω -gliadine qui ont une épaisseur constante de l'ordre de 3 nm. En comparant ces valeurs à celles obtenues pour des gliadines injectées à l'interface air-eau (chapitre 3), ces résultats suggèrent que les γ -gliadines peuvent former des agrégats "épais" par croissance en épaisseur de monocouches, alors que les ω -gliadines forment essentiellement des monocouches.

4. Mesures PM-IRRAS

Afin d'étudier la structure secondaire des gliadines agrégées sous une monocouche de DMPC à $\Pi = 35$ mN/m, et les modifications potentielles de la monocouche, des mesures de spectroscopie PM-IRRAS ont été réalisées.

La figure 16 présente le spectre PM-IRRAS d'une monocouche de DMPC à l'interface air-eau de pression $\Pi = 35$ mN/m. Les bandes caractéristiques de ce phospholipide sont observées:

- 1729 cm^{-1} : vibrations d'élongation de la liaison C=O ester.
- 1468 cm^{-1} : vibrations de déformation des CH_2 .
- 1230 cm^{-1} : vibration d'élongation antisymétrique des P=O.
- 1086 cm^{-1} : vibration d'élongation symétrique des P=O.
- 1058 cm^{-1} : vibration d'élongation de la liaison C-O-P.
- 973 cm^{-1} : vibration d'élongation antisymétrique des CN.

Ce spectre est en accord avec ceux obtenus dans la littérature²⁰.

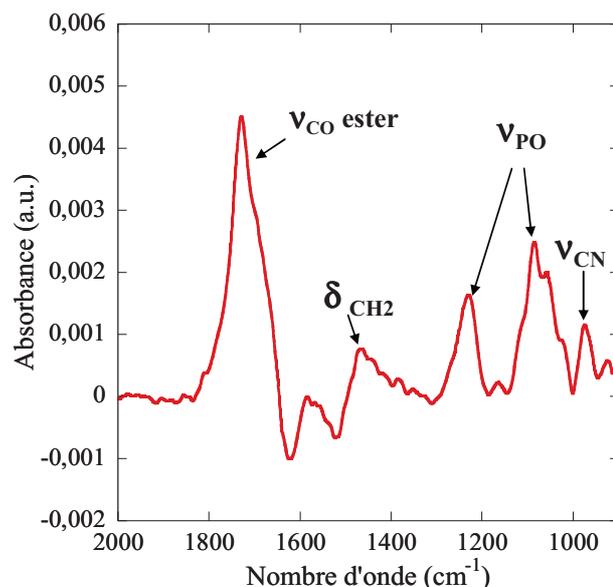


Figure 16 : Spectre PM-IRRAS d'une monocouche de DMPC comprimée à $\Pi = 35$ mN/m

Les gliadines injectées étant solubilisées dans un mélange eau-éthanol, des mesures préliminaires, consistant à injecter le solvant seul sous la monocouche de DMPC, ont été réalisées. Ensuite, une solution de γ -gliadine a été utilisée (1 mg/ml). La figure 17 présente les spectres PM-IRRAS obtenus à différents temps après l'injection (injection de 40 μ L). Ces spectres sont normalisés par le spectre de la monocouche de DMPC acquis juste avant l'injection des solutions dans la sous-phase.

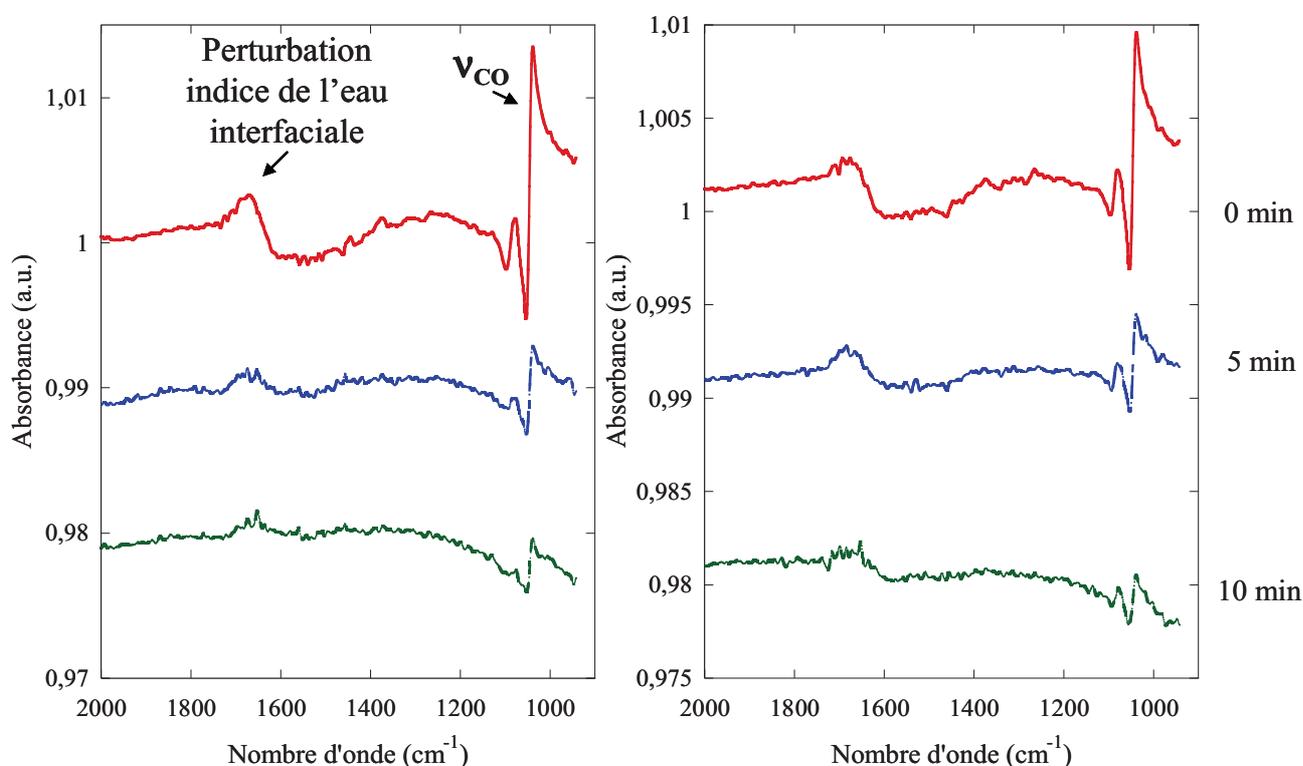


Figure 17 : Spectres PM-IRRAS d'une solution eau-éthanol (à gauche) et d'une solution de γ -gliadine (à droite), injectées sous une monocouche de DMPC à $\Pi = 35$ mN/m. Evolution des spectres dans le temps après injection (0, 5 et 10 minutes). Spectres normalisés par le spectre de la monocouche de DMPC avant injection de solution dans la sous-phase.

Au temps initial, sur le spectre du solvant (eau-ethanol), un doublet très intense à 1090 cm^{-1} est observé, attribué à la vibration d'élongation des liaisons C-O de l'éthanol, et un changement de ligne de base autour de 1650 cm^{-1} . Ce changement de ligne de base peut être attribué à une modification de l'indice de réfraction de l'eau interfaciale. En effet, l'eau a une bande d'absorption centrée autour de 1640 cm^{-1} , qui correspond à la position où le spectre PM-IRRAS brut change de façon abrupte (bande positive suivie immédiatement d'une bande négative). Ainsi une modification de l'indice de réfraction de l'eau dans cette gamme de fréquence peut expliquer le changement de ligne de base observé. L'évolution du spectre dans le temps indique une évaporation de l'éthanol, puisque la bande à 1090 cm^{-1} décroît au cours du temps. De plus, la variation de ligne de base diminue également. Cela confirme donc que cet effet est lié à la présence de l'éthanol. A droite, sont représentés les spectres obtenus suite à l'injection d'une solution de γ -gliadine. On retrouve exactement les mêmes spectres que pour l'injection du solvant seul. La bande amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) de la protéine, attendue dans la même gamme de longueurs d'onde que le changement de ligne de base, n'est pas discernée. Cela peut s'expliquer par le fait que les agrégats de protéines ne recouvrent pas toute la surface de la monocouche de DMPC, et qu'il n'y a donc pas suffisamment de signal pour observer les modes de vibration de la protéine. De plus, les mesures d'épaisseur des agrégats suggèrent une faible épaisseur. Ainsi, connaissant l'intensité des bandes amides observées lorsque la γ -gliadine est sous forme de monocouche homogène à l'interface air-eau (cf chapitre 3), il est impossible de s'attendre à des bandes de forte intensité dans le cas présent.

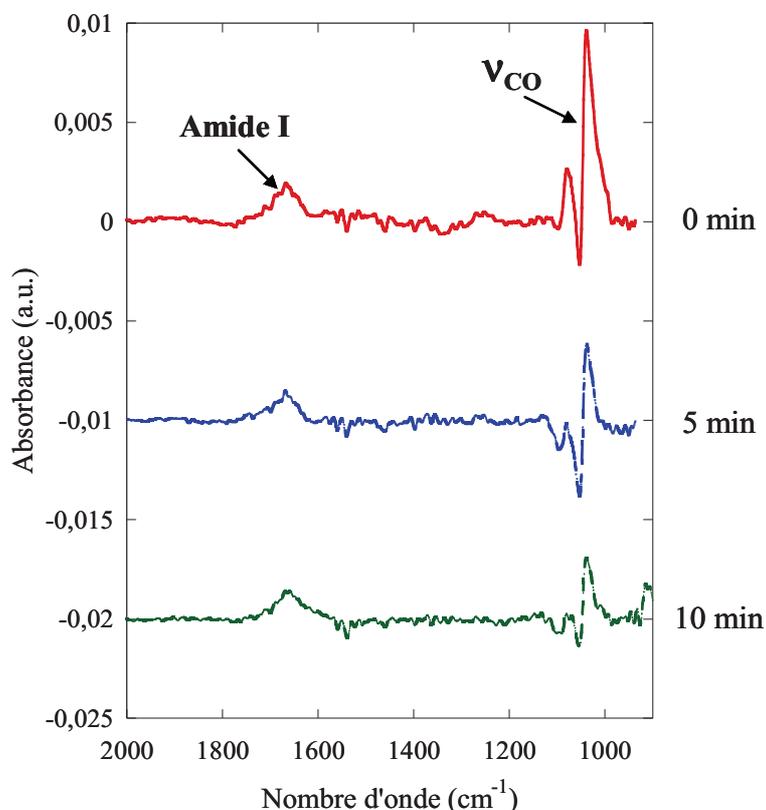


Figure 18 : Spectres PM-IRRAS de γ -gliadine injectée sous une monocouche de DMPC à $\Pi = 35\text{ mN/m}$. Evolution des spectres dans le temps après injection (0, 5 et 10 minutes). Spectres normalisés par le spectre de la monocouche de DMPC avant injection de solution dans la sous-phase.

Cependant, nous avons renouvelé cette expérience, et nous avons pu obtenir, à une seule reprise, une bande amide I caractéristique. Les spectres en fonction du temps sont présentés sur la figure 18. A 1090 cm^{-1} on observe la bande caractéristique de l'éthanol qui décroît en fonction du temps, alors que la bande à $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ ne diminue pas. Ces caractéristiques spectrales suggèrent qu'il s'agit bien de la bande amide I, caractéristique de la protéine. La présence de cette bande peut s'expliquer par le fait que la densité d'agrégats de protéines sous la monocouche de DMPC n'est pas homogène sous la monocouche, à cause du mode d'injection. En effet, des différences de densité pour une même expérience ont pu être observées sur différentes zones de la monocouche par microscopie à angle de Brewster.

En considérant que les spectres observés correspondent bien aux agrégats de gliadine sous la monocouche de lipides, nous avons étudié la forme de la bande amide I.

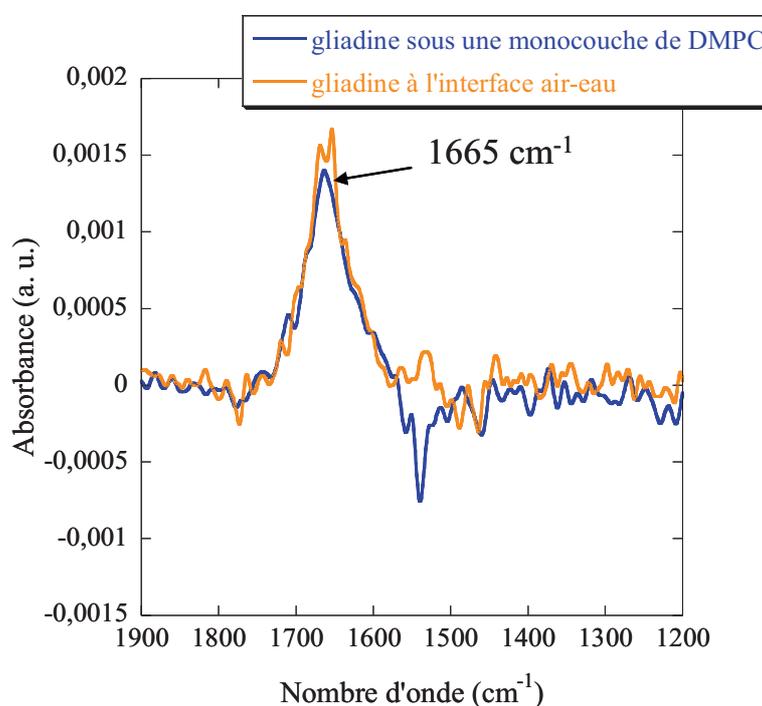


Figure 19 : Spectres PM-IRRAS de γ -gliadine à l'interface air-eau ($A = 6200\text{ \AA}^2/\text{molecule}$) en clair, et de γ -gliadine sous une monocouche de DMPC à $\Pi = 35\text{ mN/m}$, en foncé.

La figure 19 permet de comparer la forme de cette bande amide I à celle observée lorsque la γ -gliadine est injectée à l'interface air-eau sans DMPC et que l'aire moléculaire est très grande ($6000\text{ \AA}^2/\text{molécule}$). Les formes de ces bandes sont très similaires. Toutes deux ont un maximum à 1665 cm^{-1} et une largeur identique. L'étude du spectre de la γ -gliadine à l'interface air-eau a permis de conclure à une structure riche en coudes β , et en petites hélices α orientées parallèlement à l'interface. Concernant la bande amide II (1530 cm^{-1}), une bande de très faible intensité est observée dans le cas de la γ -gliadine à l'interface air-eau, alors que sous la monocouche de DMPC, la contribution est négative. Cette contribution négative peut être attribuée à la modification de l'eau interfaciale non pas par l'éthanol puisqu'il est pratiquement évaporé, mais par les protéines hydratées sous la monocouche de DMPC. En effet, il a été précédemment observé que des protéines hydratées à l'interface air-eau pouvaient modifier l'indice de réfraction de l'eau à l'interface^{21,22}. Par ailleurs aucun signal

n'est observé aux longueurs d'ondes caractéristiques du DMPC. Cela laisse suggérer qu'il n'y a pas de modification importante de la monocouche avec l'adsorption des γ -gliadines.

L'ensemble des mesures de PM-IRRAS ont montré qu'il était très difficile d'obtenir un signal dû à l'adsorption des protéines dans notre système. En effet les protéines sont adsorbées localement sous la monocouche de DMPC, alors que le PM-IRRAS sonde une zone large de 30 mm². De plus, l'éthanol contenu dans le solvant de la protéine induit une modification de la ligne de base dans la même gamme de longueurs d'onde que les bandes amides. Cependant, grâce à la densité variable des agrégats sous la monocouche de DMPC, une série de mesure PM-IRRAS de la protéine a pu être réalisée. Ces mesures semblent montrer que les agrégats de γ -gliadine sous la monocouche de DMPC ont la même structure que les γ -gliadines adsorbées à l'interface air-eau. Il s'agirait d'agrégats peu structurés, riche en coudes β et petites hélices α orientées parallèlement à l'interface. De plus, aucune modification du signal de la monocouche de DMPC n'a pu être observée. Cependant, ces résultats ne sont pas pleinement convaincants puisqu'ils n'ont pas pu être reproduits. Pour obtenir des mesures spectroscopiques fiables, nos systèmes devraient être transférés sur un substrat solide afin de réaliser des mesures spectroscopiques localement sur les agrégats par microscopie infrarouge ou Raman confocal.

5. Test d'une monocouche de DMPG

L'effet de la charge de la monocouche de phospholipides sur la formation des agrégats de gliadine a été testé à l'aide de monocouches de DMPG. Ce lipide, chargé négativement, représente 20 à 25 % des phospholipides du corpuscule protéique de maïs²³. A pH neutre, les gliadines sont très peu chargées, leurs charges nettes sont +2 pour la γ -gliadine et -4 pour la ω -gliadine.

Les essais ont été réalisés par tensiométrie et microscopie à angle de Brewster. Les mesures tensiométriques ont montré un comportement identique à celui observé avec une monocouche de DMPC. Pour une tension de surface de monocouche lipidique égale à 20 mN/m, il y a insertion des γ -gliadines à l'interface, contrairement à 40 mN/m où il n'y a pas d'insertion. La pression limite de changement de comportement se situe également entre 20 et 30 mN/m, mais n'a pas été précisément déterminée. Concernant les observations microscopiques, à $\Pi = 35$ mN/m le comportement général apparaît identique à celui observé dans le cas du DMPC (Tableau 1). Après un court temps d'induction, un scintillement apparaît, puis laisse place à la formation d'agrégats distincts. Pour l'injection d'une grande quantité de gliadines dans la sous-phase (400 μ g), la différence de comportement, en termes d'épaisseur des agrégats, entre γ - et ω -gliadines est retrouvée. En effet, la réflectivité des agrégats de γ -gliadine est beaucoup plus importante que celle des ω -gliadines. Cette observation montre qu'il y a également croissance des agrégats de γ -gliadine, contrairement aux ω -gliadines, sous une monocouche de DMPG. L'unique différence qui a pu être notée est la durée du "scintillement". En effet, dans le cas de la γ -gliadine injectée sous une monocouche de DMPG, un scintillement très court est observé, la durée apparaît 10 fois plus courte avec le DMPG qu'avec le DMPC. Cependant, la variation de la durée de scintillement n'est pas

observée dans le cas de la ω -gliadine. Ainsi, très peu de différences sont observées entre les systèmes constitués de DMPC et ceux constitués de DMPG. Cela suggère que l'adsorption des gliadines sous des monocouches de phospholipides n'est pas dirigée par des interactions électrostatiques. Seule une faible interaction électrostatique peut être proposée dans le cas de la γ -gliadine, où la formation des agrégats apparaît plus rapide en présence de DMPG.

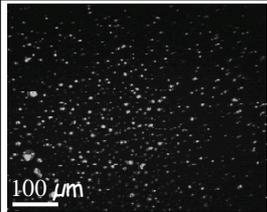
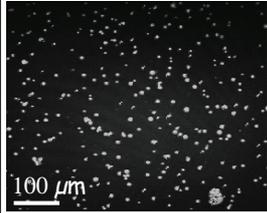
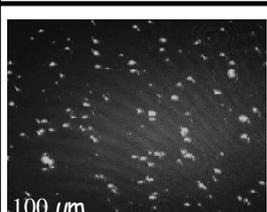
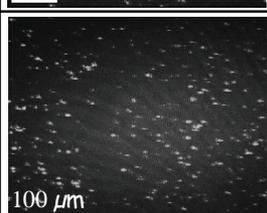
Protéine	Monocouche	Scintillement	Réfectivité	Observation
γ -gliadine ++	DMPC +-	Intense et long ~ 2000s	$R \sim 2,3 \cdot 10^{-4}$	
γ -gliadine ++	DMPG -	Intense et très court ~ 200s	$R \sim 2,8 \cdot 10^{-4}$	
ω -gliadine ----	DMPC +-	Faible et court ~ 1000s	$R \sim 2,7 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 6 \cdot 10^{-6}$)	
ω -gliadine ----	DMPG -	Faible et court ~ 1000s	$R \sim 2,8 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 6 \cdot 10^{-6}$)	

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des observations réalisées par microscopie à angle de Brewster sur des systèmes formulés avec des monocouches de DMPC et de DMPG, sous lesquels ont été injectés γ et ω -gliadines. (Images réalisées avec de la γ -gliadine, vitesse d'acquisition : 1/1000 s, Images réalisées avec de la ω -gliadine, vitesse d'acquisition : 1/50 s)

6. Transfert sur substrat pour observation en Microscopie à Force Atomique (AFM)

Afin d'observer la structure fine des agrégats de gliadine formés sous une monocouche de DMPC, des expériences d'AFM ont été réalisées. Pour cela, un transfert de nos systèmes sur un substrat était nécessaire. Le protocole retenu pour les observations est le suivant. Le transfert est réalisé par la technique de Langmuir-Schaeffer²⁴, i.e. le substrat solide est maintenu par dépression à l'aide d'une pompe à eau, à l'extrémité d'un cône en plastique. Il

est ensuite approché parallèlement à l'interface air-eau et mis en contact quelques secondes avec la couche pour assurer le transfert. Le substrat est ensuite retiré et immédiatement disposé dans la cellule liquide du dispositif AFM. Cette technique permet d'obtenir la monocouche lipidique adsorbée sur le substrat et les agrégats de protéines à portée de pointe d'AFM. Le substrat utilisé est du graphite (HOPG), de nature hydrophobe, de façon à favoriser les interactions entre substrat et chaînes aliphatiques des phospholipides. Enfin, les expériences sont réalisées en milieu aqueux pour stabiliser les têtes polaires des phospholipides formant la monocouche lipidique. L'acquisition AFM est réalisée en mode contact.

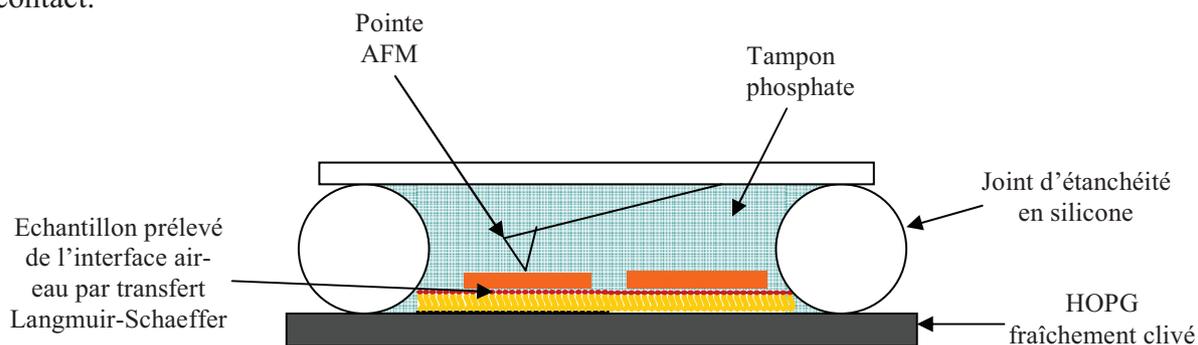


Figure 20 : Représentation schématique du système étudié par AFM liquide : un substrat de graphite (HOPG) sur lequel des gliadines, préalablement adsorbée sous une monocouche de lipides à l'interface air-eau, ont été transférées par la technique de Langmuir-Schaeffer.

a) Monocouche lipidique

Dans un premier temps, des transferts sur substrat solide et observation par AFM ont été réalisés selon le protocole défini précédemment pour une monocouche de DMPC à l'interface air-eau. La pression interfaciale de la monocouche était de 40 mN/m et la sous-phase était un tampon phosphate pH 7.2, 0.05 M. La figure 21 présente des clichés AFM, avec différentes échelles, obtenus pour une monocouche de DMPC. Un recouvrement homogène du substrat est observé. Les marches du HOPG sont visibles. Le transfert de la monocouche de DMPC semble donc être bien réalisé, et nous indique l'aspect d'une monocouche de DMPC à 40 mN/m transférée et observée par AFM.

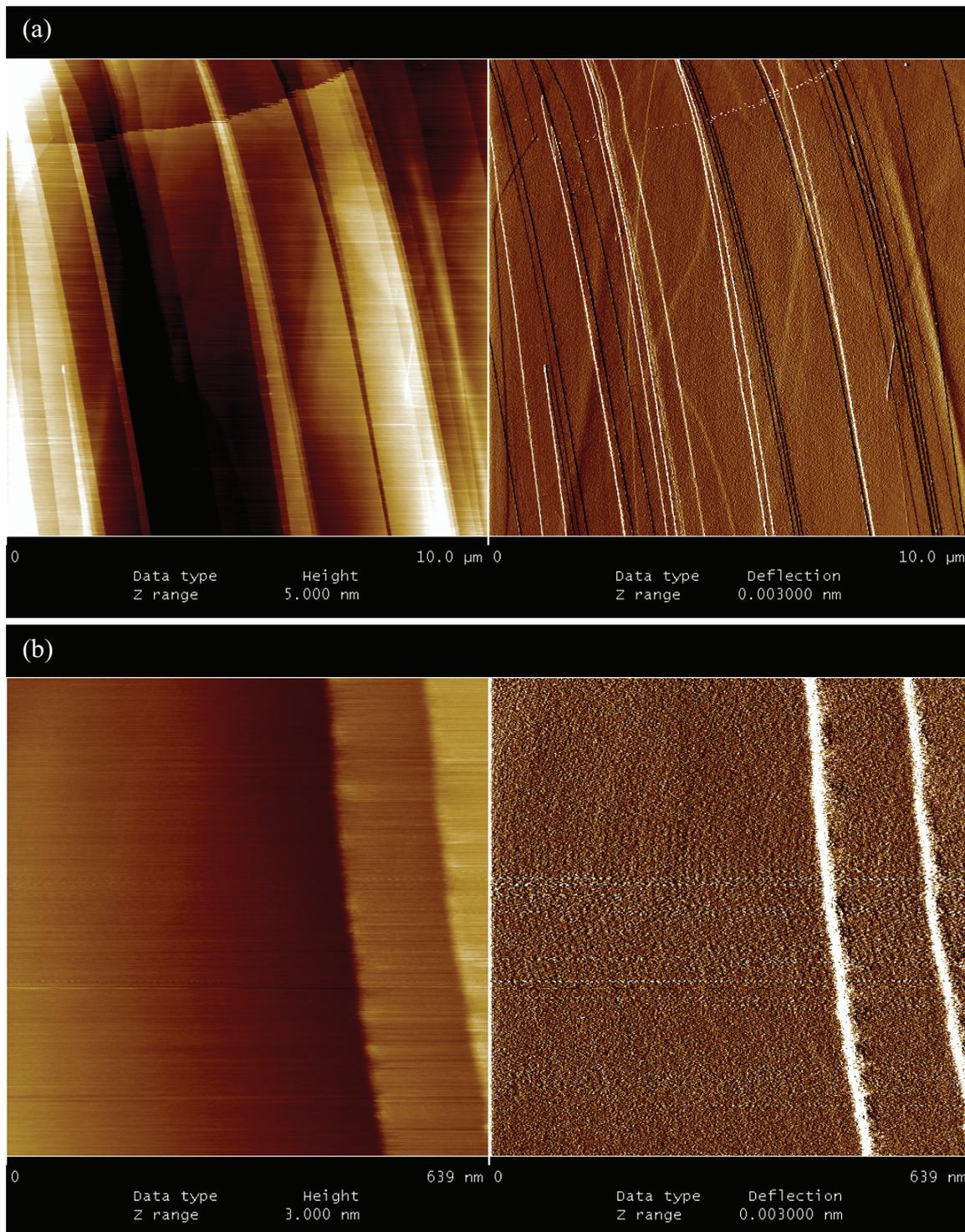


Figure 21 : Observation par AFM liquide (mode contact) d'une monocouche de DMPC à 40 mN/m transférée de l'interface air-eau par la technique de Langmuir Schaeffer. Substrat : mica fraîchement clivé, milieu : tampon phosphate pH 7,2 0,05M. (a) image 10x10 μm, (b) image 639x639 nm.

b) Monocouche lipidique + γ -gliadine

Des expériences ont été réalisées sur des systèmes de monocouche de DMPC similaires ayant reçu une injection de 30 μg de γ -gliadines dans la sous-phase. La figure 22 présente les observations réalisées par AFM.

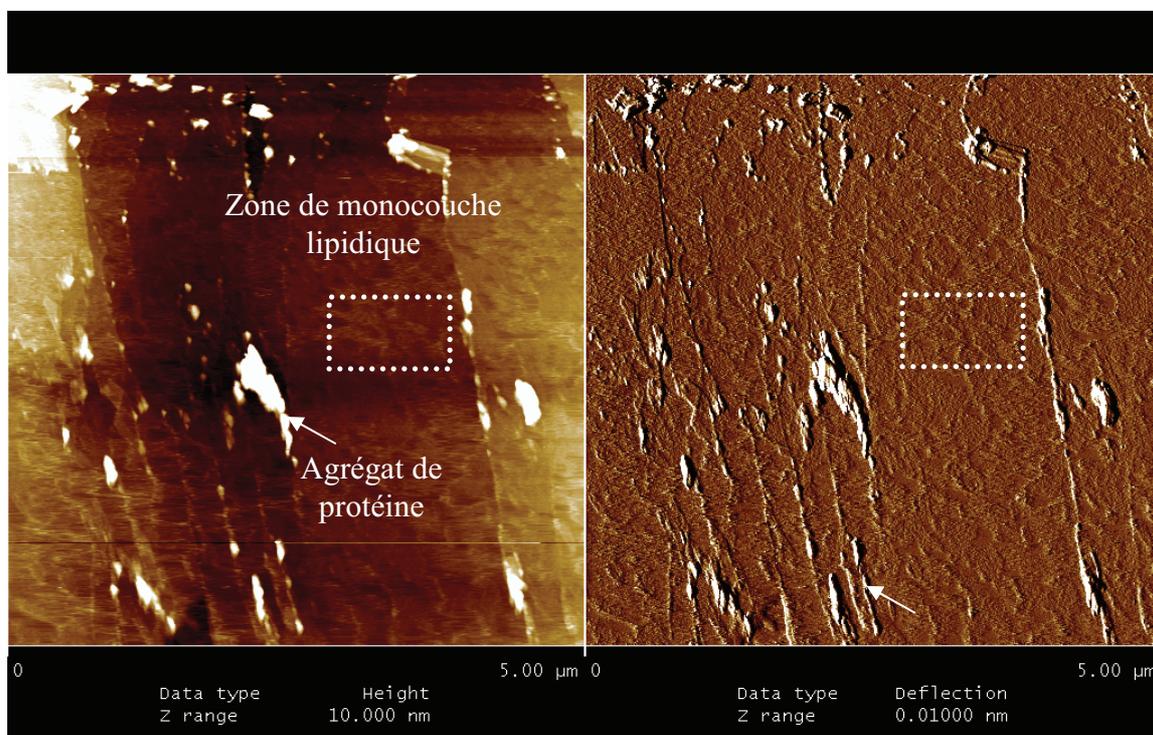


Figure 22 : Observation par AFM liquide (mode contact) de γ -gliadines injectées sous une monocouche de DMPC à 40 mN/m transférée de l'interface air-eau par la technique de Langmuir Schaeffer. Substrat : mica fraîchement clivé, milieu : tampon phosphate pH 7,2, 0.05 M. Image 5x5 μm .

Deux principaux types d'épaisseurs apparaissent sur l'image de hauteur (image de gauche). Des épaisseurs inférieures à 10 nm qui apparaissent en marron plus ou moins foncé, et des épaisseurs supérieures à 10 nm. Etant donné les observations réalisées sur monocouche de lipides simple, les épaisseurs élevées peuvent être attribuées à des agrégats protéiques, alors que les épaisseurs plus faibles peuvent être attribuées au DMPC. Les agrégats protéiques présentent des épaisseurs de 15 nm en moyenne et s'étalent sur plusieurs centaines de nanomètres de large. Ainsi, la gamme d'épaisseurs observée en AFM correspond à celle calculée par des mesures de réflectivité. Cependant les expansions latérales des agrégats, observées sur ce cliché sont moins importantes que celles mesurées par BAM. En effet, l'observation AFM a pu être réalisée sur une zone où il n'y a pas d'agrégats de grande dimension latérale, et la résolution de la microscopie optique ne permet pas d'observer des agrégats d'une centaine de nanomètres de diamètre. Par ailleurs, le fond, de faible épaisseur, n'est pas homogène (surtout en déflexion : image de droite) ; des trous dans la monocouche de lipides semblent apparaître. Cela suggère donc un mauvais transfert du film interfacial sur le substrat. Ce mauvais transfert peut être expliqué par le fait que cet essai ait été réalisé à partir d'une monocouche préparée dans la petite cuve circulaire qui ne permet de réaliser des

essais qu'à aire constante. En effet, pour des opérations de transfert, il est préférable de travailler à pression constante afin de limiter la perturbation du système lors du transfert. Des essais supplémentaires devraient donc être effectués, à l'aide d'une cuve de Langmuir équipée d'une barrière de compression pilotée par un logiciel, afin de maintenir la pression interfaciale constante.

7. Bilan

Les études réalisées à l'aide de monocouches de phospholipides ont permis de montrer qu'à des pressions de monocouches semblables à celles des membranes biologiques, les gliadines s'adsorbaient sur les membranes modèles. En effet, un couplage de mesures tensiométriques et microscopiques ont permis de prouver la formation d'agrégats de gliadines sous des monocouches de DMPC et DMPG. La caractérisation de ces agrégats a été réalisée par l'étude de leurs propriétés optiques, mesurées par microscopie à angle de Brewster. Le caractère lisse et plat de ces objets a été déterminé par des observations en polariseur et analyseur croisés, alors qu'une estimation des épaisseurs a pu être réalisée grâce à des mesures de réflectance. Ces mesures ont permis de suggérer que les gliadines s'adsorbaient sous forme d'agrégats de diamètre limité sous la monocouche de lipides. Dans le cas de la ω -gliadine, les agrégats apparaissent stables sous forme de monocouches, alors que les agrégats de γ -gliadines, initialement sous forme de monocouches, peuvent croître en épaisseur lorsqu'on augmente la quantité de protéines dans le système. La similarité de comportement des gliadines sous des monocouches de DMPC et de DMPG a permis de montrer que l'interaction membrane-gliadine n'était pas dominée par des interactions de type électrostatiques. Par ailleurs, des mesures spectroscopiques ont été entreprises par PM-IRRAS, pour étudier la structure secondaire des agrégats de protéines adsorbés, et les modifications de la monocouche de lipides. Bien que les expériences aient souffert d'un manque de signal, une série de mesures a permis de montrer que les γ -gliadines adsorbées sous une monocouche de DMPC, avaient la même structure secondaire que lorsqu'elles se trouvaient à l'interface air-eau à haute aire moléculaire. Cela suggère qu'adsorbées sur les deux types d'interfaces, les protéines sont sous une forme peu structurée, étalées sur l'interface. Afin de préciser l'étude de ces agrégats de gliadines par AFM et spectroscopie locale (microspectroscopie IR ou Raman confocal), des transferts de ces systèmes sur substrat solide seraient nécessaires. Pour cela, une réflexion et des essais préliminaires sur le mode de transfert ont été réalisés, mais le travail reste à compléter.

L'ensemble de ces résultats montre que le comportement des gliadines est différent à l'interface air-eau et à l'interface membrane-eau. En effet, l'air est beaucoup plus hydrophobe que les têtes phosphates des lipides. Cette différence se traduit par la formation d'un film homogène sur l'ensemble de l'interface air-eau, alors qu'à l'interface membrane-eau des agrégats de taille finie sont observés. Cela peut s'expliquer par une différence de tension de ligne (équivalent 2D de la tension de surface) entre un film de gliadines adsorbé à l'interface air-eau et un film adsorbé sous une monocouche de lipides²⁵. Toutefois, certaines similitudes entre les deux types d'interfaces peuvent être notées. En effet, sur les deux types d'interfaces

il y a adsorption des gliadines sous forme de monocouches dans lesquelles les protéines seraient peu structurées. De plus, dans les deux cas, la capacité d'accumulation des γ -gliadines a pu être mise en évidence, contrairement aux ω -gliadines. Ce comportement peut être expliqué par la différence d'activité de surface des deux types de gliadines. De plus, étant donné le caractère amphiphile des γ -gliadines, un modèle d'auto-assemblage peut être proposé pour décrire la croissance des agrégats (figure 23).

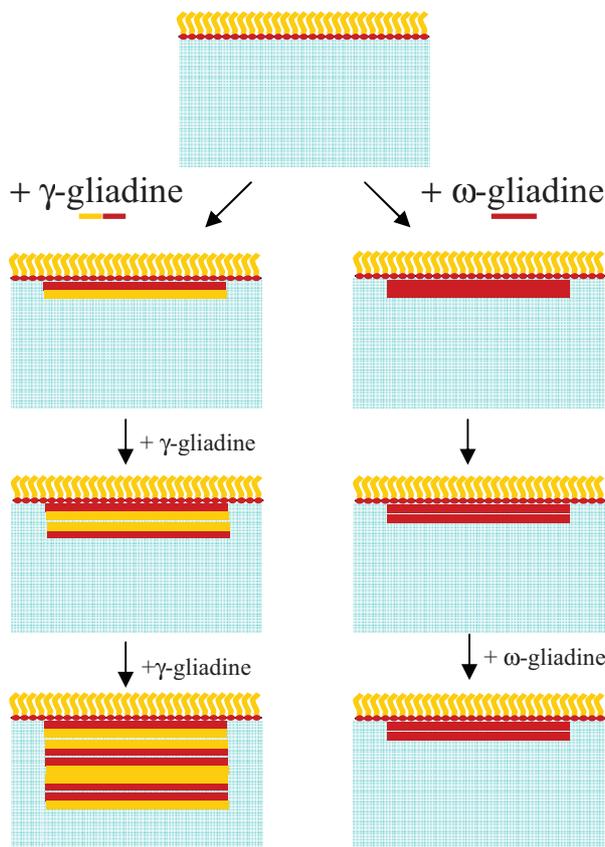


Figure 23 : Modèle d'auto-assemblage des gliadines sous une monocouche de DMPC basé sur des interactions de type hydrophobe. En rouge sont représentés les domaines hydrophiles des lipides et des protéines, en jaune les domaines hydrophobes.

Ce modèle est basé sur les différences d'hydrophobicité entre les domaines de γ -gliadine et de ω -gliadine. En effet, dans le cas de la γ -gliadine, qui présente deux domaines distincts dont les hydrophobicités sont significativement différentes, il y aurait adsorption des premières protéines sur la monocouche via le domaine répété "hydrophile", puis croissance de la monocouche, en épaisseur, via des interactions hydrophobes entre les domaines globulaires des protéines de la première et de la seconde couche. Et ainsi de suite, une structure en multicouche serait formée. Dans le cas de la ω -gliadine qui ne comporte qu'un domaine répété, plutôt hydrophile, il y aurait adsorption sous forme de monocouche, mais pas de croissance par défaut de domaine hydrophobe. Des expériences complémentaires d'AFM et de microspectroscopie-infrarouge devraient permettre de valider ou d'infirmer ce modèle.

C. Conclusion

Afin d'étudier l'interaction entre gliadines et membrane biologique, deux types de systèmes modèles ont été utilisés dans cette thèse. Le premier, basé sur des phases lamellaires, a permis d'identifier l'existence d'une interaction entre membrane et gliadine, tout en discréditant l'hypothèse du confinement comme paramètre d'interaction. Le second modèle, basé sur des monocouches de lipides, a permis de caractériser le mode d'interaction entre membrane et gliadines. Ainsi, les gliadines s'assembleraient sous forme de monocouches via l'interface membranaire. Un mode de croissance en épaisseur des monocouches de γ -gliadine a pu être observé, contrairement aux ω -gliadines. Ainsi, un modèle d'auto-assemblage des gliadines, par des interactions hydrophobes a été proposé. Selon ce modèle, le domaine répété des gliadines serait responsable de l'interaction avec les membranes. Cette suggestion est en accord avec plusieurs types de résultats. En effet, d'une part, plusieurs équipes de biologistes ont montré que le domaine N-terminal, contenant la séquence répétée des prolamines était nécessaire à la formation des corpuscules protéiques par la voie de l'accumulation dans le RE, que ce soit chez le blé^{26,27}, ou chez le maïs²⁸. D'autre part, des mesures biophysiques réalisées avec des zéines (protéines de réserve du maïs) ont montré que le domaine répété interagissait avec des membranes et pourrait être à l'origine de la formation des corpuscules protéiques²⁹. De plus, le domaine C-terminal, non répété, serait nécessaire à l'accumulation des protéines via l'interface. Ainsi, cette étude a permis de valider l'hypothèse d'une interaction entre gliadines et membrane qui pourrait être à l'origine de la formation des corpuscules protéiques. Néanmoins, des études complémentaires, basées sur la microscopie AFM et la spectroscopie IR en particulier, autoriseraient la validation du modèle proposé.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ Levanony, Rubin, Altschuler, Galili, *The Journal of Cell Biology* **1992**, 119, 5, 1117-1128.
- ² Freyssingas, *Thèse de l'Université Bordeaux I* **1994**.
- ³ Moreau, *Thèse de l'Université Bordeaux I* **2004**.
- ⁴ Thomson, Miles, Popineau, Harries, Shewry, Tatham, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1430, 359-366.
- ⁵ Karolin, Geddes, Wynne, Birch, *Meas. Sci. Technol.* **2002**, 13, 21-27.
- ⁶ Eichler, Klein, Langhans, *Chem. Phys. Lett.* **1979**, 67, 21-23.
- ⁷ Olivini, Beretta, Chirico, *Appl. Opt.* **2001**, 55, 311-317.
- ⁸ Moreau, van Effenterre, Navailles, Nallet, Roux, **2007**, en cours de publication.
- ⁹ Faxén, *Ann. Phys* **1922**, 68, 89.
- ¹⁰ Saffman, Delbrück, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 3111.

- ¹¹ Heinze, Vuillemin, Giroux, *Analysis* **1999**, 27, 549-551.
- ¹² Chourpa, Ducel, Richard, Dubois, Boury, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2616-2623.
- ¹³ Thomson, Miles, Popineau, Harries, Shewry and Tatham, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1430, 359-366.
- ¹⁴ Biswas, Marion, *Colloids and Surfaces B* **2006**, 53, 167-174.
- ¹⁵ Maget-Dana, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1462, 109-140.
- ¹⁶ Rakotomanga, Loiseau, Saint-Pierre-Chazalet *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1661, 2, 212-218.
- ¹⁷ De Mul, Mann, *Langmuir* **1998**, 14, 2455-2466.
- ¹⁸ Winsel, Honing, Lunkenheimer, Geggel, Witt, *Eur. Biophys. J.* **2003**, 32, 544-552.
- ¹⁹ Buffeteau, Desbat, *Applied Spectroscopy* **1989**, 43, 1027-1032.
- ²⁰ Cornut, Desbat, Turlet, Dufourcq, *Biophys. J.* **1996**, 70, 305-312.
- ²¹ Granbois, Desbat, Salesse, *Biophys. Chem.* **2000**, 88, 127-135.
- ²² Lavoie, Blaudez, Vaknin, Desbat, Ocko, Saleses, *Biophys. J.* **2002**, 83, 3558-3569.
- ²³ Shank, Su, Brglez, Boss, Dewey, Boston, *Plant Physiology* **2001**, 126, 267-277.
- ²⁴ Gaines, *"Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces"* **1966**, Wiley & Sons Ed.
- ²⁵ Wintersmith, Zou, Bernoff, Alexander, Mann, Kooijman, Mann, *Phys. Rev. E.* **2007**, 75, 061605.
- ²⁶ Rosenberg, Shimoni, Altschuler, Levanony, Volokita, Galili, *Plant Physiol.* **1993**, 102, 61-69.
- ²⁷ Altschuler, Rosenberg, Harel, Galili, *The Plant Cell* **1993**, 5, 443-450.
- ²⁸ Geli, Torrent, Ludevid, *The Plant Cell* **1994**, 6, 1911-1922.
- ²⁹ Kogan, Lopez, Cocera, Lopez-Iglesias, de la Maza, Giralt, *Biopolymers* **2004**, 73, 258-268.

Conclusion générale

Ce travail a consisté à mettre en place des approches biomimétiques de l'assemblage des protéines de réserve dans les corpuscules protéique afin d'étudier les mécanismes physico-chimiques pouvant entrer en jeu dans la genèse de ces organites. Plusieurs approches *in vitro* ont été utilisées pour étudier les interactions protéine-protéine et protéine-membrane dans des milieux aqueux, proches du contexte biologique.

Une première partie du travail a été consacrée à l'étude du comportement de protéines de réserve modèles, les γ - et ω -gliadines, dans des milieux aqueux. Plusieurs systèmes ont été adoptés afin d'étudier ces protéines en régime dilué et concentré, en volume et aux interfaces.

En volume, une solubilité partielle des protéines a été observée en eau et tampon phosphate. Des phases diluées et des phases denses de gliadines ont pu être mises en évidence et caractérisées. En milieu dilué, nous avons montré que la solution était caractérisée par un équilibre entre des monomères de protéines et des agrégats d'un rayon moyen de 200 nm. Cet équilibre dépend de la force ionique de la solution. Par ailleurs, l'utilisation d'un évaporateur microfluidique a permis de mettre en évidence différentes transitions de phase de type liquide-liquide en fonction de la concentration, de la force ionique et de la nature de la protéine. Des expériences préliminaires, réalisées par un couplage de ce dispositif avec de la spectroscopie Raman confocale, ont montré des potentialités prometteuses pour étudier les structures secondaires et les orientations spécifiques des protéines dans les différentes phases. En effet, ces essais ont permis de suggérer l'existence d'une orientation préférentielle des γ -gliadines par rapport à une interface hydrophile-hydrophobe.

A l'interface air-eau, les gliadines présentent une forte capacité d'adsorption. Des évolutions de leurs structures secondaires et de leurs orientations ont pu être mises en évidence en fonction du taux de compression, notamment pour la ω -gliadine. De plus, les deux types de gliadines ont montré des capacités différentes à former des systèmes épais à l'interface air-eau. Ces propriétés ont été reliées à la structure primaire de ces protéines. Afin de déterminer une éventuelle organisation des systèmes protéiques denses à l'interface air-eau, des expériences de réflectivité des rayons X en incidence rasante pourraient être envisagées.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, le comportement des gliadines en présence de membranes lipidiques a été étudié. Deux types de systèmes modèles ont été utilisés : des phases lamellaires de tensio-actifs et des monocouches lipidiques de Langmuir.

Une insertion partielle de monomères de γ -gliadines dans une phase lamellaire a été démontrée. L'étude de leur dynamique nous a permis d'identifier une interaction entre membrane et protéine, indépendante du niveau de confinement de la protéine.

L'étude réalisée avec des monocouches lipidiques a permis d'observer la formation de domaines protéiques denses sous la membrane. A faible concentration en protéines, ces domaines ont des épaisseurs monomériques pour les deux types de gliadines. A forte concentration, une croissance en épaisseur des domaines a pu être mesurée uniquement dans le cas des γ -gliadines. Le caractère amphiphile de la γ -gliadine permet d'avancer l'hypothèse d'un mécanisme de formation des domaines protéiques denses via une première étape d'interaction des domaines répétés de la protéine avec la membrane suivie d'une seconde étape d'empilement des protéines par alternance des domaines répétés et non répétés. Ainsi il y aurait formation d'un système multicouche hydrophile-hydrophobe. La présence d'un domaine répété hydrophile unique dans la séquence de la ω -gliadine n'autoriserait pas ce mode d'auto-association. Des expériences réalisées avec des monocouches lipidiques chargées différemment suggèrent que les interactions entre membrane et gliadines ne sont pas dominées par une interaction de type électrostatique. De plus, l'absence de modification du signal infrarouge de la monocouche lipidique lors de l'injection de gliadines dans la sous-phase montre des interactions faibles entre gliadines et membrane. Cependant, étant donné la faible intensité du signal lié à l'interaction protéine-membrane, des expériences de spectroscopie locale sur des systèmes transférés sur substrat solide devront être envisagées pour confirmer les premiers résultats. La maîtrise du transfert des systèmes sur substrat solide permettra également de compléter les expériences d'AFM pour sonder la structure fine des agrégats de gliadines adsorbés sous les monocouches de lipides.

Pour conclure, l'ensemble de ces travaux indique que l'assemblage des protéines de réserve de blé peut être principalement lié aux propriétés intrinsèques de ces protéines. Dans le cas des gliadines étudiées, le caractère insoluble et amphiphile de ces protéines semble fortement impliqué dans le mécanisme de formation de ces assemblages. L'agrégation des gliadines via une interface membranaire, tel qu'observé sous une monocouche de lipides, pourrait constituer l'étape d'assemblage des protéines observé dans le réticulum endoplasmique et donner lieu à la formation de corpuscules protéiques. Cependant, le modèle d'auto-assemblage proposé au terme de ce travail reste à confirmer en prouvant tout d'abord l'existence d'une organisation partielle dans les domaines protéiques denses obtenus par alternance périodique des domaines répétés et non répétés. En perspective générale, les approches développées pour cette problématique avec des compositions simples, pourront être complexifiées à partir de données biologiques pertinentes. Ainsi l'effet du polymorphisme des prolamines sur leur agrégation pourra être davantage étudié.

Annexe A : Structure des protéines

Les protéines sont des macromolécules naturelles formées d'un enchaînement ordonné d'acides α -aminés. Les acides aminés sont des molécules organiques comportant un groupe fonctionnel acide carboxylique et un groupe amine.

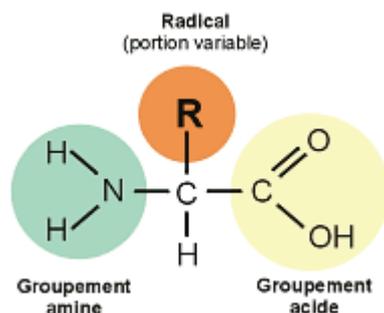


Figure 1 : Formule chimique d'un acide aminé

C'est la chaîne latérale R qui distingue les différents acides aminés. 20 acides aminés principaux participent à la synthèse des protéines naturelles, ils sont classés dans la figure 2 suivant leurs propriétés physico-chimiques et leur indice d'hydrophobicité.

Amino acid			Side chain	Hydrophobicity	Free Energy (kcal/mol) b	
				a	pH 8	pH 2
Ala	A	Alanine	CH ₃	1,80	-0,17	
Arg	R	Arginine	(CH ₂) ₂ NC(NH ₂) ₂	-4,50		-0,81
Asn	N	Asparagine	CH ₂ CONH ₂	-3,50	-0,42	
Asp	D	Aspartic Acid	CH ₂ COOH	-3,50	-1,23	0,07
Cys	C	Cysteine	CH ₂ SH	2,50	0,24	
Gln	Q	Glutamine	(CH ₂) ₂ CONH ₂	-3,50	-0,58	
Glu	E	Glutamic acid	(CH ₂) ₂ COOH	-3,50	-2,02	0,01
Gly	G	Glycine	H	-0,40	-0,01	
His	H	Histidine	CH ₂ (C ₃ N ₂ H ₃)cyc	-3,20	-0,17	-0,96
Ile	I	Isoleucine	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	4,50	0,31	
Leu	L	Leucine	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	3,80	0,56	
Lys	K	Lysine	(CH ₂) ₄ NH ₂	-3,90		-0,99
Met	M	Methionine	(CH ₂) ₂ SCH ₃	1,90	0,23	
Phe	F	Phenylalanine	CH ₂ (C ₆ H ₅)cyc	2,80	1,13	
Pro	P	Proline	(CH ₂) ₂ cyc	-1,60	-0,45	
Ser	S	Serine	CH ₂ OH	-0,80	-0,13	
Thr	T	Threonine	CHOHCH ₃	-0,70	-0,14	
Trp	W	Tryptophan	CH ₂ (C ₈ NH ₆)cyc	-0,90	1,85	
Tyr	Y	Tyrosine	CH ₂ (C ₆ H ₄)cycOH	-1,30	0,94	
Val	V	Valine	CH(CH ₃) ₂	4,20	-0,07	

a: from the molecular modeling package ViewerLite of Accelrys Inc

b: from Wimley & White, Nat Struct. Biol, 1996, 3:842-848

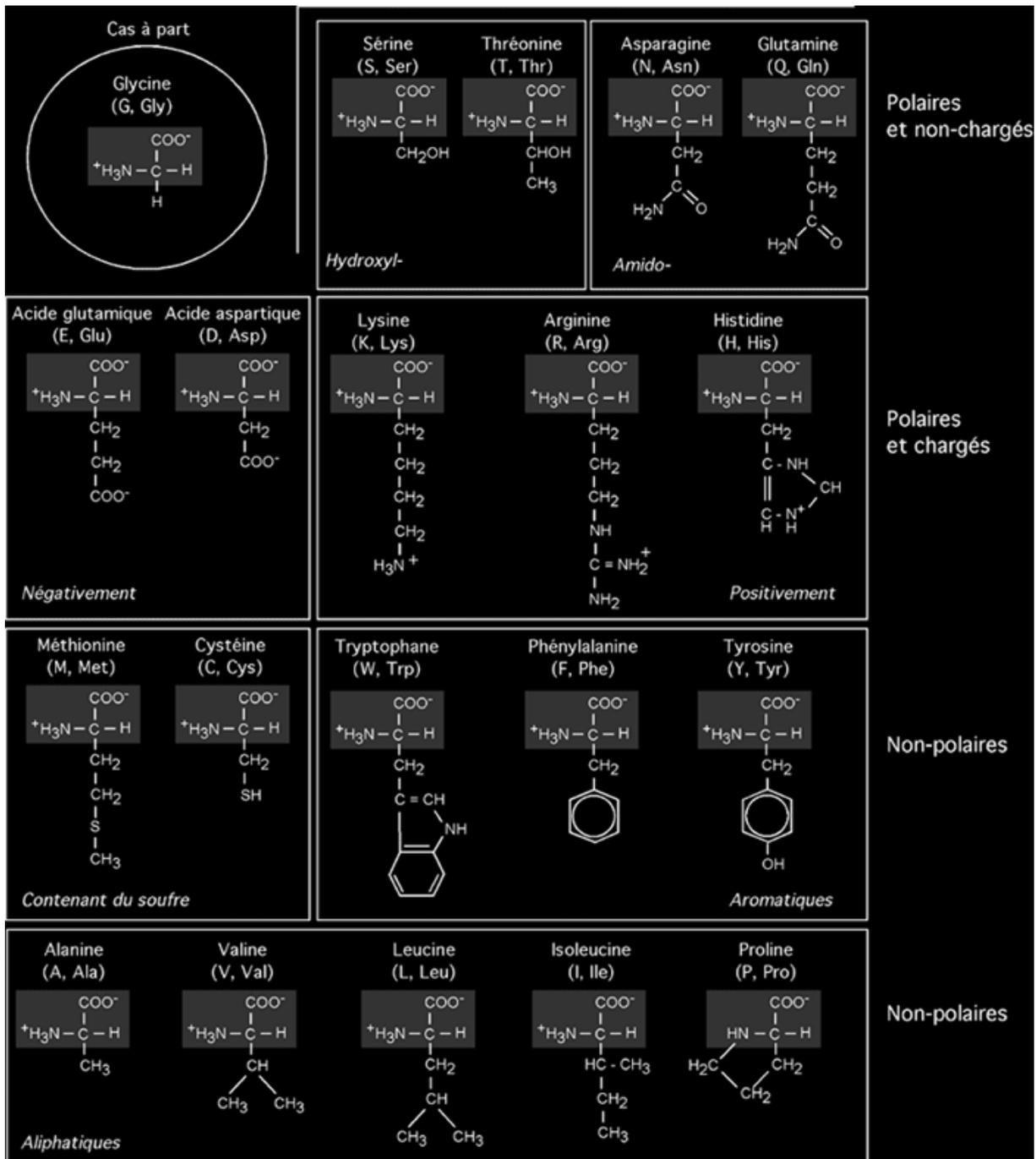
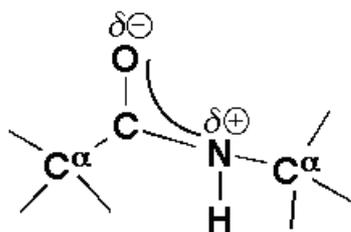


Figure 2 : Les 20 acides aminés constituant les protéines

On distingue 4 niveaux d'organisation dans les protéines, la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. La structure primaire constitue l'enchaînement ordonné d'acides aminés. Par convention, la séquence est donnée de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. La liaison peptidique présente des caractéristiques qui lui sont propres et qui induisent un nombre limité de conformations stables des protéines. Des études ont montré que la longueur de la liaison CN dans la liaison peptidique est de 1.32 Å, c'est-à-dire inférieure à une liaison simple ($d=1.47$ Å) et supérieure à une double liaison C=N ($d=1.25$ Å). La liaison peptidique a donc un

caractère double liaison comme le montre le schéma suivant, qui implique la quasi-coplanéité des atomes C, O, N et H.



E. jaspard (2005)

Figure 3 : Formes mésomères de la liaison peptidique

D'autre part, la position en trans des atomes O et H de la liaison peptidique est adoptée préférentiellement, car elle est plus stable de 16.7 kJ.mol^{-1} que la position cis. Ainsi les seuls degrés de liberté possibles sont les rotations autour des liaisons C-N et C-C, notées respectivement Φ et Ψ qui limitent le nombre de conformations stables que peuvent adopter les protéines.

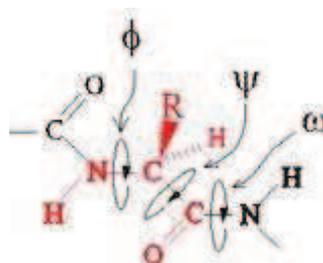


Figure 4 : Degrés de liberté de la liaison peptidique

Les conformations stables des angles Φ et Ψ sont répertoriées en vert dans le diagramme de Ramachandran présenté ci-dessous :

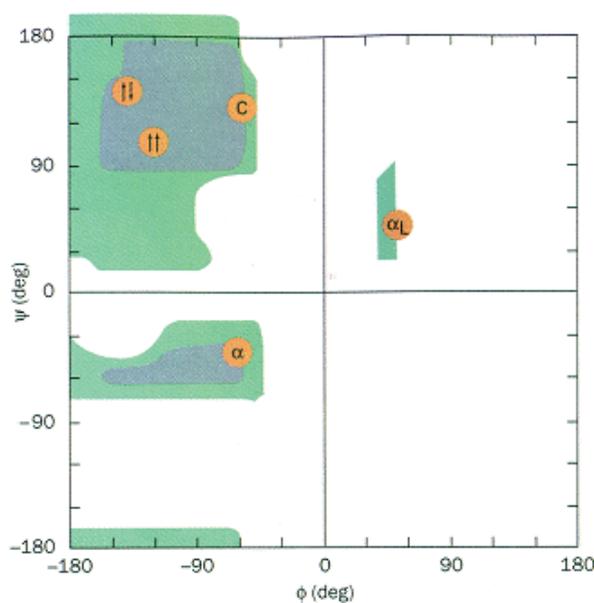


Figure 5 : Diagramme de Ramachandran avec positionnement de quelques structures secondaires : Hélice α (α), Hélice α gauche (α_L), Feuillettes β parallèles ($\uparrow\uparrow$) et anti-parallèles ($\uparrow\downarrow$), et hélice de collagène (c).

La structure secondaire est définie comme l'agencement régulier et répétitif dans l'espace de la chaîne carbonée principale de la chaîne polypeptidique. Elle résulte essentiellement de la formation de liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle d'une liaison peptidique d'un motif et de l'hydrogène de l'azote d'une liaison peptidique d'un autre motif. L'hélice α et le feuillet β sont les deux grands types de structures secondaires rencontrés dans les protéines. L'hélice α est stabilisée par la formation de liaisons hydrogènes, dirigées selon l'axe de l'hélice et qui s'établissent entre le groupe carbonyle du motif i et le groupe NH du motif $i+4$. Le pas de l'hélice α est de 3.6 unités d'acides aminés par tour ce qui correspond à une hauteur de 1.5 Å entre 2 monomères. Il faut donc cinq tours pour retrouver deux motifs superposables. Le feuillet β est constitué de deux chaînes polypeptidiques positionnées en vis-à-vis. Les liaisons hydrogènes s'établissent entre chaque brin ce qui engendre la formation d'une structure plissée en forme d'accordéon, les chaînes latérales R étant alternativement d'un côté et de l'autre du feuillet. Les brins β peuvent interagir de deux façons différentes pour former un feuillet : soit les deux brins sont orientés dans la même direction, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on parle de feuillet β parallèle ; soit les deux brins sont orientés de façon opposée, on parle alors de feuillet β anti-parallèle. Cette dernière forme est thermodynamiquement plus stable, et donc plus représentée dans les protéines.

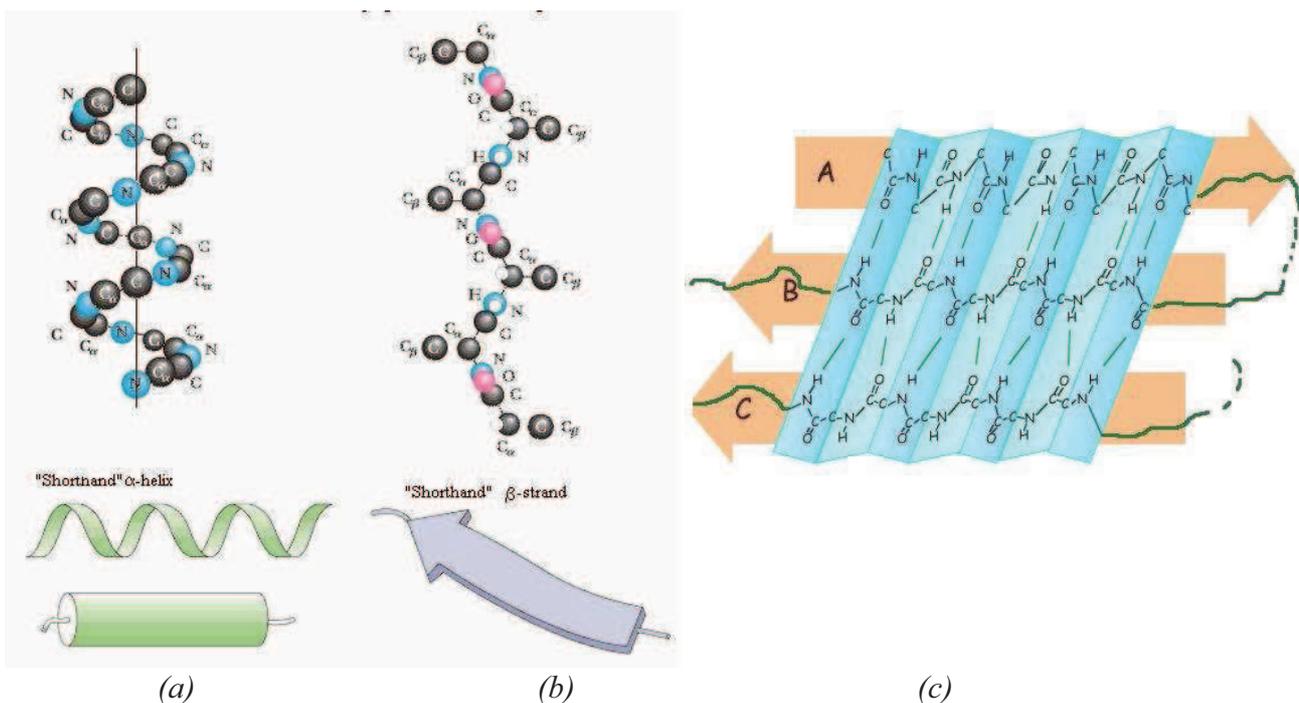


Figure 6 : Représentation de structures secondaires : (a) hélice α , (b) brin β , (c) feuillets β parallèle (BC) et antiparallèle (AB).

Il existe également un autre type de structure secondaire souvent rencontré chez les protéines : le coude β qui permet le repliement de la chaîne polypeptidique. Il est formé par quatre acides aminés successifs avec une liaison hydrogène entre le groupe carbonyle du premier et le groupe amino du dernier.

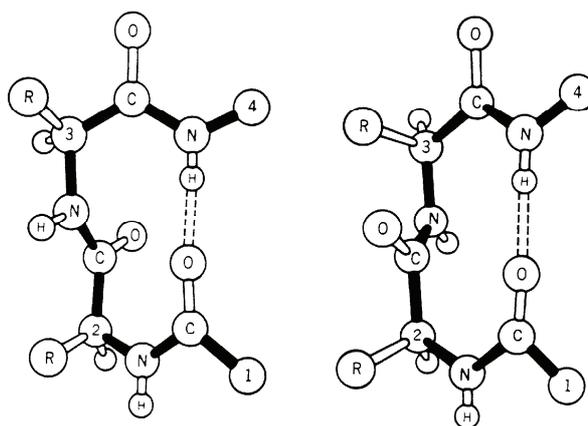


Figure 7 : Représentations de coude β

Les protéines riches en prolines, comme le collagène, sont capables de former des hélices de type PPII. Il s'agit de la forme d'hélice la plus stable formée par la polyproline. L'hélice de type PPII est une hélice gauche avec un pas de 3 résidus par tour. Il s'agit donc d'une hélice moins compacte que l'hélice α , et qui n'est pas stabilisée par des liaisons hydrogènes. Cette structure est caractérisée par les angles dièdres $\phi = -75^\circ$ et $\psi = 150^\circ$. Lorsque l'on regarde le diagramme de Ramachandran, on peut noter que la structure PPII a le même angle ϕ que les hélices α , et le même angle ψ que les feuillets β . On s'attend donc à ce que l'hélice PPII soit une structure intermédiaire lorsqu'il y a une transformation d'hélices α en feuillets β .

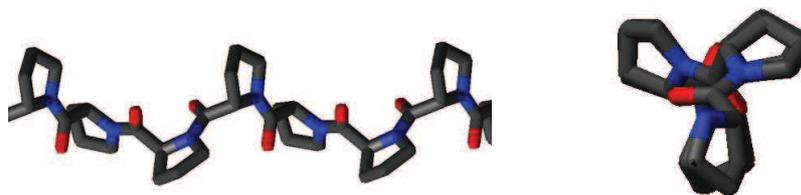


Figure 8 : Représentation de l'hélice de PPII (a) vue de côté (b) vue de dessus.

La structure tertiaire résulte de la façon dont les structures secondaires s'organisent dans l'espace.

La structure quaternaire, dans le cas des complexes protéiques, désigne l'arrangement et le regroupement dans l'espace des différentes chaînes polypeptidiques.

Annexe B : Spectroscopie Infrarouge des protéines

Les protéines sont de très grosses molécules, ce qui implique un très grand nombre de vibrations en spectroscopie d'absorption infrarouge. Cependant, il est possible de se limiter aux vibrations des groupements peptidiques des protéines qui absorbent dans le même domaine. Ces vibrations donnent de fortes bandes d'adsorption caractéristiques qu'on nomme communément bandes amide A et B pour les bandes d'absorption dans les hautes fréquences (supérieures à 3000 cm^{-1}) et bandes amides I à VII pour les bandes d'adsorption dans les basses fréquences (inférieures à 1700 cm^{-1}). On distingue les vibrations dans le plan de la liaison amide (bandes amide A et B, et bandes amide I à IV) et des vibrations hors du plan (bandes amide V à VII). Ce sont les bandes d'adsorption amide I et II qui sont utilisées pour l'analyse des spectres dans cette thèse car elles sont intenses et sensibles aux structures secondaires des protéines. La bande amide I est principalement localisée sur la vibration de la liaison C=O, alors que l'amide II résulte d'un couplage entre la déformation de la liaison N-H et de l'élongation de la liaison C-N. Les fréquences de ces bandes et leur description sont répertoriées dans le tableau suivant.

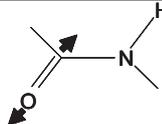
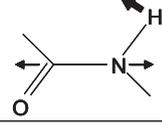
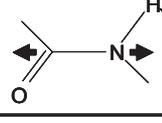
Bande de vibration	Description	Fréquence (cm-1)
Amide I		1700-1610
Amide II		1560-1510
Amide III		1310-1240

Figure 1 : Représentation des modes de vibration amide I, II et III de la liaison peptidique

Dans le cas de la structuration des chaînes polypeptidiques sous forme de structures régulières (hélices α , feuillets β , coudes β), il se produit un couplage entre les modes de vibration amide I et II de chaque unité répétitive, notamment à cause des liaisons hydrogènes qui interviennent entre motifs (hélices) ou entre chaînes (feuillets). De ce couplage résulte l'éclatement des modes amide I et II qui dépend de la conformation de la protéine. Pour l'hélice α , on trouve pour chaque mode de vibration, un moment de transition parallèle et perpendiculaire à l'axe de l'hélice. Pour les feuillets β , on attend un moment de transition parallèle et perpendiculaire à la direction des chaînes polypeptidiques. Dans le cas des feuillets β parallèles seul le moment de transition perpendiculaire aux chaînes est observable, alors que pour les feuillets β antiparallèles, on distingue les deux moments de transition. Ainsi, à partir d'un spectre d'adsorption, il est possible de différencier les formes hélices α , feuillets β , coudes β et

formes désordonnées. Les fréquences de vibration moyenne des principaux types de structures secondaires sont répertoriées dans le tableau suivant :

Structure secondaire	Fréquence de vibration amide I (cm^{-1})
Hélice α	1652-1662 (F)
Feuillet β parallèle	1630-1636 (F)
Feuillet β anti-parallèle	1685-1695 (f) 1630-1618 (F)
Coude β	1665-1685
Structure désordonnée	1652-1643 (L) *

Figure 2 : Fréquences caractéristiques¹ du mode amide I des principales structures secondaires. Les lettres F, f et L désignent respectivement les bandes de forte et faible intensité, et une bande large.

* abaissée en dessous de 1650 cm^{-1} en présence d'eau

¹ Goormaghtigh, Cabiaux and Ruyschaert, "Subcellular biochemistry", vol 23, Ed Hilderson, 1994.

Annexe C : Formulations des phases lamellaires

Echantillon	Masse gliadine (mg)	Masse membrane (mg)	Masse eau (mg)	% gliadine	% membrane	% eau	1/ Φ m	dw (Å)
1	0.49	335.92	249.30	0.08	57.24	42.67	1.75	22.14
2	0.51	291.00	291.20	0.09	50.03	49.88	2.00	29.61
3	0.51	259.20	323.70	0.09	44.48	55.43	2.25	37.02
4	0.49	234.20	349.50	0.09	40.12	59.79	2.49	44.27
5	0.51	211.80	369.50	0.08	36.36	63.56	2.75	51.92
6	0.50	181.00	409.00	0.08	31.02	68.90	3.22	65.97
7	0.50	155.00	438.60	0.08	26.11	73.81	3.83	83.95
8	0.51	117.20	473.10	0.08	19.92	80.00	5.02	119.30
9	0.51	96.90	486.10	0.09	16.60	83.31	6.02	149.05

PREMIX (membrane)

Masse C ₁₂ E ₅	Masse Hexanol
1.55	0.45

Tableau 1 : Formulations des échantillons de phases lamellaires de C12E5/Hexanol avec de la γ gliadine