



HAL
open science

Production, purification et caractérisation de la protéine Hsp 12 de *Saccharomyces cerevisiae*, une protéine impliquée dans la sucrosité du vin.

Antoine Léger

► To cite this version:

Antoine Léger. Production, purification et caractérisation de la protéine Hsp 12 de *Saccharomyces cerevisiae*, une protéine impliquée dans la sucrosité du vin.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0232 . tel-02438460

HAL Id: tel-02438460

<https://theses.hal.science/tel-02438460>

Submitted on 14 Jan 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale : Science de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biochimie

Antoine LÉGER

**Production, purification et caractérisation
de la protéine Hsp12 de *Saccharomyces cerevisiae*,
une protéine impliquée dans la sucrosité du vin**

Sous la direction de : Charlotte CABANNE

Soutenue le 19 Novembre 2019

Membres du jury :

M. GUILLOUET Stéphane, Professeur à l'INSA Toulouse, Président	Rapporteur
Mme IMBERT Isabelle, Maitre de conférences à l'Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mme ALFENORE Sandrine, Maitre de conférences à l'INSA Toulouse	Examineur
Mme MASNEUF-POMAREDE Isabelle, Professeur à Bordeaux Sciences Agro	Examineur
Mme MOINE Virginie, Directrice scientifique, Biolaflort SAS à Floirac	Invité
M. MARCHAL Axel, Maitre de conférences à l'Université de Bordeaux	Invité

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie Madame Isabelle IMBERT et Monsieur Stéphane GUILLOUET d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, ainsi que Mesdames Sandrine ALFENORE et Isabelle MASNEUF d'avoir bien voulu l'examiner. Je souhaite également remercier Madame Virginie MOINE et Monsieur Axel MARCHAL pour leur participation à mon jury de thèse, ainsi que pour m'avoir initié au monde de l'œnologie.

Ces travaux ont été menés au sein de l'ENSTBB dans l'équipe Structure et Activité des Macromolécules Biologiques de l'institut CBMN. Je remercie le directeur de cette équipe Monsieur Xavier SANTARELLI de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire. Je remercie également la Région Aquitaine et l'entreprise Laffort pour avoir financé ces travaux.

Je remercie sincèrement Madame Charlotte CABANNE pour m'avoir accordé sa confiance depuis mon stage de master 2. Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse, tes conseils et tes corrections, je t'en suis très reconnaissant.

Je tiens également à remercier Madame Agnès HOCQUELLET qui m'a formé à la microbiologie. Merci pour sa bienveillance et son soutien. Un grand merci à Agathe JONCKEAU pour son aide précieuse lors des expériences au début de ma thèse et son amitié.

Mes remerciements à l'ensemble de l'équipe et aux membres de l'ENSTBB pour leur accueil. Merci également aux stagiaires qui ont participé aux travaux de cette thèse, Valentin OLIVIER et Carine COAT.

Je remercie du fond du cœur mes parents, sans qui je ne serai pas arrivé là où j'en suis maintenant. Vous m'avez toujours soutenu dans mes études et mes choix. Je vous en suis très reconnaissant, merci encore. Je remercie également mes grands-parents, Papé et Mamé, qui ont toujours suivi avec un grand intérêt mon parcours ; ainsi que mon frère et mes sœurs, pour la fierté que je vois dans leurs yeux. Je remercie également mes amis, qui m'ont appris à vulgariser mon travail. Enfin je remercie Anaïs, ma chère et tendre, qui m'a toujours soutenu et supporté pendant ces années de thèse.

Résumé

La protéine Hsp12 est une protéine de choc thermique (12 kDa) exprimée par la levure *Saccharomyces cerevisiae* et associée à la réponse au stress. En effet, il a été montré que les transcrits du gène *HSP12* sont exprimés en réponse à différents stress. De plus, la protéine Hsp12 serait responsable de la sucrosité du vin observée au cours de l'autolyse des levures lors de la vinification. Cependant, le goût sucré pourrait provenir de la protéine Hsp12 entière, ou, d'un ou plusieurs peptides issus de la protéine Hsp12. L'objectif de cette étude était d'obtenir la protéine Hsp12 native pure à partir de culture de *Saccharomyces cerevisiae* afin de comprendre son rôle, d'une part dans la réponse au stress chez la levure et, d'autre part dans la sucrosité du vin.

Des cultures de la souche œnologique Fx10 de *Saccharomyces cerevisiae* ont été réalisées afin d'étudier la protéine Hsp12 native. La production de la protéine Hsp12 en réponse à différents stress a été étudiée au cours des cultures, grâce à un dosage ELISA développé lors de cette étude. Il a ainsi été mis en évidence que la protéine Hsp12 est produite en quantités significativement supérieures en réponse à des stress thermiques et osmotiques. Le stress éthanologique quant à lui entraîne une diminution de la quantité de protéine Hsp12. La protéine Hsp12 native extraite à partir des cultures a été purifiée. Un procédé de purification en 3 étapes a été développé. Plusieurs résines et conditions chromatographiques ont été criblées en microplaques. La résine en mode mixte PPA HyperCel a permis d'éliminer des contaminants majeurs grâce à sa sélectivité. La chromatographie d'exclusion stérique a permis d'éliminer les contaminants restants et ainsi d'obtenir la protéine Hsp12 native avec une pureté de 99%. Différentes techniques biophysiques et calorimétriques ont permis de caractériser la protéine Hsp12 native purifiée, en présence de membranes modèles. Il a ainsi été démontré que la protéine Hsp12 est une protéine intrinsèquement non ordonnée (intrinsically disordered protein - IDP). Elle est caractérisée par l'absence de structures secondaires en solution aqueuse et par la formation d'hélices α en présence de SDS et du phospholipide PiP_2 . La liaison avec le PiP_2 suggère un rôle dans la stabilisation de la membrane plasmique des levures. La protéine Hsp12 pourrait ainsi avoir un rôle de chaperonne de membrane. Une caractérisation organoleptique de la protéine Hsp12 native purifiée a également été réalisée. Il apparaît que la protéine Hsp12 entière n'est pas responsable de la sucrosité mais plutôt un ou des peptides issus de sa digestion enzymatique.

Mots clés : Hsp12, *Saccharomyces cerevisiae*, Stress, Sucrosité, Chromatographie multimodale, Protéine intrinsèquement non ordonnée.

CBMN UMR 5248

Equipe « Structure et Activité des Macromolécules Biologiques »

146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex

Abstract

Hsp12 is a heat shock protein (12 kDa) expressed by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associated with the stress response. Indeed, it has been shown that transcripts of the *HSP12* gene are expressed in response to different stresses. In addition, the protein Hsp12 would be responsible for the sweetness of wine observed during the autolysis of yeasts during vinification. However, the sweet taste could come from the entire Hsp12, or from one or more peptides derived from Hsp12. The objective of this study was to obtain the pure native Hsp12 protein from *Saccharomyces cerevisiae* culture in order to understand its role, on the one hand in the stress response in yeast and on the other hand in the sweetness of wine.

Cultures of the *Saccharomyces cerevisiae* Fx10 enological strain were made to study the native Hsp12 protein. The production of the Hsp12 protein in response to different stresses was studied during the cultures, thanks to an ELISA assay developed during this study. It has thus been demonstrated that the Hsp12 protein is produced in significantly greater quantities in response to thermal and osmotic stress. Ethanol stress causes a decrease in the amount of Hsp12 protein. The native Hsp12 protein extracted from the cultures was purified. A 3-step purification process has been developed. Several resins and chromatographic conditions were screened in microplates. PPA HyperCel mixed-mode resin has eliminated major contaminants due to its selectivity. Steric exclusion chromatography allowed the removal of remaining contaminants and thus to obtain the native Hsp12 protein with a purity of 99%. Various biophysical and calorimetric techniques were used to characterize the purified native Hsp12 protein in the presence of model membranes. It has thus been demonstrated that the Hsp12 protein is an intrinsically disordered protein (IDP). It is characterized by the absence of secondary structures in aqueous solution and by the formation of α helices in the presence of SDS and phospholipid PiP₂. The binding with PiP₂ suggests a role in the stabilization of the plasma membrane of yeasts. The Hsp12 protein could thus act as a membrane chaperone. Organoleptic characterization of the purified native Hsp12 protein was also performed. It appears that the entire Hsp12 protein is not responsible for the sweetness but rather one or more peptides resulting from its enzymatic digestion.

Keywords: Hsp12, *Saccharomyces cerevisiae*, Stress, Sweetness, Mixed-mode chromatography, intrinsically disordered protein.

Abréviations

Ac	Anticorps
AFNOR	Association française de normalisation
ANOVA	Analyse de variance
BSA	Bovine serum albumin
CD	Circular dichroism
CO ₂	Dioxyde de carbone
DBC	Dynamic binding capacity
DLS	Dynamic light scattering
DO	Densité optique
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycérol
DSC	Differential scanning calorimetry
DSS	Disuccinimidyl suberate
EB	Extrait brut
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EP	Extrait protéique
GFP	Green fluorescent protein
GRAVY	Grand average of hydropathy
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HEPT	Hauteur équivalente à un plateau théorique
HOG	High-osmolarity glycerol pathway
HRP	Horseradish peroxidase
HSE	Heat shock element
Hsp	Heat shock protein
Hsp12	Heat shock protein 12
IDP	Intrinsically disordered protein
ITC	Isothermal titration calorimetry
LC-MS/MS	Liquid chromatophry – mass spectrometry

LEA	Late embryogenesis abundant protein
LUV	Large unilamellar vesicles
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MLV	Multilamellar vesicles
MM	Masse moléculaire
Msn	Multicopy suppressor of SNF1 mutation
NaCl	Chlorure de sodium
O ₂	Dioxygène
PBI2	Protease B inhibitor 2
PBS	Tampon phosphate salin
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
pI	Point isoélectrique
PiP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidyléthanolamine
POPS	1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylsérine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SD	Superoxide dismutase
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
sHsp	Small heat shock protein
STRE	Stress responsive elements
SUV	Small unilamellar vesicles
TBS	Tampon Tris salin
TBST	Tampon Tris salin avec du Tween
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TOR	Target Of Rapamycin
UE	Union Européenne

UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USA	États-Unis d'Amérique
YPD	Yeast extract peptone dextrose

Sommaire

Introduction générale	13
------------------------------	-----------

Chapitre 1. Synthèse bibliographique	15
---	-----------

1 Hsp12	15
----------------	-----------

1.1 Classification de la protéine Hsp12	15
---	----

1.2 Généralités sur la protéine Hsp12	22
---------------------------------------	----

2 Hsp12, une protéine de stress	27
--	-----------

2.1 Stress responsables de l'expression d'Hsp12	27
---	----

2.2 Rôle d'Hsp12 dans la résistance aux stress	31
--	----

2.3 Régulation de l'expression du gène <i>HSP12</i>	33
---	----

2.4 Hsp12, une chaperonne de membrane ?	37
---	----

3 Hsp12, une protéine sucrée	39
-------------------------------------	-----------

3.1 Les déterminants de la saveur sucrée des vins secs	39
--	----

3.2 Les autres protéines sucrées	42
----------------------------------	----

3.3 Le récepteur du goût sucré T1R2-T1R3	44
--	----

4 Objectifs de la thèse	46
--------------------------------	-----------

Chapitre 2. Matériel, méthodes et développement	48
--	-----------

1 Culture des levures	48
------------------------------	-----------

1.1 Matériel biologique	48
-------------------------	----

1.2 Culture des levures	48
-------------------------	----

1.3 Suivi de culture	51
----------------------	----

2 Préparation des extraits protéiques	53
--	-----------

2.1 Lyse cellulaire	53
---------------------	----

2.2	Traitement thermique	53
3	Purification	54
3.1	Matériel	54
3.2	Résines et tampons	54
3.3	Criblage en microplaque	54
3.4	Colonnes de purification	56
4	Analyses protéiques	57
4.1	Gel SDS-PAGE	57
4.2	Electrotransfert et immunodétection des protéines	57
4.3	Quantification de la protéine Hsp12 par dosage ELISA	58
4.4	SEC-UPLC	58
5	Caractérisation physico-chimique	60
5.1	Spectrométrie de masse	60
5.2	Stabilité thermique	60
5.3	Réticulation chimique	60
5.4	Préparation des liposomes	61
5.5	Dichroïsme circulaire	62
5.6	ITC	63
5.7	DSC	66
6	Caractérisation organoleptique	68
6.1	Seuil de détection	68
6.2	Profil sensoriel	68
6.3	Test d'activation du récepteur T1R2/T1R3	69
7	Développement d'une méthode de dosage par ELISA	71
7.1	Obtention des anticorps anti-Hsp12	72
7.2	Développement du protocole de dosage ELISA	73

7.3	Validation du protocole de dosage ELISA	75
7.4	Conclusion	78

Chapitre 3. Impact du stress sur la production de la protéine Hsp12 _____ **79**

1	Introduction	79
2	Evaluation de l'impact des stress	82
2.1	Suivi de croissance des levures	82
2.2	Stress thermiques	83
2.3	Stress osmotique	87
2.4	Stress éthanolique	88
2.5	Conclusion	91
3	Suivi des cultures et de la production de la protéine Hsp12 pendant 24h	92
3.1	Suivi des cultures	92
3.2	Production de la protéine Hsp12	96
4	Conclusion	99

Chapitre 4. Purification _____ **100**

1	Introduction	100
2	Mise au point du procédé de purification	102
2.1	Etape 1	102
2.2	Etape 2	112
2.3	Etape 3	118
2.4	Récapitulatif	119
3	Changement d'échelle	122
3.1	Etape 1 : PPA	122

3.2	Etape 2 : PPA NaCl	123
3.3	Etape 3 : SEC	123
3.4	Bilan	124
3.5	Elimination de la protéine Hsp12 tronquée	127
4	Chromatographie préparative	137
5	Evaluation de la pureté	140
5.1	SDS-PAGE/densitométrie	140
5.2	UPLC	140
5.3	ELISA – BCA	141
6	Conclusion	142
 Chapitre 5. Caractérisation		143
 Partie I. Caractérisation structurale		143
1	Introduction	143
2	Spectrométrie de masse	144
3	Stabilité thermique	145
4	Détermination de la masse moléculaire par SEC	146
5	Réticulation chimique	147
6	Dichroïsme circulaire	149
6.1	Hsp12 et SDS	149
6.2	Hsp12 et liposomes	150
7	ITC	153
8	DSC	155
9	Conclusion	157

Partie II. Caractérisation organoleptique	159
1 Introduction	159
2 Seuil de détection	160
3 Test d'activation du récepteur T1R2/T1R3	162
4 Profil sensoriel	164
4.1 Etude préliminaire	164
4.2 Préparation des échantillons	166
4.3 Profil sensoriel	169
5 Conclusion	171
Conclusions générales et perspectives	173
Références bibliographiques	181

Introduction générale

Introduction générale

La protéine Hsp12 est une protéine de choc thermique (12 kDa) exprimée par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle a ainsi fait l'objet de plusieurs études pour son implication dans la réponse au stress. L'augmentation des transcrits du gène *HSP12* en réponse à différents stress (thermique, osmotique, éthanologique, privation de glucose) a été mise en évidence. Il a également été montré que l'expression du gène *HSP12* améliorait la résistance des levures aux stress (thermique, éthanologique, dessiccation). Toutefois, la protéine n'a jamais été quantifiée dans ces différentes conditions de stress. Des équipes se sont également intéressées aux mécanismes responsables de la résistance aux stress impliquant la protéine Hsp12. Les résultats suggèrent que la protéine pourrait interagir avec les membranes des levures et moduler leur fluidité. Ce travail de thèse vise ainsi à étudier la production de la protéine Hsp12 en réponse à différents stress, et, son rôle présumé de chaperonne de membrane chez la levure.

Par ailleurs, la protéine Hsp12 pourrait être responsable de la sensation de sucrosité du vin. La sucrosité correspond à la perception d'un goût sucré alors que le taux de sucre est inférieur au seuil de perception. L'augmentation de la sucrosité est observée lors de la vinification au cours de l'autolyse des levures, qui entraîne la libération de leur contenu cellulaire (acides nucléiques, polysaccharides, protéines, ...) dans le vin. La société Laffort, en collaboration avec l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, s'est ainsi intéressée aux molécules responsables de la sucrosité du vin. Des analyses sensorielles d'autolysats de levure couplées à une analyse par spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence que la sucrosité était corrélée à la présence de peptides issus de la protéine Hsp12. L'implication de la protéine Hsp12 a été confirmée par une analyse sensorielle de vins obtenus à partir de souches de levures exprimant ou n'exprimant pas la protéine Hsp12. Cependant, le goût sucré pourrait provenir de la protéine Hsp12 entière, ou, d'un ou plusieurs peptides qui en seraient issus. Ce travail de thèse, en collaboration avec la société Laffort et l'ISVV, vise ainsi à identifier le lien entre la sucrosité, la protéine Hsp12 entière et les peptides qui en sont issus. Pour la société Laffort, l'objectif est de pouvoir sélectionner, puis commercialiser une souche de levure qui augmenterait la sucrosité du vin grâce à la libération de la protéine Hsp12 au cours de l'autolyse des levures.

L'objectif de cette étude est ainsi d'obtenir la protéine Hsp12 native pure à partir de culture de *Saccharomyces cerevisiae* afin de comprendre son rôle, d'une part dans la réponse au stress chez la levure et, d'autre part dans la sucrosité du vin.

La première partie de ce mémoire est consacrée à la synthèse bibliographique. Elle décrit la protéine Hsp12 et les connaissances actuelles sur son rôle dans la réponse au stress chez la levure ainsi que dans la sucrosité du vin.

La deuxième partie détaille le matériel et les méthodes utilisés au cours de cette étude pour la culture des levures *Saccharomyces cerevisiae*, la purification, la caractérisation physico-chimique et organoleptique de la protéine Hsp12 native. Le développement d'une méthode de dosage ELISA de la protéine Hsp12 est également décrit.

Dans la troisième partie, la production de la protéine Hsp12 en réponse à différents stress est évaluée. Des cultures de levures ont été menées en appliquant des stress thermique, osmotique et éthanolique. La protéine Hsp12 a ensuite été quantifiée grâce la méthode de dosage ELISA développée.

Dans la quatrième partie, la mise au point d'un procédé de purification de la protéine Hsp12 native est présentée. Plusieurs résines et conditions chromatographiques ont été criblées en microplaques. Les conditions sélectionnées ont été validées en colonnes. Le procédé a ensuite été évalué dans sa globalité à l'échelle préparative.

La cinquième partie présente la caractérisation de la protéine Hsp12 native purifiée. Dans un premier temps, la caractérisation de la structure de la protéine est présentée. Celle-ci a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques biophysiques et calorimétriques ainsi que de membranes modèles biomimétiques. Dans un deuxième temps, la caractérisation organoleptique de la protéine, réalisée grâce à plusieurs analyses sensorielles, est détaillée.

La dernière partie est consacrée aux conclusions et aux perspectives résultant de ce travail.

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1 Hsp12

1.1 Classification de la protéine Hsp12

En 1990, *Praeklet et al* ont identifié, chez *Saccharomyces cerevisiae*, un gène codant pour une protéine de 12 kDa. Ils le nomment ainsi *HSP12*, pour heat shock protein avec une masse moléculaire de 12 kDa (Praekelt and Meacock, 1990). Ce gène a été mis en évidence à partir d'une collection qui regroupe les gènes induits lors de l'entrée en phase stationnaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une analyse des ARN de la levure par northern blot a montré que le gène est également fortement exprimé suite à l'application d'un stress thermique. Le gène *HSP12* a été identifié uniquement chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* (Fu *et al.*, 2012). Cette équipe a également analysé la protéine Hsp12 *in silico* et a observé qu'elle présente une séquence très hydrophile. A l'époque, ils ont classé cette protéine parmi les protéines de choc thermique. Qu'en est-il actuellement avec les nouvelles connaissances acquises sur la protéine Hsp12 ?

1.1.1 Hsp12, une protéine de choc thermique ?

1.1.1.1 *Les Hsp : heat shock proteins*

Les protéines de choc thermique (ou heat shock proteins – Hsp) sont une famille de protéines ubiquitaires jouant un rôle clé dans la protection cellulaire. Elles sont fortement conservées au cours de l'évolution et ont été retrouvées chez tous les organismes. Par exemple, les protéines Hsp90 et Hsp70 font partie des protéines les plus conservées du monde vivant (Lindquist and Craig, 1988). Cette conservation peut s'expliquer en partie par le rôle essentiel des Hsp chez les organismes vivants. Elles sont classées selon leur masse moléculaire à travers 6 groupes (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, et les small Hsp). Ces protéines sont induites en réponse à différents stress, malgré leur appellation restrictive faisant référence à leur découverte suite à un stress thermique (Ritossa, 1962). Ces stress sont notamment le stress osmotique, la présence de certains composés comme les métaux

lourds, l'hypoxie, ... (Bellini *et al.*, 2017). Ces différents stress entraînent plusieurs cascades dont les acteurs centraux sont des facteurs de transcription. D'une part, il y a les facteurs de choc thermique (Heat shock factors – Hsf). La levure *Saccharomyces cerevisiae* ne possède qu'un seul facteur de choc thermique, nommé Hsf1. Il se lie aux éléments de choc thermique (Heat Shock Elements – HSE) localisés au sein des régions promotrices des gènes responsables de la réponse aux stress. D'autre part, le facteur de transcription Msn2 reconnaît les éléments de réponse au stress (stress responsive elements – STRE), également localisés au sein des régions promotrices des gènes de réponse aux stress. La liaison de ces facteurs de transcription entraîne l'expression notamment des protéines Hsp et donc la mise en place de la réponse aux stress (Morimoto and Westerheide, 2010). Les protéines Hsp sont majoritairement des chaperonnes moléculaires puisqu'elles vont permettre la conformation des protéines, prévenir leur agrégation et assister le protéasome pour la dégradation de protéines irréversiblement endommagées. La protéine Hsp12 a été associée au groupe des « small Hsp », du fait de sa masse moléculaire. Quelles sont les caractéristiques des sHsp ?

1.1.1.2 *Les sHsp : small heat shock proteins*

Bien que les protéines appartenant au groupe des sHsp présentent des séquences diverses, elles partagent plusieurs caractéristiques communes (Haslbeck *et al.*, 2005). Ce sont des protéines chaperonnes qui se lient aux protéines dénaturées et préviennent notamment la formation d'agrégats (Zhang *et al.*, 2015). Leur expression est induite en présence de conditions de stress. Au niveau structural, elles possèdent un domaine α -cristalline d'environ 90 acides aminés. L'architecture de ce domaine est conservée parmi les sHsp malgré des séquences en acides aminés différentes. Ce domaine est constitué de deux couches formées de 3 et 5 feuillets β antiparallèles face à face, connectés par une petite boucle. Ce domaine peut se dimériser avec une autre sous unité en formant des feuillets β composites (Van Montfort *et al.*, 2002) (Figure 1). Le domaine α -cristalline est un motif signature des sHsp. De plus, ces protéines sont caractérisées par une petite masse moléculaire comprise entre 12 et 43 kDa. Toutefois elles sont connues pour former des oligomères constitués de 9 à plus de 24 sous-unités et présentant des masses moléculaires de 150 à 800 kDa (Chang *et al.*, 1996; Haslbeck *et al.*, 1999).

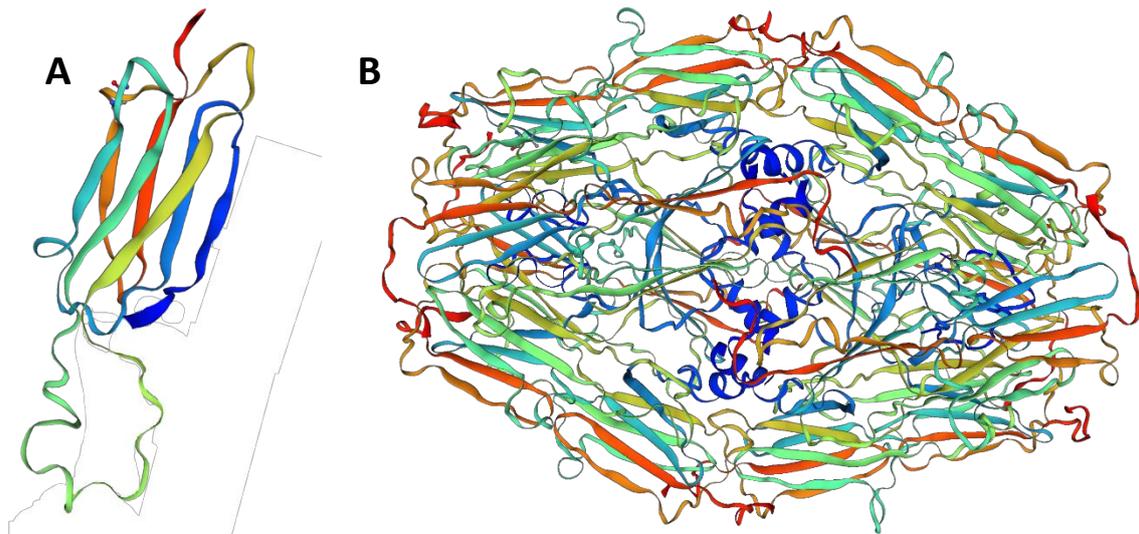


Figure 1 : Structure de la protéine Hsp26, une sHsp de *Saccharomyces cerevisiae*.

A. Protéine sous forme monomérique.

B. Protéine sous forme oligomérique avec 16 sous-unités.

Au vu de ces différentes caractéristiques, la protéine Hsp12 peut-elle être associée aux sHsp ?

1.1.1.3 *Hsp12, Hsp et sHsp*

Le gène *HSP12* est exprimé lorsque la levure est en phase stationnaire ou lors de l'application d'un stress thermique, osmotique ou oxydatif (De Groot *et al.*, 2000; Karreman & Lindsey, 2005; Praekelt & Meacock, 1990). La régulation du gène *HSP12* est sous la dépendance de deux facteurs de transcription : Hsf1 et Msn2. Ces facteurs se fixent sur des petites séquences répétées, les HSE pour Hsf1 et les STRE pour Msn2. Ces séquences sont présentes au sein du promoteur du gène *HSP12*. Les facteurs Hsf1 et Msn2 ainsi que les séquences HSE et STRE sont des éléments spécifiques de la réponse aux stress et donc des Hsp (Praekelt and Meacock, 1990; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Kleinsmidt, 2010). Ces éléments sont en faveur de l'appartenance de la protéine Hsp12 au groupe des Hsp.

Sa masse moléculaire de 12 kDa a été un argument pour la classer parmi les « small Hsp » (sHsp). Néanmoins, la protéine Hsp12 ne possède pas de domaine α -cristalline (feuillet β) et elle a tendance à former des hélices α en présence de différents composés (Welker *et al.*, 2010). De plus, elle se présenterait uniquement sous forme de monomère

contrairement aux sHsp qui forment des oligomères (Welker *et al.*, 2010). Enfin, concernant son activité chaperonne, il est supposé qu'elle est une chaperonne de membrane, plutôt qu'une chaperonne de protéine. En effet, elle pourrait interagir avec la membrane de *Saccharomyces cerevisiae* et moduler sa fluidité (Welker *et al.*, 2010).

Ces différents éléments montrent que la protéine Hsp12 a très peu de caractéristiques structurales et fonctionnelles communes avec les sHsp. Toutefois, l'expression du gène *HSP12* en présence de stress et sa régulation sont des éléments en faveur de l'appartenance au groupe des Hsp. Verghese *et al* propose ainsi de la classer parmi les Hsp mais dans un groupe à part où elle est la seule protéine (Verghese *et al.*, 2012) (Tableau I).

Tableau I : Tableau simplifié présentant les groupes de protéines Hsp ainsi que leurs fonctions chez *S. cerevisiae*, d'après Verghese *et al.*

Groupes Hsp	Fonctions
Hsp100	Prévention de l'agrégation des protéines
Hsp90	Assure la bonne conformation des protéines
Hsp70	Assure la bonne conformation des protéines
Hsp40	Cofacteur de Hsp70
sHsp	Prévention de l'agrégation des protéines
Hsp12	Chaperonne de membrane ?

Certaines équipes ont également proposé de décrire la protéine Hsp12 comme une protéine LEA-like (Late Embryogenesis Abundant) (Mtwisha *et al.*, 1998).

1.1.2 Hsp12, une protéine LEA-like ?

1.1.2.1 *Les protéines LEA*

En 1981, *Léon Dure III et al* ont identifié plusieurs protéines qui sont accumulées en grande quantité dans les graines de coton (*Gosypium hirsutum*) lors des dernières étapes du développement embryonnaire (Dure and Galau, 1981). Elles sont ainsi nommées les protéines Late Embryogenesis Abundant (LEA) et leur expression est associée à la tolérance à la dessiccation des plantes (Bartels, 2005). Cette famille de protéines a tout d'abord été identifiée et étudiée chez les plantes. Puis, des protéines similaires ont été observées chez les bactéries (Stacy and Aalen, 1998), les levures (Garay-Arroyo *et al.*, 2000), les nématodes (Solomon *et al.*, 2000), etc... Chez ces organismes, l'expression de ces protéines n'est évidemment pas reliée à la maturation des graines mais elles sont majoritairement impliquées dans la tolérance à la dessiccation de ces organismes. D'autres stress augmentant leur expression ont également été rapportés, comme la présence de sels et la diminution de la température (Tunnacliffe and Wise, 2007). *Wise et al* ont proposé de classer les protéines LEA selon 6 groupes, numérotés de 1 à 6, grâce à une analyse bio-informatique (Wise, 2003). La majorité des protéines LEA sont classées parmi les 3 premiers groupes ; les groupes 4, 5 et 6 sont minoritaires et présentent des caractéristiques particulières (Tolte, 2007).

D'un point de vue structural, les protéines LEA des groupes 1, 2 et 3 possèdent des caractéristiques communes. Ce sont des protéines très hydrophiles. En effet, le diagramme d'hydrophatie de Kyte et Doolittle montre que la majorité de la séquence d'une protéine LEA donnée se situe dans la zone hydrophile (inférieur à 0) (Hand *et al.*, 2011) (Figure 2). De plus le score GRAVY, qui correspond à la moyenne des scores d'hydrophatie de chaque acide aminé rapportée au nombre total d'acides aminés, est souvent très négatif marquant le caractère très hydrophile des protéines LEA.

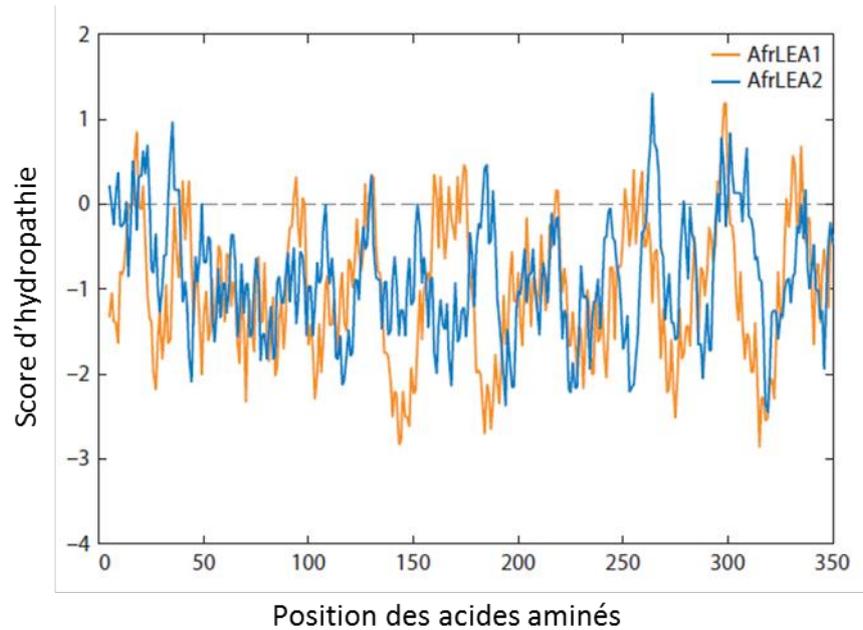


Figure 2 : Diagramme d'hydropathie pour deux protéines LEA : AfrLEA1 et AfrLEA2, indiquant un fort caractère hydrophile avec des valeurs inférieures à zéro, d'après Hand et al. D'après l'échelle de Kyte et Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982), plus les acides aminés sont hydrophiles, plus ils possèdent un score négatif et plus ils sont hydrophobes, plus ils ont un score positif.

Ces protéines sont également caractérisées par l'absence ou la faible proportion de cystéine et de tryptophane et la prépondérance de glycine, alanine, glutamate, lysine, arginine et thréonine. De plus, toutes les LEA des groupes 1, 2 et 3 étudiées à ce jour, ont révélé la présence importante de structures non ordonnées en solution. Elles sont ainsi considérées comme des protéines intrinsèquement non ordonnées (intrinsically disordered protein – IDP) (Battaglia *et al.*, 2008). Les IDP sont des protéines qui ne possèdent pas de structure 3D stable et totalement ordonnée et qui peuvent acquérir une conformation dans certaines conditions ou en se liant à différentes molécules (Tompa *et al.*, 2015). Dans le cas des protéines LEA, certaines protéines ont montré leur capacité à former des structures secondaires, principalement des hélices α , lors de la dessiccation (Goyal *et al.*, 2003; Tolleter, 2007). De plus, les protéines LEA ne sont pas dénaturées lors d'une incubation à haute température (Russouw *et al.*, 1997), autre caractéristique des protéines IDP.

Afin de comprendre le mode d'action des protéines LEA, des équipes ont étudié leur interaction avec des liposomes constitués de différents phospholipides. Ils ont ainsi montré que certaines protéines LEA étaient capables de se lier aux phospholipides. Cette liaison

entraîne l'apparition de structures secondaires au sein des protéines et la modification du comportement des liposomes (Koag *et al.*, 2003; Tolleter, 2007). Ceci met en évidence un possible rôle dans la stabilisation des membranes lors de la présence d'un stress. Cette famille de protéine est très diversifiée car des protéines LEA sont retrouvées chez la plus part des organismes, près de 400 protéines font partie de la famille des LEA. Il est donc difficile de généraliser leur mode d'action et cela reste une question importante à étudier.

Au vu de ces différentes caractéristiques, est-ce que la protéine Hsp12 peut être associée aux protéines LEA ?

1.1.2.2 *Hsp12, une protéine LEA-like ?*

La protéine Hsp12 est une protéine très hydrophile possédant un score moyen d'hydropathie négatif (-0,79). Elle est riche en alanine, glycine, glutamate et lysine, comme les protéines LEA (Mtwisha *et al.*, 1998). L'analyse de la structure de la protéine recombinante Hsp12 par dichroïsme circulaire a révélé l'absence de structure secondaire en solution aqueuse. Elle a également montré que la protéine Hsp12 pouvait acquérir une structure secondaire sous forme d'hélice α en se liant au SDS (Welker *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que l'incubation à 80°C de la protéine Hsp12 n'entraînait pas sa précipitation, elle reste soluble (Mtwisha *et al.*, 1998). La protéine Hsp12 semble donc être une protéine intrinsèquement non ordonnée (IDP), comme la majorité des protéines LEA. Il a également été montré que la protéine Hsp12 peut se lier à certains phospholipides, ce qui suggère son rôle possible dans la stabilisation des membranes des levures (Sales *et al.*, 2000; Welker *et al.*, 2010). Enfin, il a été démontré que la protéine Hsp12 est impliquée dans la tolérance à la dessiccation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Kim *et al.*, 2018). Ces différents résultats montrent que la protéine Hsp12 posséderait une structure et une fonction très proche des protéines LEA.

1.1.3 Conclusion

Pour résumer, la protéine Hsp12 ressemble particulièrement aux protéines LEA, du fait de sa composition en acides aminés, de son appartenance à la classe des protéines IDP,

de son rôle dans la résistance à la dessiccation et de son possible rôle dans la stabilisation des membranes. Toutefois, l'expression de la protéine Hsp12 est régulée par des voies de stress spécifiques aux Hsp. Elle est notamment exprimée en réponse au stress thermique, ce qui n'est pas observé dans le cas des protéines LEA. La régulation et le rôle de la protéine Hsp12 la situent indéniablement comme une Hsp mais qui pourrait être classée à part, comme l'avait souligné *Verghese et al.* La protéine Hsp12 serait donc à la croisée de ces 2 familles en partageant ainsi des caractéristiques spécifiques à chacune d'elles.

1.2 Généralités sur la protéine Hsp12

1.2.1 Propriétés physico-chimiques

La protéine Hsp12 est composée de 109 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 11692,7 Da. C'est une protéine riche en alanine, glycine, aspartate, glutamate et lysine. Ces 5 acides aminés représentent 50% des acides aminés totaux. Elle est constituée en majorité d'acides aminés polaires, incluant 37% d'acides aminés chargés. Le caractère hydrophile de la protéine Hsp12 est évalué par le diagramme d'hydrophathie selon l'échelle de Kyte et Doolittle (Figure 3).

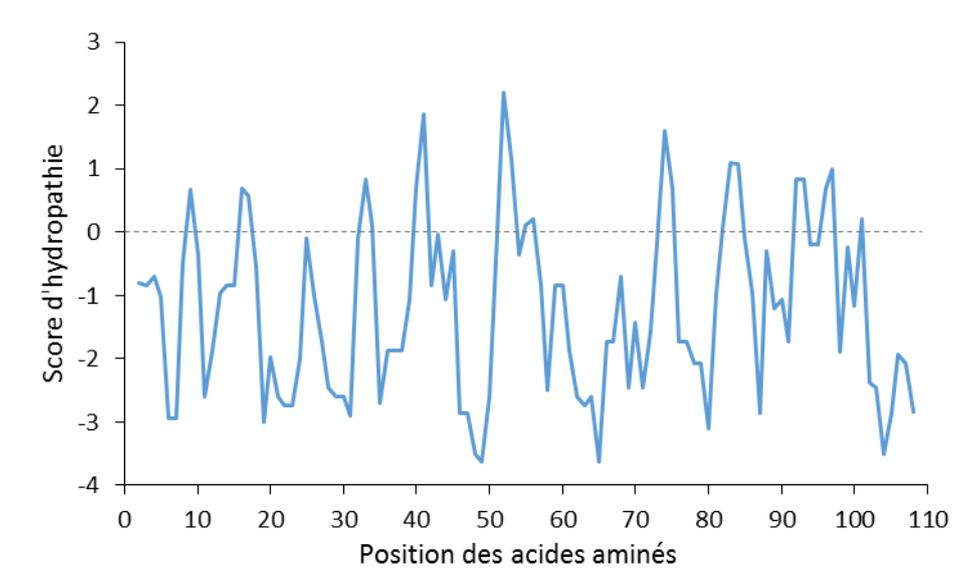


Figure 3 : Diagramme d'hydrophathie de la protéine Hsp12 selon l'échelle de Kyte et Doolittle.

Le diagramme d'hydropathie de la protéine Hsp12 montre que la majorité des acides aminés possèdent des valeurs négatives. Ceci est confirmé par un score GRAVY de -1,209 signifiant que la protéine est très hydrophile. Concernant les acides aminés plus hydrophobes, ils ne sont pas rassemblés dans un bloc mais sont situés le long de la séquence à des intervalles réguliers. Le coefficient d'extinction molaire de la protéine Hsp12 est de $5960 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm, ce qui est relativement faible. A titre de comparaison, le coefficient d'extinction molaire de la BSA est de $42925 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm. Ceci est lié à l'absence de tryptophane et à la présence de seulement 4 tyrosines, qui sont les deux acides aminés principalement responsables de l'absorbance des protéines à 280 nm. Le point isoélectrique théorique de la protéine est de 5,22 et elle possède une charge nette de -3,8 à pH 7. Ces propriétés physicochimiques ont été obtenues grâce à l'outil d'analyse bio-informatique ProtParam de la plateforme Expasy et sont résumées dans le tableau suivant (Tableau II).

Tableau II : Propriétés physico-chimiques de la protéine Hsp12

Propriétés	Valeurs
Nombre d'acides aminés	109
Masse moléculaire	11692,7
Nombre total de résidus chargés positivement (His, Lys, Arg)	20
Nombre total de résidus chargés négativement (Asp, Glu)	22
Nombre total de résidus aromatiques	8
Nombre total de résidus aliphatiques	11
Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-1,209
pI théorique	5,22
Charge nette à pH 7	-3,8
Coefficient d'extinction molaire (280 nm)	$5960 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

1.2.2 Structure

La structure de la protéine Hsp12 recombinante a tout d'abord été étudiée par dichroïsme circulaire afin d'identifier les structures secondaires de la protéine. L'absence de

structures secondaires en solution aqueuse a ainsi été montrée. Puis il a été mis en évidence que la protéine Hsp12 pouvait acquérir une structure secondaire sous forme d'hélices α en se liant au SDS (Welker *et al.*, 2010; Singarapu *et al.*, 2011). Il a été également montré que la protéine Hsp12 pouvait former des hélices α en présence de certains phospholipides (Welker *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018). Ceci suggère un rôle possible de la protéine Hsp12 en lien avec la membrane plasmique des levures. Plusieurs phospholipides ont été testés et il apparait que la protéine Hsp12 se structure uniquement en présence de phospholipides possédant une charge négative (les dérivés du phosphatidylglycérol et du phosphatidylinositol). Ces résultats obtenus grâce au dichroïsme circulaire ont également été confirmés par RMN (Singarapu *et al.*, 2011). Afin de préciser la position des hélices au sein de la séquence de la protéine, des prédictions de structures secondaires ont été réalisées. Ces prédictions ont mis en évidence 4 hélices α possédant un caractère amphiphile (Welker *et al.*, 2010). Afin de confirmer ces prédictions, des analyses par RMN ont été réalisées sur la protéine Hsp12 en présence de SDS. Il a été montré que les résidus hydrophobes sont majoritairement rassemblés d'un côté des hélices alors que les résidus chargés sont localisés sur le côté opposé, comme montré dans la Figure 4 (Singarapu *et al.*, 2011; Herbert *et al.*, 2012).

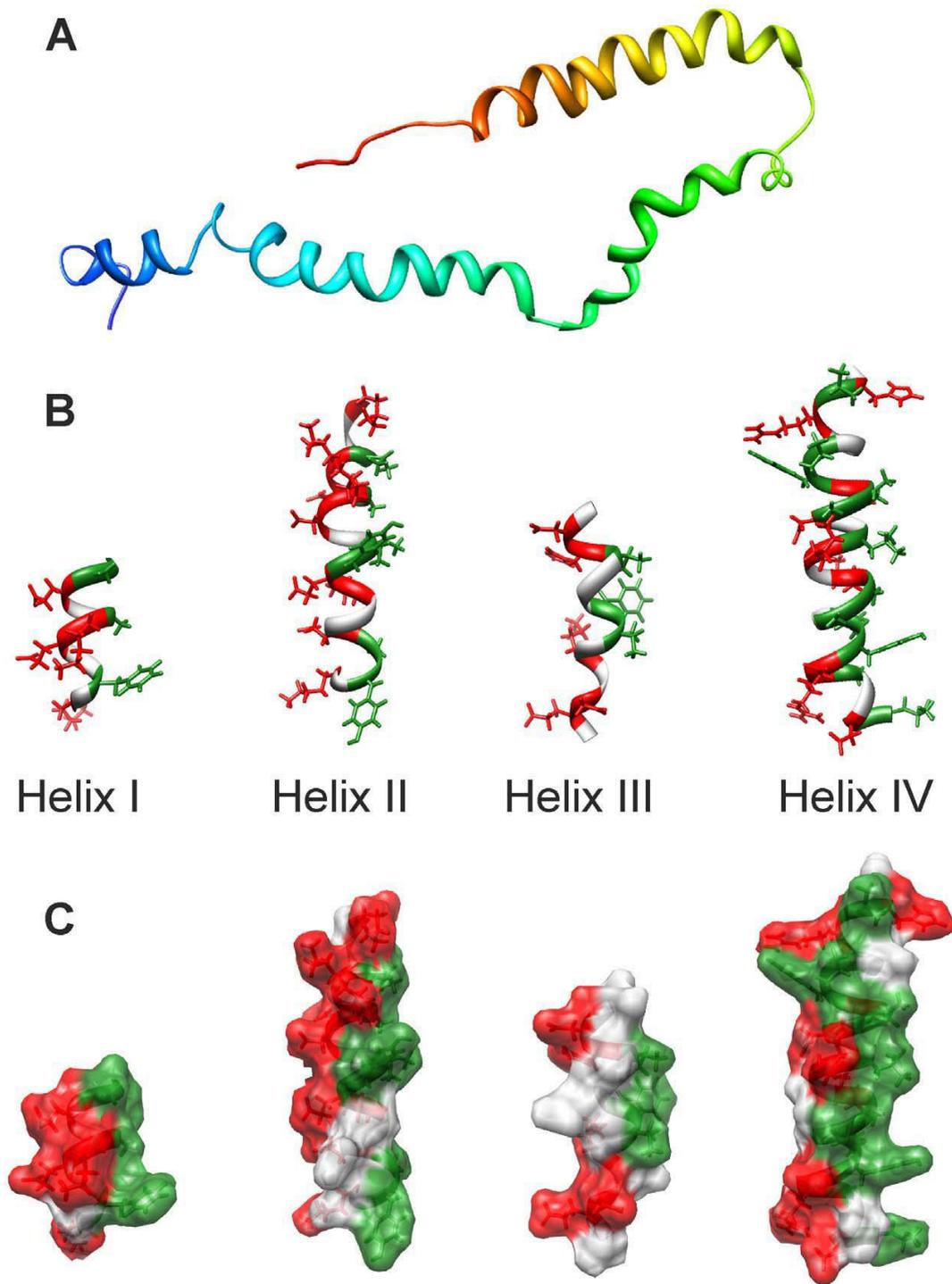


Figure 4 : Représentation des hélices observées sur la protéine Hsp12 en présence de SDS, d'après Herbert et al.

A. Les 4 hélices α sont représentées sous forme de ruban et colorées de la partie N-terminale (bleu) à la partie C-terminale (rouge).

B.C. Analyse de la distribution des charges avec les résidus hydrophobes colorés en vert et les résidus chargés colorés en rouge sous forme de ruban (B) et de surface (C).

Les auteurs suggèrent que cette conformation pourrait permettre une localisation membranaire de la protéine Hsp12. Les hélices pourraient être en partie enchâssées dans la bicouche lipidique grâce aux résidus hydrophobes et les charges positives pourraient être liées par des interactions électrostatiques aux têtes des phospholipides chargées négativement.

La protéine Hsp12 a donc un comportement particulier puisque elle ne présente pas de structures secondaires en solution mais a la capacité de former des hélices α en présence de certaines molécules comme le SDS et des phospholipides. Ce comportement a déjà été observé chez certaines protéines intrinsèquement non ordonnées (intrinsically disordered protein – IDP) (Szollosi *et al.*, 2008).

1.2.3 Hsp12, une protéine IDP ?

Les IDP sont des protéines qui ne possèdent pas de structure 3D stable et totalement ordonnée et qui peuvent acquérir une conformation en se liant à différentes molécules. De plus, les protéines IDP possèdent d'autres caractéristiques communes comme notamment un fort caractère hydrophile, une majorité de résidus chargés, une minorité de résidus hydrophobes et une résistance aux températures élevées (Tompa *et al.*, 2015). La protéine Hsp12 possède différentes caractéristiques spécifiques des protéines IDP. Outre sa structuration en présence de certaines molécules, c'est une protéine très hydrophile comme il a été montré précédemment au travers du diagramme d'hydropathie et du GRAVY. Elle possède 37% de résidus chargés et seulement 17% de résidus hydrophobes. Il a également été montré que l'incubation à 80°C de la protéine Hsp12 n'entraînait pas sa précipitation (Mtwisha *et al.*, 1998). Par conséquent, au vu de ces caractéristiques, il a été admis que la protéine Hsp12 est une protéine IDP et que cette structure particulière est probablement en lien avec sa fonction physiologique chez la levure. Toutefois, les analyses structurales et fonctionnelles ont été réalisées avec la protéine Hsp12 recombinante, il serait donc intéressant de confirmer ces résultats avec la protéine Hsp12 native.

2 Hsp12, une protéine de stress

2.1 Stress responsables de l'expression d'Hsp12

La protéine Hsp12 a fait l'objet de plusieurs études afin d'identifier les stress responsables de l'expression de la protéine. La plupart des études se sont uniquement intéressées aux transcrits du gène *HSP12*. Cependant, plusieurs études ont montré que la quantité d'ARNm n'est pas toujours corrélée à la quantité de protéines traduites (De Sousa Abreu *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2009). En effet, chez la levure la quantité de protéine est corrélée à la quantité d'ARNm pour seulement un tiers des protéines. Cela est dû notamment aux nombreux paramètres influençant la synthèse et la dégradation des ARNm et des protéines, comme par exemple : le taux de transcription, le taux de traduction ou encore la demi-vie des ARNm et des protéines (Schwanhüusser *et al.*, 2011). Il n'est donc pas évident de relier directement la quantité de transcrits d'un gène à la quantité de protéine réellement présente. Toutefois, une quantification indirecte de la protéine Hsp12 a été réalisée à l'aide d'une protéine de fusion constituée de la protéine Hsp12 et de la GFP, sous la dépendance du promoteur du gène *HSP12* (Karreman and Lindsey, 2005).

Cinq stress ont été étudiés au travers des différentes études : le stress thermique, osmotique, oxydatif, l'ajout d'éthanol et la privation de glucose.

2.1.1 Stress thermique

L'impact du stress thermique sur l'expression des transcrits du gène *HSP12* a été largement étudié. Lors de la découverte de la protéine Hsp12, *Praekelt et al* ont montré que l'incubation à 37°C pendant 40 min d'une culture précédemment menée à 25°C, entraînait une augmentation importante des transcrits du gène *HSP12* (Praekelt and Meacock, 1990). Ce fut le premier argument en faveur de l'expression du gène *HSP12* suite à l'application d'un stress thermique. Puis, *Martinez et al* ont confirmé, dans les mêmes conditions, l'augmentation des transcrits du gène *HSP12* à partir de 15 min d'incubation à 37°C et jusqu'à 45 min (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). D'autres études ont analysé plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae* en parallèle. Elles ont également mis en évidence l'augmentation des transcrits du gène *HSP12*, suite à l'incubation à 40°C pendant 1h de

plusieurs cultures précédemment menées à 30°C. Les résultats montrent que les quantités de transcrits sont multipliées par 2 et jusqu'à 9 selon les souches (Ivorra *et al.*, 1999; Carrasco *et al.*, 2001). Les différentes études corroborent le fait que les transcrits du gène *HSP12* augmentent suite à l'application d'un stress thermique.

Afin de décrire l'expression de la protéine Hsp12, Karreman *et al* ont étudié une protéine de fusion formée de la protéine Hsp12 couplée à la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). Les levures génétiquement modifiées ont été cultivées à 30°C, puis la température a été augmentée à 37°C. Le suivi de la fluorescence de la GFP a montré une augmentation de l'intensité de fluorescence pour les levures ayant subi le stress thermique par rapport aux levures restées à 30°C. Cela signifie que la protéine de fusion Hsp12-GFP est traduite en plus grande quantité suite à l'augmentation de la température. Cette étude montre un lien entre le stress thermique et la traduction de la protéine (Karreman and Lindsey, 2005). Toutefois, cette étude est réalisée avec une protéine de fusion recombinante (Hsp12-GFP) et à l'aide de levures modifiées génétiquement. Il serait donc intéressant de quantifier directement la protéine Hsp12 native chez *Saccharomyces cerevisiae* suite à un stress thermique.

2.1.2 Stress osmotique

Le stress osmotique est réalisé par l'ajout de sels ou de polyols (mannitol, sorbitol) dans le milieu de culture. Ces composés vont attirer l'eau intracellulaire et donc les cellules vont se déshydrater. Cela va entraîner des modifications structurales et fonctionnelles des levures (Morris *et al.*, 2019). Plusieurs études ont montré que l'ajout de 400 mM de NaCl, au cours de la phase exponentielle d'une culture de levure, entraîne une augmentation importante des transcrits du gène *HSP12* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Amorós and Estruch, 2001). Ivorra *et al* ont étudié l'impact de l'ajout de 1 M de sorbitol sur plusieurs souches de levures. Les résultats ont montré que les quantités de transcrits du gène *HSP12* sont multipliées par 2 et jusqu'à 7 selon les souches (Ivorra *et al.*, 1999). Comme pour le stress thermique, ces études ont montré uniquement l'augmentation des transcrits du gène *HSP12*.

Afin de décrire l'expression de la protéine Hsp12, *Karreman et al* ont également étudié l'impact du stress osmotique grâce à la protéine de fusion Hsp12-GFP. Ils ont montré que l'intensité de fluorescence augmente suite à l'ajout 400 mM de NaCl dans le milieu au cours de la phase exponentielle (*Karreman and Lindsey, 2005*). Il apparaît donc que la protéine de fusion Hsp12-GFP est traduite suite à l'ajout de 400 mM de NaCl. Ces résultats confirment donc les observations précédentes. Toutefois comme pour le stress thermique, il serait intéressant de quantifier directement la protéine Hsp12 native chez *Saccharomyces cerevisiae* suite à un stress osmotique.

2.1.3 Stress éthanolique

Ivorra et al ont étudié l'impact de l'ajout de 8% d'éthanol sur plusieurs souches de levure. Les résultats ont montré que les quantités de transcrits du gène *HSP12* sont multipliées par 2 et jusqu'à 13 selon les souches (*Ivorra et al., 1999*). Une autre étude a également montré l'augmentation de la quantité des transcrits du gène *HSP12* suite à l'ajout de 10% d'éthanol (*Izawa et al., 2008*).

Afin de décrire l'expression de la protéine Hsp12, *Karreman et al* ont également étudié l'impact de l'ajout d'éthanol grâce à la protéine de fusion Hsp12-GFP. Ils ont montré que l'intensité de fluorescence augmente lentement suite à l'ajout de 7% d'éthanol dans le milieu au cours de la phase exponentielle (*Karreman and Lindsey, 2005*). Il apparaît donc que la protéine de fusion Hsp12-GFP est exprimée suite à l'ajout de 7% d'éthanol. Ces résultats confirment donc les observations précédentes. Toutefois, il serait intéressant de quantifier directement la protéine Hsp12 native chez *Saccharomyces cerevisiae* suite à l'ajout d'éthanol.

2.1.4 Stress par privation de glucose

Il a été observé précédemment que le gène *HSP12* était transcrit lorsque les levures sont en phase stationnaire (cf. 1 Hsp12). La phase stationnaire se traduit par un arrêt de la multiplication des levures à cause de l'épuisement des substrats, notamment le glucose. *Ivorra et al* ont donc évalué l'impact de la privation de glucose sur l'expression du gène

HSP12. Pour cela, ils ont transféré des levures, au cours de la phase exponentielle, d'un milieu riche en glucose à un milieu qui en est dépourvu. Les résultats ont montré que les quantités de transcrits du gène *HSP12* sont multipliées par 2 et jusqu'à 28 selon les souches (Ivorra *et al.*, 1999). Toutefois, il faut noter que le transfert des levures d'un milieu à l'autre peut être un facteur stressant qui n'est pas pris en compte dans cette analyse. Une autre étude s'est intéressée à l'expression du gène *HSP12* lorsque du glucose est ajouté dans le milieu de culture. Ils ont montré que la transcription du gène *HSP12* est réprimée en présence de glucose (De Groot *et al.*, 2000). Ainsi l'expression du gène *HSP12* est stimulée lors de la privation de glucose de manière réversible lorsque du glucose est ajouté dans le milieu. L'absence de glucose est probablement un des éléments permettant d'expliquer l'expression du gène *HSP12* lors de la phase stationnaire. Par ailleurs, afin d'étudier l'impact d'un stress sur la production de la protéine Hsp12, il est ainsi pertinent de l'appliquer une fois la totalité du glucose consommée pour éviter la répression de la transcription du gène *HSP12*.

2.1.5 Stress oxydatif

Ivorra *et al* ont étudié l'impact de l'ajout de 5 mM de peroxyde d'hydrogène pendant 1h sur plusieurs souches de levures. Les résultats ont montré que les quantités de transcrits du gène *HSP12* sont multipliées par 5 et jusqu'à 35 selon les souches (Ivorra *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent donc un lien entre le stress oxydatif et l'expression du gène *HSP12*.

2.1.6 Conclusion

D'après ces différentes études, l'expression du gène *HSP12* est sous la dépendance de plusieurs stress : thermique, osmotique, oxydatif, éthanologique et privation de glucose. L'augmentation des transcrits du gène *HSP12* peut être un marqueur de stress intéressant chez *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, c'est un microorganisme possédant un grand intérêt biotechnologique. Il est important de maîtriser l'impact des conditions environnementales sur la levure, en particulier de détecter son état de stress. L'utilisation d'une méthode de détection et de quantification de la protéine Hsp12 le permettrait. Cela

permettrait également de comparer la réponse au stress de différentes souches de levure. Pour compléter les résultats concernant les transcrits du gène *HSP12*, il faudrait néanmoins vérifier la quantité de protéine Hsp12 traduite en réponse à ces différents stress.

Quel est le rôle de la protéine Hsp12 dans la résistance aux stress ?

2.2 Rôle d'Hsp12 dans la résistance aux stress

La résistance au stress reflète l'effet du stress sur la survie des levures. Elle peut être évaluée grâce à la mesure de la viabilité cellulaire suite à l'application d'un stress. Pour connaître le rôle de la protéine Hsp12 dans la résistance, trois types de souches de levures ont été comparées : des souches sauvages exprimant le gène *HSP12*, des souches surexprimant le gène *HSP12* et des souches dont le gène *HSP12* est inactivé. La viabilité des différentes souches a ensuite été comparée à la quantité de transcrits du gène *HSP12*. Dans la littérature, l'impact de trois stress a été évalué : la dessiccation, le stress thermique et le stress éthanolique.

2.2.1 Résistance à la dessiccation

Plusieurs études se sont intéressées à la surexpression du gène *HSP12*. *Kim et al* ont montré que la surexpression du gène *HSP12* permet d'augmenter significativement la viabilité des levures soumises à un processus de dessiccation (*Kim et al., 2018*). Afin de comprendre le rôle de la protéine Hsp12 sur la viabilité des levures, *Sales et al* ont analysé des liposomes en présence de concentrations croissantes de protéine Hsp12. Après un processus de dessiccation, plus la quantité de protéine Hsp12 est importante, plus l'intégrité des liposomes est conservée (*Sales et al., 2000*).

Kim et al ont également montré que, chez des levures soumises à un processus de dessiccation, l'inactivation du gène *HSP12* n'entraîne pas de diminution de la viabilité des levures. En revanche, l'inactivation de la voie de synthèse du tréhalose entraîne une diminution de la viabilité des levures. Lorsque que cette inactivation est couplée à celle du gène *HSP12*, la viabilité des levures est encore plus diminuée. Le tréhalose s'intercalerait

dans les membranes pour éviter l'apparition de dommages membranaires causés par la dessiccation. En cas de dommages au niveau de la membrane, la protéine Hsp12 interviendrait alors pour la remodeler (Kim *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent une synergie entre ces deux acteurs lors de la dessiccation des levures.

2.2.2 Résistance au stress thermique

Pacheco et al ont comparé 2 souches de levures : une souche sauvage et une souche sur-exprimant le gène *HSP12*. Suite à l'application d'un stress thermique à 50°C, la viabilité des levures sur-exprimant le gène *HSP12* est supérieure à celle des levures sauvages (80% contre 50%) (*Pacheco et al.*, 2009). Il existerait donc une relation entre les transcrits du gène *HSP12* et la résistance au stress thermique.

2.2.3 Résistance au stress éthanolique

Sales et al ont comparé la viabilité de 2 souches de levures en présence de quantités croissantes d'éthanol. Ils ont utilisé une souche sauvage et une souche dont le gène *HSP12* a été inactivé (Δ HSP12). En présence de 10% d'éthanol, la viabilité de la souche Δ HSP12 est inférieure à celle de la souche sauvage. En présence de 12% d'éthanol, la souche Δ HSP12 n'est plus viable alors que la souche sauvage possède toujours une viabilité de 75% (*Sales et al.*, 2000). Il existerait donc une relation entre la présence du gène *HSP12* et la résistance des levures au stress éthanolique.

2.2.4 Conclusion

Ces différentes études montrent que la protéine Hsp12 est impliquée dans la résistance des levures à la dessiccation, au stress thermique et éthanolique. L'expression du gène *HSP12* est donc favorisée par plusieurs stress et pourrait participer à la résistance des levures aux stress. Quels mécanismes interviennent pour réguler l'expression du gène *HSP12* ?

2.3 Régulation de l'expression du gène *HSP12*

Chez la levure, la réponse générale aux stress est gouvernée principalement par deux voies : la voie de réponse aux chocs thermiques avec l'action du facteur de transcription Hsf1 et la voie générale de réponse aux stress avec les facteurs Msn2 et Msn4. Ces différents facteurs de transcription interviennent dans la régulation de l'expression du gène *HSP12*.

2.3.1 Hsf1

Le facteur Hsf1 (Heat shock factor 1 – facteur de choc thermique 1) est un facteur de transcription impliqué dans l'expression des gènes *HSP*, dont *HSP12* (Boy-Marcotte *et al.*, 1999). Le facteur Hsf1 est une protéine de 150 kDa constituée d'un domaine de liaison à l'ADN, 3 leucine zipper responsables de la trimérisation du facteur et 2 domaines de trans-activation en position N-terminale et C-terminale. La forme active du facteur de transcription est un homotrimère du facteur Hsf1 (Bonner *et al.*, 1994). La forme trimérique peut se lier à certaines séquences cibles nommées éléments de choc thermiques (Heat shock elements – HSE). Les HSE sont constitués de multiples séquences pentamériques nGAAn et nTTCn (où « n » peut être n'importe quel nucléotide) qui permettent la liaison avec les trimères Hsf1 (Sorger and Pelham, 1987). Ces éléments sont situés au sein des promoteurs des gènes *HSP* et notamment du gène *HSP12* (Praekelt and Meacock, 1990; Erkina and Erkine, 2006) (Figure 5A).

Un modèle de régulation du facteur Hsf1 par les protéines chaperonnes a été proposé en 2007 par Voellmy pour les eucaryotes (Voellmy and Boellmann, 2007). Ce modèle repose sur l'inhibition du facteur Hsf1 par les protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp90. En l'absence de stress, le facteur Hsf1 est sous la forme de monomère associé à la protéine Hsp70 ou Hsp90 dans le cytoplasme. Le facteur est donc inactif et il n'y a pas de transcription des gènes. La levure possède une particularité, puisqu'il a été montré qu'une partie du facteur Hsf1 est liée constitutivement aux HSE (Jakobsen and Pelham, 1988). Les gènes, dont le gène *HSP12*, sont donc exprimés à un niveau basal. En présence d'un choc thermique, la quantité de protéines non conformées va augmenter dans la cellule. Les protéines chaperonnes vont alors se lier préférentiellement à ces protéines pour assurer le

bon fonctionnement de la levure. D'importantes quantités de facteur Hsf1 sont ainsi libérées et peuvent donc former des homotrimères. Ces trimères vont entrer dans le noyau, être phosphorylés et se fixer aux HSE (Figure 5B). Les transcrits du gène *HSP12* seront alors en quantité supérieure par rapport au niveau basal (Holmberg *et al.*, 2001). Si la cellule retrouve des conditions optimales, la quantité de protéines non conformées va chuter. Ainsi, l'excès de protéines chaperonnes va entraîner une diminution de l'activité du facteur Hsf1. La transcription des gènes *HSP* sera ainsi diminuée, au niveau basal (Richter *et al.*, 2010). Le facteur Hsf1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, a ainsi une activité transcriptionnelle basale et de grandes quantités sont rapidement mobilisables lors d'un stress thermique. Cette voie répond principalement au stress thermique.

-606 CCCACTAACGCCAGCCGAAAATGAAAAAAGGGTCGGTCGGTGATGTG -561

-560 TGGGTGCCAGCTGGCGGTAGCAATGACGACGTTGTGACGGCCCTTGGCTCTTGGGACAAGGACTAGAAGCCAAAAGCCA -481

-480 GAGGCGGTAAAAATAGCAAGA CTAGAA TTTGCTGGCATCTGTTA AGGGGATATGTTGCAACTTGC AGGGGSCGGCACAA -401

-400 AATAACATAGAAAACGTAGTAAAC AGGGGAAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAGGAAAAAACCATTGACGTAGAAAAT -321

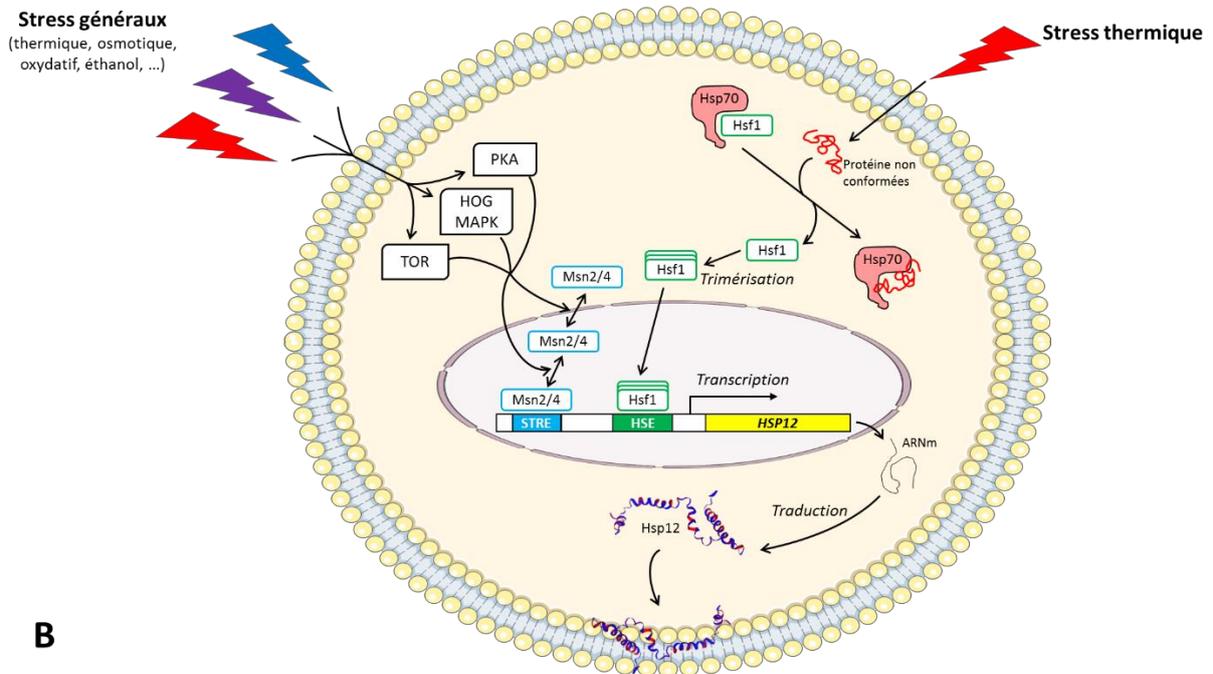
-320 TGAAAGAAGGAAAGGTATACGCAAGCATTATAACAACCCACAACACAGACCAGAAGCACTCTAGACGGAGAGTAAGTACG -241

-240 ATCTACAG CCCCTGGAAAATCGTTTGGTCAACTTTGAGGTTCCGGTCGTC CCCCTCTTGATCT GAAAGGTCTTTCTCTAA -161

-160 ATCTATATTA AACGTATAAATAGGACGGTGAATTGCGTTCTACTTCTCAATTGCGTTTGATCTTATTTAATCTCTCTC -81

-80 TAATATATAGAAAAAACCATCTGATTATTCGATAATCTCAACAACAACACTCAAAACAAAAAACCATAAATACAACA -1

A



B

Figure 5 : Régulation de l'expression du gène HSP12.

A .Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène HSP12. Les éléments HSE et STRE sont mises en évidence respectivement en vert et bleu.

B. Schéma de régulation de l'expression du gène HSP12.

2.3.2 Msn2 et Msn4

La deuxième voie de régulation des gènes *HSP* est menée par les facteurs Msn2 et Msn4 (multicopy suppressor of SNF1 mutation). Ces deux facteurs ont des séquences et des rôles similaires, ils sont donc associés dans la régulation de la réponse au stress. Ce sont des protéines en doigts de zinc qui ont la capacité de se fixer à l'ADN afin de réguler la transcription des gènes impliqués dans la réponse aux stress dont le gène *HSP12* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Amorós and Estruch, 2001). Ils reconnaissent spécifiquement des séquences nommées éléments de réponse aux stress (stress responsive elements – STRE). Ces éléments sont caractérisés par une ou plusieurs séquences pentamériques CCCCT ou AGGGG et sont situés dans les régions promotrices des gènes de réponse aux stress (Estruch, 2000). Ces éléments sont présents notamment au sein du promoteur du gène *HSP12* (Varela *et al.*, 1995; Boy-Marcotte *et al.*, 1999) (Figure 5A).

La régulation des facteurs Msn2 et Msn4 est très complexe. Ils sont régulés par plusieurs voies de signalisation qui ont une action sur la localisation des facteurs et/ou leur activation (Figure 5B). Les différentes voies impliquées sont : la voie de la protéine kinase A, la voie TOR, la voie HOG MAPK. Pour qu'il y ait une expression du gène *HSP12*, les facteurs Msn2 et Msn4 doivent être localisés dans le noyau et être actifs (Gutin *et al.*, 2015). Par exemple, il a été montré que lors d'un stress thermique, l'activité de la protéine kinase A est faible dans le cytoplasme. Cela entraîne l'accumulation des 2 facteurs de transcriptions dans le noyau et ainsi l'augmentation des transcrits associés. A l'inverse, une importante activité de la protéine kinase A induit une diminution de la localisation nucléaire de Msn2 et Msn4. Ils ne peuvent donc pas induire la transcription des gènes associés (Görner *et al.*, 1998).

La régulation de Msn2 et Msn4 par plusieurs voies de signalisation permet d'expliquer leur implication dans de nombreux stress tels que les stress thermique, oxydatif, osmotique, éthanolique ou la privation de glucose (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

2.3.3 Conclusion

Les différents stress (thermique, osmotique, oxydatif, éthanolique, privation de glucose) sont intégrés par les cellules selon deux voies de signalisation spécifiques de la

réponse aux stress (Figure 5B). Ces stress mènent ainsi à l'activation et au déplacement dans le noyau de trois facteurs de transcription Hsf1, Msn2 et Msn4. Le facteur Hsf1 va reconnaître les séquences HSE et les facteurs Msn2 et Msn4 vont reconnaître les séquences STRE dans la région promotrice du gène *HSP12* (Figure 5A). Le gène *HSP12* est donc régulé par ces 2 voies de réponse aux stress, ce qui n'est pas le cas pour tous les gènes *HSP*. Cette particularité permet d'expliquer sa forte expression en réponse à une multitude de stress et en fait donc un marqueur de stress intéressant chez la levure. Une fois la protéine Hsp12 traduite, quelle est son rôle ?

2.4 Hsp12, une chaperonne de membrane ?

La protéine Hsp12 pourrait interagir avec la membrane plasmique de la levure. En effet, des analyses par immunocytochimie ont révélé que la protéine Hsp12 est localisée au niveau de la membrane plasmique (Sales *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que la protéine Hsp12 pouvait interagir avec certains phospholipides sous forme de liposomes (Welker *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018). Cette interaction conduit à l'apparition de structures secondaires (hélices α). Plusieurs phospholipides ont été testés et il apparaît que la protéine Hsp12 se lie uniquement avec ceux possédant une charge négative (les dérivés du phosphatidylglycérol (PG) et du phosphatidylinositol (PI)). Il a également été montré que la protéine Hsp12 entraînait la rigidification d'une bicouche lipidique constituée de PG (Welker *et al.*, 2010). Les auteurs ont ainsi suggéré une liaison de la protéine Hsp12 aux phospholipides de la membrane plasmique des levures, et un possible rôle de la protéine dans la stabilisation de la membrane via la modulation de sa fluidité. Toutefois ces résultats ont été obtenus avec des liposomes de PG, un phospholipide qui n'existe pas chez les levures. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction de la protéine Hsp12 avec des phospholipides présents dans la membrane plasmique des levures, afin de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques.

Traditionnellement, lorsque l'on évoque les protéines Hsp, elles sont associées à leur activité chaperonne pour des protéines non conformées. La protéine Hsp12, quant à elle, pourrait interagir avec les phospholipides comme une chaperonne de membranes et ce n'est pas la seule protéine de stress à avoir ce rôle. En effet, des protéines Hsp peuvent interagir

avec la membrane plasmique chez différents organismes (Horváth *et al.*, 2008). C'est le cas par exemple de la protéine Hsp17 de la cyanobactérie *Synechocystis sp* (Tsvetkova *et al.*, 2002), HspA de la cyanobactérie *Synechococcus vulcanus* (Nitta *et al.*, 2005), Hsp29 de l'eukaryote *Toxoplasma gondii* (De Miguel, Echeverria and Angel, 2005) et Hspb2 des cellules humaines (Nakagawa *et al.*, 2001). La protéine Hsp17 a été largement étudiée. Cette protéine interagit avec des phospholipides et préférentiellement ceux chargés négativement. Cette interaction entraîne une augmentation de l'ordre des lipides ainsi qu'une augmentation de la viscosité, traduisant une augmentation globale de la rigidité de la membrane. Par conséquent, l'association de la protéine Hsp17 aux membranes permettrait de préserver l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes en cas de stress (Tsvetkova *et al.*, 2002). La protéine Hsp12 présente des similarités avec la protéine Hsp17. Il serait alors pertinent d'explorer l'interaction de la protéine Hsp12 avec des bicouches lipidiques et de voir si la protéine préserve leur intégrité.

3 Hsp12, une protéine sucrée

Cette thèse s'inscrit dans une collaboration avec l'entreprise BioLaffort et l'unité de recherche Œnologie de l'ISVV afin d'étudier le rôle de la protéine Hsp12 sur le goût du vin.

Le vin est un produit complexe, constitué de plusieurs milliers de composés dont seulement une petite partie est connue. Parmi ces composés, certains possèdent des propriétés organoleptiques et peuvent ainsi participer au goût du vin. Les saveurs du vin sont liées en partie aux molécules présentes dans les raisins, mais elles vont évoluer au cours de la vinification et jusqu'à la dégustation. Les composés responsables de l'acidité ont fait l'objet de nombreuses études et sont actuellement bien connus (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2017). Ce sont les acides organiques, avec notamment les acides tartrique, malique et lactique. Concernant l'amertume, des composés phénoliques ont été identifiés comme responsable en partie de cette saveur (Hufnagel and Hofmann, 2008). La saveur sucrée des vins secs, quant à elle, est la moins expliquée au niveau moléculaire. A ce stade, il faut distinguer le caractère sucré des vins moelleux de celui des vins secs. En effet dans les vins moelleux, le gout sucré est dû au glucose et au fructose du raisin, non transformés par les levures. Par contre dans les vins secs, le goût sucré ne peut être attribué aux sucres car leurs teneurs sont inférieures à leurs seuils de perception. On parle alors dans ce cas de « sucrosité » car il n'y a pas de sucres. Quelles sont les déterminants de la sucrosité ?

3.1 Les déterminants de la saveur sucrée des vins secs

3.1.1 Impact des lies de levures sur la saveur sucrée

3.1.1.1 *Les lies de levures*

Lors de la vinification, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée pour réaliser la fermentation alcoolique. Elle permet de transformer le glucose et le fructose du raisin en éthanol. A la fin de la fermentation alcoolique, les levures meurent suite à l'épuisement des sucres ou lorsque le taux d'alcool devient trop élevé. Les levures vont alors sédimenter et former une lie. Elle est constituée essentiellement de levures ainsi que de résidus organiques provenant du raisin. Dans cette lie, les levures vont s'autolyser, c'est-à-dire s'autodégrader

par l'action de leurs propres enzymes. Il y a ainsi une libération des composés cellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides, polysaccharides) qui vont modifier les propriétés physicochimiques et organoleptiques du vin (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 2002). Plusieurs propriétés physicochimiques ont ainsi été assignées aux lies comme par exemple la stabilisation tartrique (Moine-Ledoux *et al.*, 1997) et protéique des vins blancs (Ledoux *et al.*, 1992), la protection de la couleur et de l'arôme vis-à-vis de l'oxydation (Fornairon-Bonnefond *et al.*, 1999) ou la maîtrise des défauts de réduction (Lavigne and Dubourdiou, 1996). Au niveau organoleptique, les viticulteurs rapportent de façon empirique une augmentation de la sucrosité dans deux cas :

- i. lorsqu'ils réalisent l'élevage du vin sur des lies de levures
- ii. lors de la macération post-fermentaire à chaud des vins rouges

Cependant aucun lien n'a été fait avec des composés chimiques. Toutefois, ces deux phases coïncident avec l'autolyse des levures et donc avec la libération de composés cellulaires, tels que par exemple des acides nucléiques, des polysaccharides ou des protéines. Des études ont analysé l'impact des nucléotides (Charpentier *et al.*, 2005) et des polysaccharides (Jones *et al.*, 2008) de la levure sur la sucrosité. Aucun lien n'a été fait entre ces constituants cellulaires et la sucrosité. Certaines protéines pourraient-elles être responsables de la sucrosité des vins ?

3.1.1.2 **Rôle de la protéine Hsp12 sur la sucrosité des vins**

Dans un premier temps, l'incidence de l'autolyse des levures sur le goût des vins a été étudiée. Des levures ont été ajoutées à différentes teneurs dans un vin rouge. Après dix jours à 32 °C, pour favoriser l'autolyse des levures, les modalités obtenues ont été soumises à un panel de dégustateurs afin d'être classées en fonction de l'intensité de la saveur sucrée. Les résultats ont montré que la sucrosité des vins augmentait avec la quantité de levures présentes pendant l'autolyse, confirmant ainsi les observations des vinificateurs (Marchal *et al.*, 2011a). Cette étude suggère la libération d'une ou plusieurs molécules « sucrées » lors de l'autolyse des levures.

Des travaux ont été menés sur le fractionnement par ultrafiltration d'extraits de levures autolysées. Ils ont permis d'isoler une fraction sapide de nature peptidique dont la

masse moléculaire des constituants était estimée entre 0,5 et 3 kDa. L'analyse de cette fraction par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a permis d'identifier des peptides issus de la protéine Hsp12. L'analyse organoleptique a montré que l'ajout de cette fraction sapide dans le vin augmentait la sensation de sucrosité. Cette fraction perd ses propriétés gustatives lorsqu'elle est digérée par la protéinase K, une enzyme dégradant les protéines (Moine, 2005). La protéine Hsp12 pourrait donc être impliquée dans cette sensation de sucrosité.

Puis, une analyse sensorielle de vins obtenus à partir de souches de levures exprimant ou n'exprimant pas la protéine Hsp12 a été réalisée. Cette étude a montré une sensation de sucrosité plus importante pour le vin obtenu à partir des levures exprimant la protéine Hsp12 (Marchal *et al.*, 2011a).

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence le rôle possible de la protéine Hsp12 dans la sucrosité du vin. Cependant, il n'a pas été démontré si le goût sucré provient de la protéine Hsp12 entière ou d'un ou plusieurs peptides issus de la protéine Hsp12. L'objectif est donc de démontrer le lien entre la sucrosité et la protéine Hsp12 entière ou lysée.

3.1.2 Les autres contributions à la saveur sucrée des vins secs

Les lies de levures et la protéine Hsp12 ne sont pas les seuls acteurs de la sucrosité. En effet, des études ont montrés que la sucrosité des vins secs est également associée à des molécules présentes dans les pépins de raisins (Cretin *et al.*, 2019) ainsi qu'à des molécules libérées par le bois lors de l'élevage sous-bois de chêne du vin (Marchal *et al.*, 2011b). Il existe ainsi une multitude de composés impliqués dans la sucrosité du vin, allant des petites molécules aux protéines. La protéine Hsp12 est la première protéine identifiée dans le vin ayant un impact gustatif. Existe-t-il dans la nature d'autres protéines qui ont également une saveur sucrée ?

3.2 Les autres protéines sucrées

A l'heure actuelle, une panoplie de molécules sont connues pour leur goût sucré (Figure 6).

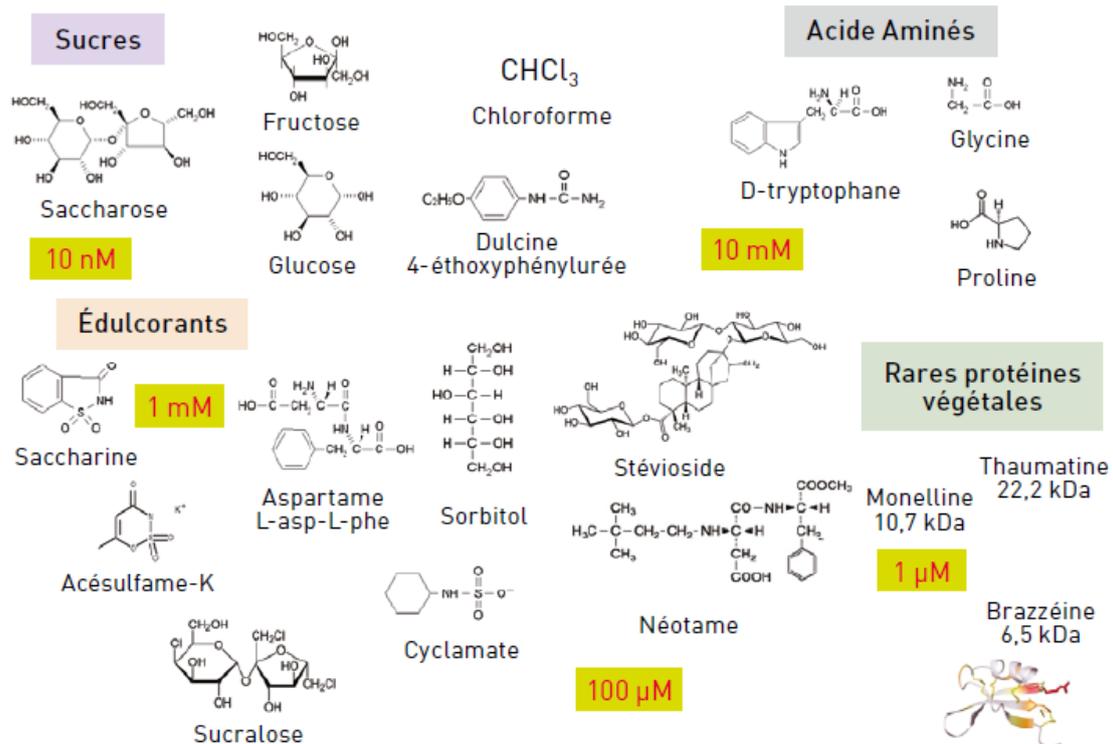


Figure 6 : Les molécules responsables d'un goût sucré d'après Briand. Les seuils de détection varient du micromolaire à la dizaine de millimolaires.

Parmi ces molécules, huit protéines sont identifiées comme édulcorantes, c'est-à-dire qu'elles confèrent une saveur sucrée, tout en ayant un index glycémique faible ou nul. Ces protéines sont : la thaumatococine (van der Wel and Loeve, 1972), la brazzéine (Ming and Hellekant, 1994), la monelline (Inglett and May, 1969), la mabinline (Liu *et al.*, 1993), le lysozyme (Maehashi and Udaka, 1998), la pentadine (Faus, 2000), la curculine (Harada *et al.*, 1994), et la miraculine (Takahashi *et al.*, 1990). Ces protéines ont été isolées à partir de plantes tropicales sauf le lysozyme qui provient du blanc d'œuf (Joseph *et al.*, 2019). Parmi ces protéines, seule la thaumatococine est commercialisée comme additif alimentaire dans certains produits alimentaires (desserts laitiers, confiseries, ...) (Réglement (UE) n°1129/2011, 2011). L'autorisation de commercialisation de la brazzéine, quant à elle, est en

cours d'étude (García-Almeida *et al.*, 2018). Les principales caractéristiques de ces deux protéines sont synthétisées dans le tableau ci-dessous (Tableau III).

Tableau III : Caractéristiques de deux protéines édulcorantes : la thaumatine et la brazzéine.

Protéine	Acides aminés (MM)	Goût sucré versus saccharose	Propriétés	Source naturelle
Thaumatine	207 (22 kDa)	1600x à 3000x	<ul style="list-style-type: none"> • Goût légèrement différent du saccharose • Stabilité thermique • Approuvé USA et UE (E957) 	<i>Thaumatococcus danielli</i>
Brazzéine	54 (6,5 kDa)	500x à 2000x	<ul style="list-style-type: none"> • Goût similaire au saccharose • Stabilité thermique et au pH 	<i>Pentadiplandra brazzeana</i>

L'avantage de ces deux protéines est qu'elles ont un goût beaucoup plus sucré que le saccharose, jusqu'à 3000 fois supérieur pour la thaumatine. De plus, elles présentent une grande stabilité thermique. Cela permet l'utilisation de procédés alimentaires, notamment de stérilisation, sans perte de leur propriété sucrante.

Les protéines comme les glucides apportent des calories lors de leur ingestion, de l'ordre de 4 calories pour 1 gramme de protéines ou de glucides. Toutefois, ces protéines possèdent des pouvoirs sucrants beaucoup plus importants que le saccharose. Les quantités utilisées dans les aliments sont ainsi très faibles (quelques mg) par rapport au saccharose pour obtenir un goût sucré similaire. Les protéines édulcorantes sont donc considérées comme très peu caloriques. Elles présentent ainsi un grand intérêt actuellement pour la gestion de certaines pathologies comme le diabète. De plus, la sensibilisation grandissante du grand public envers les effets indésirables du saccharose et des édulcorants artificiels (aspartame, stéviolside, ...) crée des opportunités pour le développement de ces édulcorants naturels. Les recherches sur ces molécules sont en progression et visent à démontrer leur innocuité pour améliorer leur utilisation alimentaire et possiblement thérapeutique. L'avenir du goût sucré reposerait-il sur des protéines ?

Les glucides et les protéines sont deux classes de molécules à part, qui présentent des différences de structure notable. Les glucides sont de petites molécules contrairement

aux protéines qui sont des molécules complexes constituées de plusieurs dizaines d'acides aminés. Alors comment expliquer ce goût sucré commun ?

3.3 Le récepteur du goût sucré T1R2-T1R3

La perception du goût se fait principalement au niveau de la langue et plus précisément au sein des papilles gustatives. Les papilles sont formées d'un ou plusieurs bourgeons du goût, qui sont des structures sphériques formées par les cellules gustatives. Ces cellules possèdent différents types de récepteurs permettant la perception des cinq goûts fondamentaux (sucré, salé, acide, amer et umami). Pour autant, il n'existe pas de cartographie universelle de la langue, contrairement à certaines idées reçues. La sensibilité aux saveurs des différentes parties de la bouche dépend des individus (Faurion, 2000). La perception du goût sucré, que ce soit pour les glucides, les édulcorants artificiels ou les protéines édulcorantes, repose sur la stimulation d'un même récepteur, le récepteur couplé aux protéines G T1R2-T1R3 (DuBois, 2016). La reconnaissance des molécules par ce récepteur engendre une cascade de transduction responsable de la formation d'un signal transmis jusqu'au cortex cérébral. La perception du goût sucré devient alors consciente. Ce récepteur dit du goût sucré est composé de deux sous-unités, chacune constituée d'un grand domaine extracellulaire relié à un domaine transmembranaire par une région riche en cystéine (Vigues *et al.*, 2009) (Figure 7). Plusieurs équipes ont travaillé sur les sites de liaison de différentes molécules sucrées. Il apparaît qu'il existe au moins 6 sites de liaison sur le récepteur, correspondant aux domaines extracellulaires et transmembranaires ainsi qu'aux régions riches en cystéine (DuBois, 2016). Les sites de liaisons correspondant aux molécules cités précédemment sont montrés ci-dessous (Figure 7). Cette multitude de possibilités de liaison explique en partie les différences de perception entre les molécules sucrées.

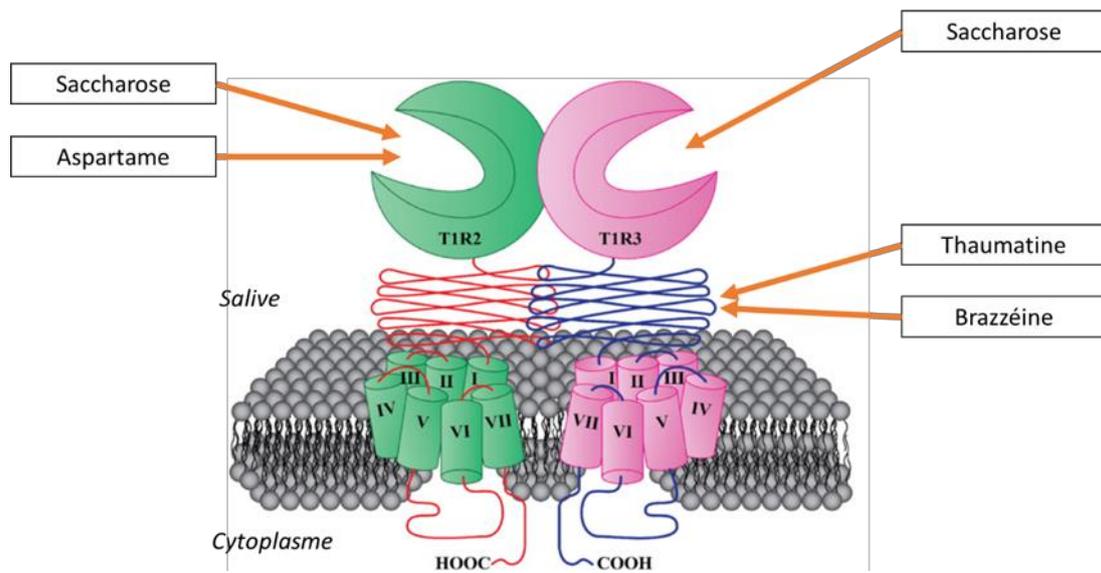


Figure 7 : Illustration du récepteur T1R2-T1R3 avec les sites de liaison de certaines molécules sucrées d'après DuBois.

Il existe donc plusieurs protéines apportant un goût sucré au travers de leur interaction avec le récepteur T1R2-T1R3. Il sera donc intéressant d'étudier la liaison de la protéine Hsp12 à ce récepteur afin de confirmer son goût sucré.

4 Objectifs de la thèse

Au cours de la thèse, la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* Fx10 a été étudiée. Cette souche a été obtenue par la société Laffort, en partenariat avec l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, lors de la sélection de souches de levures exprimant fortement la protéine Hsp12. La souche Fx10 a ainsi été obtenue par la méthode d'hybridation (ou breeding), qui vise à introduire des caractères spécifiques dans des levures œnologiques (Blondin, 2008). Cette technique repose sur le croisement de deux souches de levures pour regrouper au sein d'une même levure les propriétés d'intérêt des deux souches parentales. Cette souche a montré une forte expression des transcrits du gène *HSP12* (Marchal *et al.*, 2015).

Les transcrits du gène *HSP12* ont été largement étudiés dans la littérature suite à l'application de différents stress lors de la culture de *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, la protéine Hsp12 n'a jamais été directement quantifiée. L'impact de différents stress sur les quantités de protéine Hsp12 sera ainsi étudié.

Des cultures de la souche Fx10 seront réalisées afin d'obtenir des quantités suffisantes de protéine Hsp12 native pour la purifier et la caractériser. L'étude de la protéine native (non recombinante) permet de s'affranchir de potentiels biais liés à une manipulation génétique de la levure.

Un procédé de purification de la protéine Hsp12 sera ensuite développé. La protéine Hsp12 étant native, elle n'est pas surexprimée par rapport aux autres protéines de la levure et ne possède pas de caractéristiques permettant de la purifier spécifiquement par chromatographie d'affinité. C'est donc un défi de l'isoler spécifiquement. Une fois la protéine Hsp12 pure obtenue, la caractérisation sera menée selon 2 axes.

D'une part, la structure de la protéine Hsp12 sera étudiée en lien avec son rôle physiologique chez la levure. Des études ont montré que la protéine Hsp12 recombinante est une protéine IDP et qu'elle pourrait se lier à la membrane des levures. Des analyses biophysiques et calorimétriques de la protéine Hsp12 native permettront de confirmer ces résultats grâce à l'utilisation de membranes modèles biomimétiques.

D'autre part, les caractéristiques organoleptiques de la protéine seront évaluées. En effet, il n'a pas été démontré si le goût sucré provenait de la protéine Hsp12 entière, ou, d'un ou plusieurs peptides issus de sa digestion enzymatique. Le lien entre la sucrosité, la protéine Hsp12 entière et la protéine lysée sera ainsi évalué.

Chapitre 2.
Matériel, méthodes
et développement

Chapitre 2. Matériel, méthodes et développement

1 Culture des levures

1.1 Matériel biologique

1.1.1 Souches de levure

Quatre souches de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées. Les souches Fx10 et VL3 sont des souches œnologiques utilisées pour la vinification et commercialisées par la société Laffort. La souche A24 est une souche utilisée en distillerie (Alcotech). Enfin la souche Δ HSP12 correspond à la souche Fx10 modifiée génétiquement afin de déléter le gène *HSP12*.

1.1.2 Milieu de culture

Les cultures sont menées dans du milieu riche Yeast Peptone Dextrose (YPD). Ce dernier est préparé avec 10 g/L d'extrait de levure, 20 g/L de peptone et 20 g/L de glucose. Du milieu YPD solide est également préparé en ajoutant 20 g/L d'agar. Le milieu est stérilisé à 110°C pendant 30 min dans un autoclave (Systec) avant la mise en culture.

1.2 Culture des levures

1.2.1 Culture en fiole Erlenmeyer

Une colonie de la souche de levure à étudier est prélevée à partir d'une culture en milieu YPD solide. L'ensemencement des précultures est réalisé dans du milieu YPD. Les précultures sont incubées à 30°C, sous agitation à 180 rpm pendant 15 heures (Infor HT). Puis, la densité optique (DO) est mesurée à 600 nm afin de définir le volume de préculture à inoculer dans les Erlenmeyer pour obtenir une DO de 0,1. Les cultures sont ensuite incubées à 30°C avec une agitation de 180 rpm.

1.2.2 Culture en bioréacteur

Les cultures en bioréacteur sont réalisées dans des bioréacteurs Biostat B plus (Sartorius Stedim Biotech) d'une contenance de 2L et 5L. L'ensemencement des précultures en Erlenmeyer est réalisé dans du milieu YPD à partir de stocks de levures. Les précultures sont incubées à 30°C, sous agitation à 180 rpm pendant 15 heures (Infor HT). Puis, la densité optique (DO) est mesurée à 600 nm afin de définir le volume de préculture à inoculer dans les bioréacteurs pour obtenir une DO de 0,1.

Les bioréacteurs sont équipés de sondes permettant la mesure en ligne de plusieurs paramètres de culture (température, pH, pO₂ dissous) et leur régulation à une valeur consigne par l'intermédiaire du logiciel de suivi MFCS (Sartorius). Dans cette étude, le pH n'est pas régulé mais est suivi pour une meilleure analyse métabolique des levures. Les sondes pH et pO₂ dissous (Mettler Toledo) sont préalablement calibrées. Un analyseur de gaz (XGas®, Sartorius) est également connecté aux bioréacteurs pour mesurer le CO₂ produit au cours des cultures.

Les cultures sont thermostatées à 30 °C avec une aération d'1 vvm (volume par volume de milieu) et une agitation de 200 rpm minimum. Afin de maintenir une saturation en oxygène dissous minimale du milieu à 10 %, une cascade de régulation est mise en place pour augmenter l'agitation jusqu'à 800 rpm et le débit d'air à 1,5 vvm.

1.2.3 Fermentation et autolyse des levures

1.2.3.1 Fermentation

Du moût de raisin blanc (sauvignon blanc) est fermenté par la souche ΔHSP12 de *Saccharomyces cerevisiae*, qui correspond à la souche Fx10 dont le gène *HSP12* est inactivé. La quantité de sucres fermentescibles initiale du moût (glucose et fructose) est ajustée à 192 g/L grâce à du saccharose. 1350 mL de moût sont inoculés avec 10⁶ levures/mL de moût, puis sont répartis dans 3 bouteilles en verre de 500 mL. Les bouteilles sont fermées non hermétiquement pour permettre les échanges gazeux. La fermentation est réalisée à 24°C. Au bout de 3 jours, la quantité d'azote assimilable est ajustée à 200 mg/L grâce à du sulfate

d'ammonium combiné à de la thiamine (Thiazote, Laffort) et une aération de 2 minutes est réalisée par simple bullage d'air dans les milieux. La fermentation est menée jusqu'à épuisement du glucose, soit 11 jours. Le suivi de la biomasse est réalisé par la mesure de la densité optique à 600 nm. Le suivi de la fermentation est réalisé grâce à la pesée des cultures. En effet, la consommation des sucres (glucose et fructose) conduit à la libération de CO₂ qui va entraîner une perte de masse. Pour 450 mL de moût, la consommation de 86 g de glucose (et/ou fructose) conduit à une libération de 42 g de CO₂. La concentration en sucres résiduels est mesurée par un dosage enzymatique (Enzytec Liquid D-Glucose, R-Biopharm) pour vérifier la fin de la fermentation du vin.

1.2.3.2 *Autolyse induite*

Une autolyse induite des levures est ensuite réalisée, grâce à l'augmentation de la température, afin de mimer les conditions de vinification. Elle diffère de l'autolyse naturelle, qui dure plus longtemps et qui est la conséquence du catabolisme et de la chute de la viabilité cellulaire.

Le vin est séparé en 2 modalités. Dans la modalité 1, il n'y a pas d'ajout et dans la modalité 2, la protéine Hsp12 purifiée est ajoutée à une concentration de 30 mg/L (2,4 µM). Ensuite, l'autolyse des levures est menée sur les 2 modalités. Elles sont ainsi laissées en condition anaérobie à 32°C jusqu'à digestion totale de la protéine Hsp12, soit 2 jours. Le suivi de la digestion de la protéine est réalisé par dosage ELISA. Enfin, les vins sont sulfités, centrifugés et filtrés (0,22 µm). Juste avant la dégustation, la modalité 1 est divisée en 2 autres modalités afin d'étudier l'effet de l'ajout de la protéine Hsp12 entière, non digérée. Dans la modalité 1A, rien n'est ajouté et dans la modalité 1B, la protéine Hsp12 pure est ajoutée à une concentration de 30 mg/L (2,4 µM).

Trois modalités sont ainsi obtenues :

- 1A : vin sans protéine Hsp12
- 1B : vin avec 30 mg/L de protéine Hsp12 entière
- 2 : vin avec 30 mg/L de protéine Hsp12 digérée

Ces modalités sont ensuite dégustées dans la cadre d'un profil sensoriel. L'objectif est de comprendre si la protéine Hsp12 entière et/ou la protéine lysée sont responsables de la sucrosité du vin.

1.3 Suivi de culture

1.3.1 Echantillonnage

Au cours des cultures, des prélèvements du milieu de culture sont effectués. Les échantillons sont centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) afin de séparer les cellules du milieu de culture. Le surnageant est récolté afin d'analyser sa composition par UPLC. Les cellules sont traitées afin d'en extraire les protéines pour les quantifier.

1.3.2 Suivi de la croissance des levures

La concentration des levures est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 600 nm par un spectrophotomètre (SAFAS). A chaque prélèvement de culture, trois dilutions sont effectuées afin d'assurer la représentativité des mesures. La moyenne des trois valeurs de DO est calculée ainsi que la déviation standard.

1.3.3 Détermination de la viabilité

La viabilité des levures est déterminée par coloration au bleu de méthylène. Un tampon sodium-citrate à 68 mM est préparé avec 0,3 mM de bleu de méthylène. 100 µL de solution de coloration sont ajoutés à 100 µL de suspension de levure. Le comptage est réalisé manuellement par observation au microscope sur une cellule de Malassez.

1.3.4 Dosage des substrats et produits du métabolisme

Le dosage du glucose, de l'éthanol, du glycérol et de l'acétate est réalisé à l'aide d'une colonne analytique Aminex® HPX-87H (Biorad) sur un système de chromatographie liquide à ultra performance UPLC ACQUITY (Waters) couplé à un réfractomètre. 10 µL d'échantillon à doser sont injectés sur la colonne dont la température est régulée à 50°C. L'élution isocratique est réalisée avec de l'acide sulfurique à 5 mM avec un débit de 0,6 mL/min pendant 25 min. L'identification et la quantification du glucose, de l'éthanol, du glycérol et de l'acétate sont réalisées à l'aide de standards (Sigma Aldrich).

2 Préparation des extraits protéiques

Tous les échantillons provenant de cultures de levure seront préparés selon la méthode suivante tout au long de la thèse.

2.1 Lyse cellulaire

La protéine Hsp12 est produite dans le cytoplasme de la levure. Plusieurs techniques de lyse mécanique ont été testées pour éviter l'ajout d'enzymes ou de composés chimiques. Il s'est avéré que la sonication était la technique la plus efficace (données non présentées) et a donc été sélectionnée.

Les cellules sont reprises dans un tampon Tris-HCl 50mM pH 8 (1 g de levure dans 5 mL de tampon) puis lysées par sonication (sonicateur Sonics Vibra-Cell VCX 500) en réalisant 10 cycles d'une minute avec une puissance de 20 watts. Les échantillons sont centrifugés à 11000 g pendant 30 minutes à 4°C afin de récupérer le surnageant, contenant la protéine Hsp12.

2.2 Traitement thermique

Il a été montré que la protéine Hsp12 ne précipite pas sous l'effet de la température (Mtwisha). Un traitement thermique est donc réalisé afin d'éliminer les protéines thermosensibles. Le surnageant de lyse, obtenu précédemment, est chauffé au bain marie à 80°C pendant 10 min. Puis, une étape de centrifugation à 11000 g pendant 30 minutes à 4°C est réalisée afin de récupérer le surnageant contenant la protéine Hsp12, nommé extrait protéique (EP). Cette étape correspond à une pré-purification permettant d'éliminer de nombreuses protéines contaminantes.

Pour le développement du procédé de purification, l'extrait protéique est concentré par filtration en flux tangentielle (Labscale TFF System, Merck) grâce à un module d'ultrafiltration Pelicon XL BioMax 10 kDa (Merck Millipore). Le concentrât obtenu correspond à l'extrait brut (EB).

3 Purification

3.1 Matériel

Un automate AKTA Avant 25, piloté par le logiciel Unicorn 7.0 (GE Healthcare) est utilisé pour la purification. La mesure de l'absorbance à 280 nm permet de détecter les protéines.

Un conductimètre (référence HI8820N, HANNA Instruments) et un pH mètre (référence HI2210, HANNA Instruments) sont utilisés pour la préparation des tampons.

3.2 Résines et tampons

Trois types de chromatographie sont testés pour le développement du protocole de purification de la protéine Hsp12. La chromatographie échangeuse d'ions, basée sur des interactions électrostatiques entre la résine et les protéines, est utilisée grâce à la résine Capto Q (GE Healthcare). La chromatographie en mode mixte, mettant en jeu des interactions électrostatiques ainsi que des interactions hydrophobes, est également utilisée. Les résines HEA HyperCel (Pall Life Science), PPA HyperCel (Pall Life Science), MEP HyperCel (Pall Life Science) et Cellufine MAX IB (JNC) sont ainsi évaluées. Enfin, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), basée sur la séparation des molécules selon leur encombrement stérique, est utilisée. Les résines Superdex 75 Increase et Superdex 75 pg sont sélectionnées.

Les tampons sont préparés avec des réactifs Sigma-Aldrich au pH et à la conductivité désirés. Avant utilisation, les tampons sont filtrés et dégazés par filtration sous vide, sur des membranes de nitrate de cellulose 0,22 µm (Merck Millipore).

3.3 Criblage en microplaque

L'objectif du criblage en microplaque est d'analyser plusieurs conditions de purification telles que les résines, les conditions d'accrochage et d'élution sur une seule microplaque. Des microplaques AcroPrep™ Advance 96-Well Filter Plates (Pall Life Science)

sont utilisées. Elles possèdent des filtres de 0,45 μm afin de retenir les résines au fond des puits.

Les résines sont mélangées à une solution d'éthanol à 20% pour obtenir un rapport résine/solution de 50:50 (v/v). Après homogénéisation, 100 μL de la suspension résine/solution sont déposés dans chaque puits.

Ensuite, une étape d'équilibration des résines est réalisée avec les tampons choisis. 200 μL de tampon d'équilibration sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite agitée à 1100 rpm pendant 1min. Enfin le liquide est aspiré grâce à une pompe à vide. Ce protocole est réalisé trois fois afin d'équilibrer les résines.

L'échantillon est reconditionné dans le tampon d'équilibration correspondant grâce à un filtre à centrifuger. 200 μL sont déposés dans chaque puits de la microplaque qui est ensuite agitée à 1100 rpm pendant 2h. Le liquide est ensuite aspiré grâce à une pompe à vide et récupéré dans une microplaque de mesure de 96 puits. Cette fraction correspond aux protéines non retenues (NR) (Figure 8).

Deux étapes de lavage permettent d'éliminer la totalité des protéines qui ne se sont pas fixées sur la résine. 200 μL de tampon d'équilibration sont ajoutés dans chaque puits, la plaque est agitée à 1100 rpm pendant 1 min et le liquide est récupéré par aspiration dans une microplaque. Le protocole est réalisé deux fois, on obtient donc les fractions Lavage 1 et 2 (L1 et L2).

Enfin la dernière étape consiste en l'élution des protéines adsorbées sur les résines. 200 μL de tampon d'élution sont ajoutés dans chaque puits. La microplaque est agitée à 1100 rpm pendant 1 min et le liquide est récupéré par aspiration dans une microplaque. Le protocole d'élution est réalisé deux fois, on obtient donc les fractions Elution 1 et Elution 2 (E1 et E2).

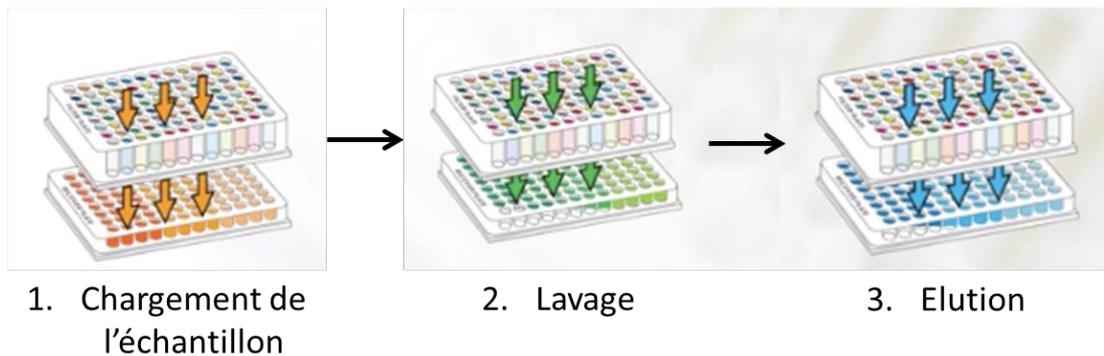


Figure 8 : Principe du criblage en microplaque, d'après GE Healthcare.

- 1. L'échantillon est chargé dans chaque puits de la microplaque. Les fractions récupérées par aspiration contiennent les protéines non retenues sur les résines.**
- 2. Les résines sont lavées. Les fractions récupérées par aspiration contiennent toutes les protéines qui ne se sont pas fixées sur la résine.**
- 3. Les protéines sont éluées. Les fractions récupérées par aspiration contiennent les protéines qui étaient adsorbées sur les résines.**

3.4 Colonnes de purification

Pour la mise au point du procédé de purification, plusieurs colonnes sont utilisées. Tout d'abord, une colonne prépaquée contenant 1 mL de résine Capto Q (GE Healthcare) est utilisée. Puis, une colonne Tricorn 5/50 (GE Healthcare) est paquée avec 1 mL de résine PPA HyperCel (Pall Life Science) selon les recommandations du fournisseur. L'efficacité du paquage est vérifiée en déterminant la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (HEPT) ainsi que l'asymétrie, suite à l'injection de 100 μ L d'acétone à 1% (v/v) dans de l'eau. Une colonne prépaquée superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) est également utilisée.

Pour le changement d'échelle, une colonne prépaquée de 5 mL de résine PPA HyperCel (Pall Life Science) ainsi qu'une colonne XK 16/70 paquée avec 120 mL de résine superdex 75 pg (GE Healthcare) sont utilisées.

Pour les chromatographies préparatives, deux colonnes prépaquées de 5 mL sont connectées en série afin d'obtenir l'équivalent d'une colonne contenant 10 mL de résine PPA HyperCel (Pall life Science). La colonne XK 16/70 paquée avec 120 mL de résine superdex 75 pg (GE Healthcare) est également utilisée.

4 Analyses protéiques

4.1 Gel SDS-PAGE

Afin de vérifier la présence de la protéine Hsp12, des gels SDS-PAGE pré-coulés sont utilisés : MiniPROTEAN Tris/Tricine Precast Gel (BioRad). Les échantillons sont préparés avec du tampon de charge et chauffés à 95°C pendant 5 min pour dénaturer les protéines. Puis la migration est réalisée à 60 V pendant 30 min puis à 100 V pendant 2 h. Le gel est ensuite incubé dans une solution de fixation (10% acide acétique, 40% éthanol) pendant 15 min puis il est révélé grâce à une coloration au bleu de Coomassie en utilisant le colorant QC Colloïdal Coomassie (BioRad) pendant 20 h suivie d'une décoloration à l'eau.

4.2 Electrotransfert et immunodétection des protéines

Afin de vérifier l'identité de la protéine Hsp12, un électrotransfert suivi d'une immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques est réalisé (Towbin *et al.*, 1979).

Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines sont électro-transférées sur une membrane Immobilon-P PVDF (Trans-Blot, BioRad) grâce à un système de transfert électrophorétique (TransBlot Turbo Blotting system, BioRad). Puis, la membrane est saturée grâce à du TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0.1% Tween 20) avec 3 % de lait écrémé en poudre. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire de lapin anti-Hsp12 (1:40000) puis lavée avec du tampon TBST. La membrane est alors incubée avec un anticorps secondaire spécifique des anticorps de lapin couplé à l'enzyme HRP (1:40000) (Goat anti-Rabbit IgG Fc Secondary Antibody HRP, Novex). Après plusieurs lavages avec du tampon TBST, puis du tampon TBS (dépourvu de Tween 20), la protéine Hsp12 est détectée par le système de chimioluminescence ECL (Clarity Western ECL Substrat, BioRad). Le signal est collecté grâce à un imageur ChemiDoc XRS+ (BioRad). Le marqueur Precision Plus Protein WesternC et le conjugué Precision Protein StrepTactin-HRP (BioRad) sont utilisés afin d'identifier la masse moléculaire des protéines.

4.3 Quantification de la protéine Hsp12 par dosage ELISA

Le dosage ELISA permet de quantifier la protéine Hsp12. Le protocole d'ELISA sandwich a été développé grâce à des anticorps polyclonaux anti-Hsp12 de lapin et de cobaye. Les anticorps ont été obtenus par immunisation de lapin et de cobaye, suivi d'une immunopurification des *sera*.

50 μ L d'anticorps anti-Hsp12 de lapin (4 μ g/mL) sont déposés dans chaque puits d'une microplaque 96 puits (Nunc). Les anticorps sont dilués dans un tampon PBS 10 mM à pH 7,4. Puis la plaque est incubée toute la nuit à 4°C. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec 100 μ L de tampon de lavage (PBS 100 mM à pH 7,4 avec 0,05% de Tween 20). Puis, les sites libres sont saturés avec 50 μ L de tampon de saturation (PBS 100 mM à pH 7,4 avec 0,05% de Tween 20 et 0,5% de lait en poudre demi-écrémé) pendant 1h à 37°C. Après une étape de lavage, 50 μ L d'échantillons, dilués dans le tampon de saturation, sont déposés. La gamme de calibration (1 à 13 ng/mL) et les échantillons à analyser sont déposés en duplicat. La microplaque est incubée pendant 1h30 à 37°C. Après une étape de lavage, la microplaque est incubée avec 50 μ L d'anticorps anti-Hsp12 de cobaye (172 μ g/mL), dilués dans du tampon de saturation, pendant 1h30 à 37°C. Après une étape de lavage, la microplaque est incubée avec 50 μ L d'anticorps secondaires (Goat anti-Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen), dilués dans du tampon de saturation (25 ng/mL), pendant 1h à température ambiante sur une plaque d'agitation (180 rpm). Après une dernière étape de lavage, la révélation est réalisée avec 50 μ L de TMB (Single-Component TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Bio-Rad). La réaction est stoppée par l'addition de 50 μ L d'acide sulfurique à 1M. L'absorbance est mesurée à 450 nm par spectrophotométrie.

4.4 SEC-UPLC

Un système de chromatographie liquide à ultra performance UPLC ACQUITY (Waters) est utilisé pour évaluer la pureté de la protéine Hsp12. Une colonne analytique de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ACQUITY UPLC BEH 200 est utilisée afin de séparer les molécules en fonction de leur encombrement stérique. 8 μ L d'échantillon sont

injectés sur la colonne régulée à 30°C. Du tampon sodium-phosphate 0,1 M à pH 6,8 est utilisé comme phase mobile avec un débit de 0,3 mL/min pendant 9 minutes. L'absorbance est mesurée à 280 nm. La pureté est déterminée en comparant l'aire du pic Hsp12 par rapport à l'aire totale des pics.

5 Caractérisation physico-chimique

5.1 Spectrométrie de masse

Une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec Stéphane Chaignepain au Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (CGFB). Cette analyse est réalisée afin de vérifier l'intégrité de la protéine Hsp12 purifiée. 20 μL de protéine Hsp12 purifiée à une concentration de 100 μM sont dessalés par chromatographie en phase inverse grâce à une micro colonne C18 (ZipTip C18 Millipore) et élués avec une solution aqueuse contenant 70% d'acétonitrile et 0,1% d'acide acétique. Une analyse par spectrométrie de masse ESI-TOF est menée en utilisant un spectromètre de masse Q-TOF Premier (Waters). Le GluFibrinopeptide ($[M+H]^+$ = 1570.677 Da) est utilisé pour la calibration externe de la masse. Une analyse précise de la masse est obtenue, grâce à la moyenne de plusieurs espèces ioniques chargées de la protéine Hsp12. Le logiciel de déconvolution MaxEnt (Waters) est utilisé.

5.2 Stabilité thermique

Les échantillons (BSA et Hsp12) sont préparés dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8. Ils sont ensuite incubés à 100°C pendant 10 min. Après centrifugation (11000 g, 20 min) les surnageants sont analysés par gel SDS-PAGE.

5.3 Réticulation chimique

La réticulation chimique (ou cross-linking) est une méthode basée sur la liaison de deux ou plusieurs molécules par des liaisons covalentes grâce à un agent de réticulation (cross-linker). L'objectif est de mettre en évidence la présence d'oligomères. Les réactions de réticulation chimique sont réalisés dans du tampon sodium-phosphate 50 mM avec 150 mM de NaCl à pH 7,2. Le glutaraldéhyde est utilisé comme agent de réticulation. Il est utilisé à des concentrations de 0,01% et 0,1% avec 10 μM de protéine Hsp12 ou 20 μM d'aldolase,

pendant 15 min et 1 h. L'aldolase est utilisé comme témoin positif au regard de sa forme tétramérique (160 kDa). Les mélanges sont analysés par gel SDS-PAGE.

5.4 Préparation des liposomes

Des liposomes sont préparés afin d'étudier l'interaction de la protéine Hsp12 avec des phospholipides. Ils sont préparés en dissolvant la quantité nécessaire de phospholipides pour obtenir la concentration finale voulue, dans un mélange dichlorométhane/méthanol (2:1, v/v) afin de s'assurer de la miscibilité complète des composants. Un film lipidique est formé en évaporant le solvant sous flux d'azote puis le film est placé sous vide pendant 12h.

5.4.1 Vésicules multi-lamellaires (MLVs)

Pour former des MLVs, les films lipidiques sont hydratés avec du tampon sodium-phosphate 10 mM à pH 7,2 puis vortexés. Les MLVs sont utilisées pour les expériences de DSC (Differential Scanning Calorimetry) car ils permettent d'obtenir un signal de transition de phase net.

5.4.2 Grandes Vésicules Unilamellaires (LUVs)

Pour former des LUVs, 5 cycles de congélation à l'azote liquide et décongélation dans un thermomixer (50°C, 450 rpm) sont effectués sur une suspension de MLVs. La suspension est ensuite passée à travers un mini-extrudeur équipé d'un filtre de polycarbonate présentant des pores de 0,1 µm (Avanti). L'analyse de la suspension obtenue après extrusion par DLS (Dynamic Light Scattering) confirme une distribution d'objets de rayon hydrodynamique de 100 nm. Les LUVs sont utilisées pour les expériences d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) car ils permettent d'assurer une quantité homogène de lipides entre les liposomes.

5.4.3 Petites Vésicules Unilamellaires (SUVs)

La formation de SUVs est réalisée également à partir d'une suspension de MLVs. 5 cycles de congélation à l'azote liquide et décongélation dans un thermomixer (50°C, 450 rpm) sont effectués. Puis, la suspension est placée dans un bain à ultrasons jusqu'à obtenir une suspension limpide. Pour éliminer d'éventuels MLVs restantes, la suspension est filtrée avec des filtres de 0,22 μm . La taille des SUVs est comprise entre 20 et 50 nm. Les SUVs sont utilisées pour les expériences de dichroïsme circulaire.

5.5 Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD) repose sur la capacité des structures optiquement actives à absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite de la lumière polarisée circulairement à gauche. Une onde électromagnétique est définie comme la somme de deux ondes circulaires polarisées respectivement à droite et à gauche. Si les deux ondes circulaires polarisées possèdent la même fréquence et la même amplitude, alors leur résultante forme un cercle (Figure 9A). Si la lumière polarisée traverse une solution optiquement active, les ondes circulaires polarisées à droite et à gauche ne vont plus se propager à la même vitesse à travers celle-ci, ce qui va entraîner un déphasage. En sortie de solution, les deux ondes vont conserver ce déphasage. La somme des deux ondes circulaires va alors former une ellipse dont l'ellipticité sera mesurée avec un dichrographe (Figure 9B). La liaison peptidique est une structure optiquement active qui absorbe différemment les lumières polarisées à droite et à gauche. En fonction des orientations des liaisons peptidiques de la protéine, le spectre de CD adopte un profil particulier propre à chaque structure secondaire (Figure 9C).

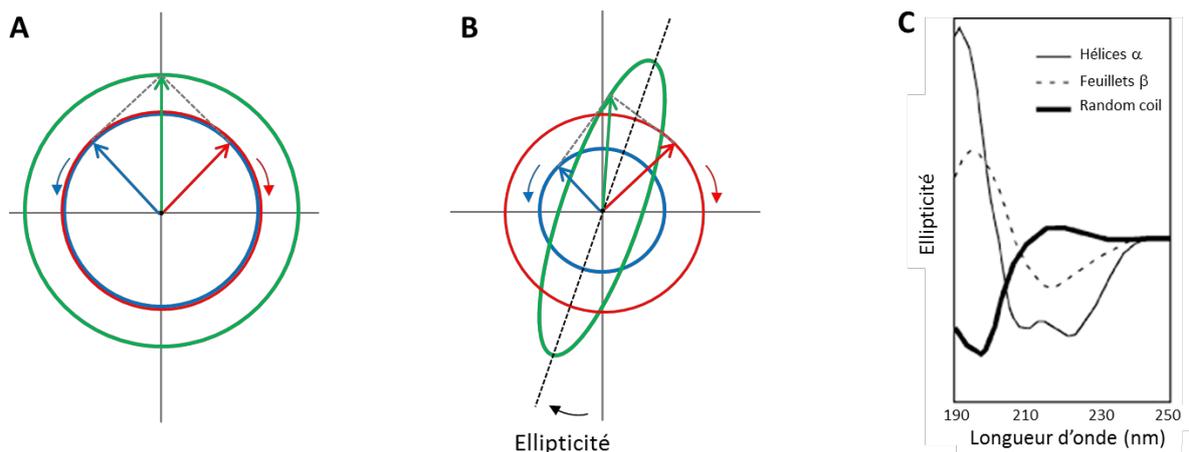


Figure 9 : Le dichroïsme circulaire.

A. Les deux ondes circulaires polarisées à droite (rouge) et à gauche (bleu) possèdent la même fréquence et la même amplitude, leur résultante (vert) forme alors un cercle.

B. L'onde circulaire polarisée à gauche (bleu) est plus absorbée que celle à droite (rouge), leur résultante (vert) forme alors une ellipse, dont l'ellipticité sera mesurée par le dichrographe.

C. Spectres caractéristiques des structures secondaires des protéines.

Les spectres pour la protéine Hsp12 sont obtenus sur un appareil Jasco-J-815 avec une concentration de 16 μM de protéine Hsp12 dans un tampon sodium-phosphate à 10 mM à pH 7,2. Plusieurs composés sont ajoutés à la protéine : 0,1% de SDS et des liposomes à une concentration de 1,3 mM. Les mesures sont réalisées dans des cuves présentant un trajet optique d'1 mm.

5.6 ITC

Les analyses de calorimétrie (ITC et DSC) ont été réalisées en collaboration avec François Dole au Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP).

La titration calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry - ITC) est une technique de calorimétrie utilisée pour caractériser l'interaction entre deux partenaires. Elle est notamment utilisée pour mesurer l'interaction entre des protéines et des lipides. Cette technique repose sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée au cours de la liaison entre des biomolécules. La quantité de chaleur mesurée est directement proportionnelle au nombre de liaisons et permet donc de caractériser l'interaction (Kd).

L'appareil est constitué d'une cellule de référence et d'une cellule pour l'échantillon, dans laquelle la liaison va être évaluée (Figure 10A). Un des partenaires de la liaison, dans notre cas les liposomes, est disposé dans la cellule échantillon. La protéine Hsp12 est quant à elle disposée dans une seringue placée dans la cellule échantillon. De petits aliquotes de protéine Hsp12 sont injectés progressivement dans la solution de liposome. La température est identique et maintenue constante dans les deux cellules. Si la protéine se lie aux liposomes, des variations de chaleur de quelques millièmes de degré Celsius sont détectées et mesurées. L'appareil mesure la quantité d'énergie (microcalorie/sec) apportée à la cellule échantillon pour maintenir la température constante. Lors d'une réaction exothermique, une quantité de chaleur est libérée au niveau de la cellule échantillon. Pour rétablir l'équilibre avec la cellule de référence, l'appareil va fournir moins d'énergie, ainsi le signal diminue (Figure 10B). Puis une fois que toute la protéine a interagi, il n'y a plus de dégagement de chaleur. L'appareil doit alors fournir de l'énergie pour retrouver l'état d'équilibre, ainsi le signal augmente (Figure 10C). Un pic négatif est ainsi observé. L'injection de protéine est réalisée ensuite plusieurs fois. L'énergie libérée par la réaction diminue successivement, traduisant une saturation progressive des sites de liaison (Figure 10D). L'injection de la protéine est arrêtée lorsque l'énergie libérée est quasiment nulle et constante, traduisant une saturation des liposomes et un excès de protéine dans la cellule (Figure 10E). Pour analyser les résultats, la superficie de chaque pic est intégrée et tracée en fonction du rapport protéine/liposome (Figure 10F). Cette représentation permet ainsi de calculer l'enthalpie de réaction (ΔH), la stœchiométrie (N) et la constante d'affinité ($K_d = 1/K$).

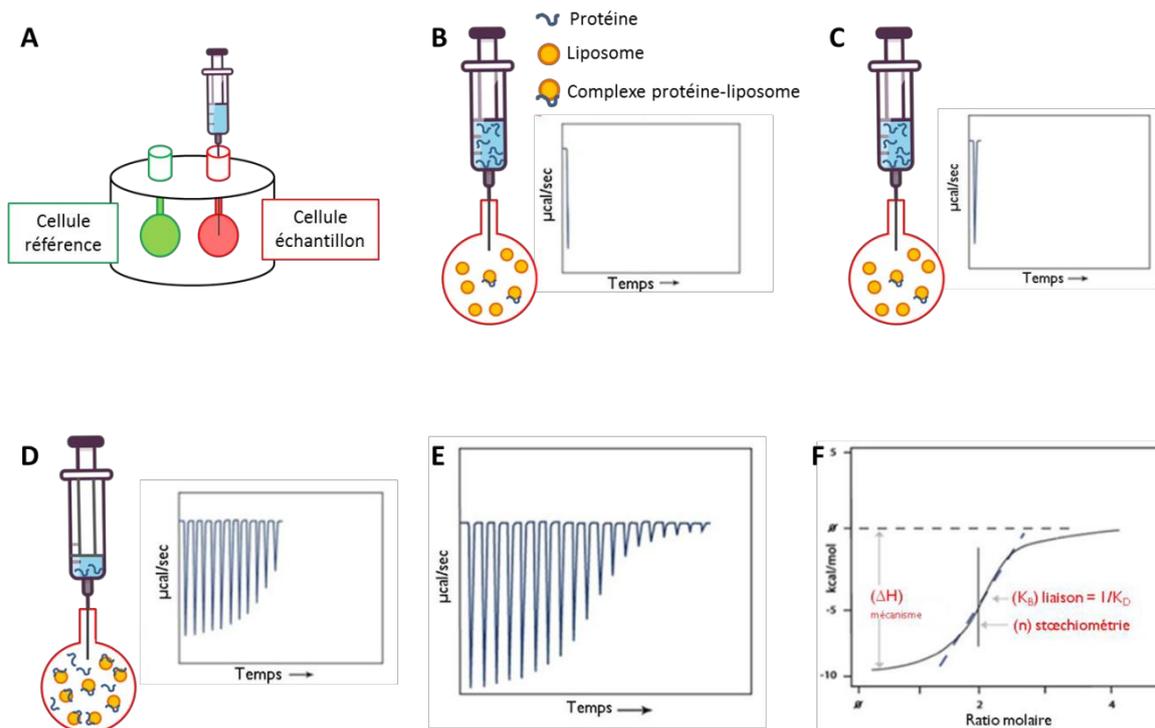


Figure 10 : Principe de la mesure par ITC.

- A. Schéma de l'appareillage montrant la cellule référence et la cellule échantillon, ainsi que la seringue.**
- B. Lors d'une réaction exothermique, une quantité de chaleur est libérée au niveau de la cellule échantillon. Pour rétablir l'équilibre avec la cellule de référence, l'appareil va fournir moins d'énergie, ainsi le signal diminue.**
- C. Lorsque toute la protéine a interagi, il n'y a plus de dégagement de chaleur donc l'appareil doit fournir de l'énergie pour retrouver l'état d'équilibre, ainsi le signal augmente.**
- D. L'injection de protéine est réalisée plusieurs fois. L'énergie libérée par la réaction diminue successivement, traduisant une saturation progressive des sites de liaison.**
- E. L'énergie libérée est quasiment nulle et constante, traduisant une saturation des liposomes et un excès de protéine dans la cellule. Le titrage est terminé.**
- F. Pour analyser les résultats, la superficie de chaque pic est intégrée et tracée en fonction du rapport protéine/liposome. Cette représentation permet ainsi de calculer l'enthalpie de réaction (ΔH), la stoechiométrie (N) et la constante d'affinité ($1/K$).**

Les analyses sont réalisées sur un appareil Microcal iTC200 (Malvern). Des LUVs de 100 nm sont préparées à une concentration de 1,3 mM dans du tampon sodium-phosphate à 10 mM et pH 7,2. La protéine Hsp12 est préparée à une concentration de 150 μ M dans le même tampon. Les solutions de liposomes et de protéine sont dégazées (605 mmHg pendant 10 minutes) juste avant les expériences d'ITC afin d'empêcher la présence de bulles d'air. 200 μ L de solution de LUVs sont déposés dans la cellule échantillon et 40 μ L de solution de protéine Hsp12 sont prélevés avec la seringue. Les titrations sont effectuées en ajoutant 3 μ L de protéine Hsp12 toutes les 3 minutes pour permettre l'équilibre complet de la

réaction de liaison. L'analyse des données est réalisée en utilisant le logiciel Origin 7,0 MicroCal en appliquant le modèle de liaison "One set of sites" (interaction 1:1).

5.7 DSC

La calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry – DSC) est une technique de calorimétrie permettant de mesurer des différences de chaleur entre une référence et un échantillon lors d'un balayage d'une rampe de température. L'appareil mesure la différence de puissance (C_p) fournie pour compenser la différence de température entre les deux cellules. Ces différences de température sont principalement liées au changement d'état de l'échantillon (dénaturation pour les protéines, changement de phase pour les lipides, ...).

Les lipides sous forme de liposomes sont caractérisés par différentes phases selon la température environnante (Figure 11). Les lipides peuvent être en phase gel où ils sont très ordonnés et interagissent fortement entre eux. A une température plus élevée, ils sont en phase fluide, caractérisée par une diminution de l'ordre et des interactions entre eux. Entre ces deux états, il y a une forme intermédiaire appelée phase gel ondulée. La température correspondant au passage d'une phase à l'autre est appelée température de transition de phase. Cette transition de phase est exothermique et peut donc être étudiée par la DSC grâce au balayage de la température. La température de transition principale (T_m) est particulièrement observée car le signal est beaucoup plus intense et il est toujours observé contrairement au signal de la pré-transition (T_{pre}). Ainsi cette technique permet d'obtenir la température de transition de phase principale des lipides (T_m) ainsi que l'enthalpie de cette transition (ΔH) en présence de protéine. Cela permettra de voir si l'interaction protéine-lipide modifie les propriétés de la membrane.

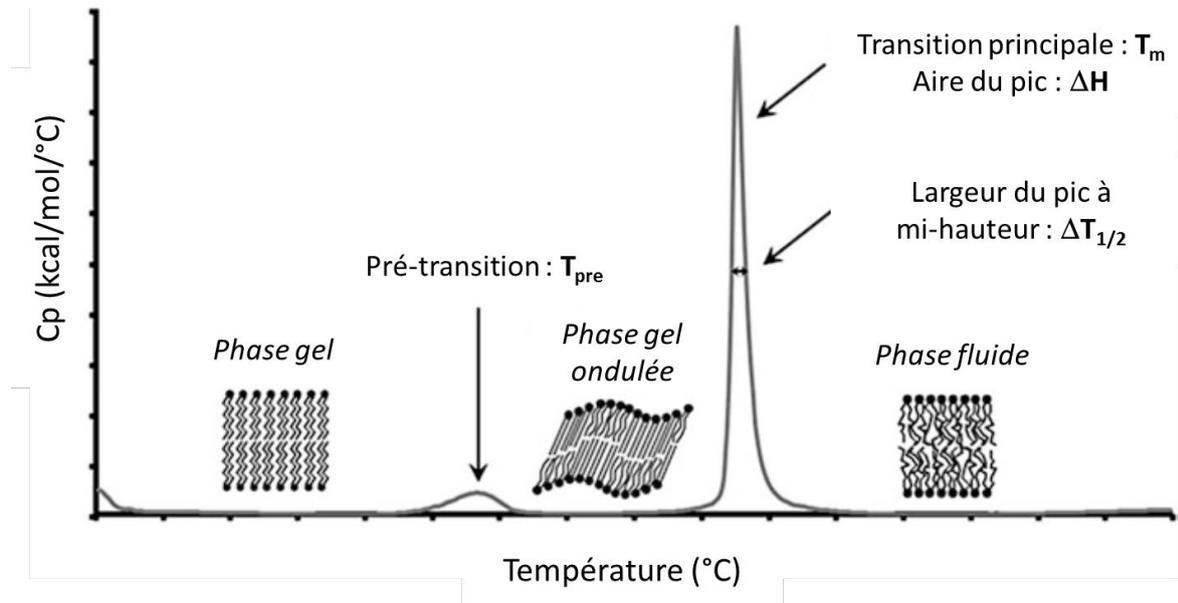


Figure 11 : Thermogramme exothermique typiquement observé pour des liposomes où les signaux de pré-transition (T_{pre}) et de transition principale (T_m) sont observés.

Les analyses sont réalisées sur un appareil micro DSC III (SETARAM Instrumentation). Une suspension de MLVs de DPPC- PIP_2 (80:20) est utilisée à une concentration de 1,3 mM. Par rapport aux précédentes expériences, le POPC a été remplacé car sa température de transition de phase de -2°C n'est pas compatible avec l'expérience. Le DPPC ne diffère que par la présence d'un palmitate à la place de l'oléate. Sa température de transition de phase est de 41°C . La protéine Hsp12 est utilisée à une concentration de $16\ \mu\text{M}$. Les balayages sont réalisés sur une gamme de température de 30°C à 50°C à une vitesse de $1^\circ\text{C}/\text{minute}$.

6 Caractérisation organoleptique

6.1 Seuil de détection

Le seuil de détection est déterminé selon les recommandations de la méthode « Best Estimated Threshold » de la norme *ISO 13301:2018*. Cette norme recommande l'utilisation du choix forcé entre 3 alternatives, connu également sous le nom de test triangulaire. Ce test est une épreuve discriminative ayant pour but de comparer deux modalités dont on cherche à évaluer si elles présentent ou non des différences sensorielles (ISO 4120 : 2007). Pour cela, trois échantillons, dont deux identiques, sont présentés simultanément aux juges qui doivent désigner l'échantillon différent. Dans le cadre de cette étude, les deux échantillons identiques (B) correspondent à de l'eau minérale (eau de source de montagne Laqueuille) et l'échantillon différent (A) correspond à la protéine Hsp12 dissoute dans la même eau à une concentration donnée. Cinq concentrations sont évaluées : 2,5, 5, 10, 20 et 40 mg/L grâce à cinq tests triangulaires. Les dégustations sont réalisées suivant l'ordre de concentration croissante de la protéine Hsp12. Les juges commencent donc par le test triangulaire avec la concentration de 2,5 mg/L et finissent par le test avec la concentration de 40 mg/L. Trois présentations sont possibles selon l'ordre de dégustation : ABB, BAB et BBA. L'ordre de présentation des verres est équilibré sur l'ensemble des individus afin d'éviter le biais dû à l'ordre de dégustation des verres. Le jury de ce test est constitué de vingt-deux personnes appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV et entraînées à la dégustation des vins. Les échantillons sont présentés dans des verres AFNOR dans une salle de dégustation équipée de box individuels.

Chaque seuil individuel correspond à la moyenne géométrique entre la concentration la plus basse où l'échantillon a été identifié et la plus haute où il n'a pas été identifié. Le seuil collectif est obtenu en calculant la moyenne géométrique de tous les seuils individuels.

6.2 Profil sensoriel

Le profil sensoriel consiste à présenter consécutivement les échantillons à évaluer à un panel de dégustateurs. Les 3 modalités sont présentées dans des verres AFNOR, dans une

salle de dégustation équipée de boxes individuels. Dix-sept personnes appartenant au personnel des laboratoires de l'ISVV et entraînées à la dégustation des vins ont participé à ce test sensoriel. Elles doivent alors évaluer et noter sur une échelle l'intensité de chaque descripteur donné pour tous les échantillons. Trois descripteurs sont choisis : la sucrosité, l'acidité et l'amertume. Les notes d'intensité attribuées par le panel sont alors centrées-réduites afin de s'affranchir du facteur de notation des juges puis les résultats sont traités par une analyse de la variance, appelée ANOVA.

L'ANOVA à un facteur est un traitement statistique permettant de comparer les moyennes d'une variable quantitative (intensité du descripteur) en fonction d'une variable qualitative (la protéine Hsp12). L'utilisation de l'ANOVA nécessite la vérification de deux hypothèses au préalable. Il faut que s'assurer de l'homogénéité des variances des notes pour un descripteur donné (test de Levene) et s'assurer que ces notes suivent une loi normale (test de Shapiro-Wilk).

L'ANOVA teste les hypothèses suivantes :

- H_0 (hypothèse nulle) : les moyennes de chaque modalité sont identiques
- H_A (hypothèse alternative) : au moins une des moyennes est différente des autres

Si la p-value est supérieure au risque α (0,05), alors on accepte l'hypothèse nulle H_0 . Toutes les modalités sont identiques pour un descripteur donné (sucrosité, acidité ou amertume).

Si la p-value est inférieure au risque α (0,05), alors on rejette l'hypothèse nulle H_0 et on accepte l'hypothèse alternative H_A : il existe au moins une modalité dont la moyenne est différente des autres moyennes pour un descripteur donné.

Dans le cas où l'on rejette l'hypothèse nulle H_0 , l'ANOVA ne permet pas de savoir quelles modalités sont différentes. Ainsi des tests de comparaisons multiples de moyennes, tels que le test de Tukey, sont utilisés pour identifier les modalités différentes.

6.3 Test d'activation du récepteur T1R2/T1R3

Le test d'activation du récepteur au gout sucré T1R2/T1R3 a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Loïc Briand (CSGA – Dijon). Cette équipe a développé

un test permettant de mesurer l'activation du récepteur humain T1R2/T1R3 exprimé par des cellules HEK293 par des molécules sucrées (Poirier *et al.*, 2012). Les cellules sont chargées avec une sonde fluorescente sensible au calcium. Si la protéine Hsp12 active le récepteur, il y aura libération de calcium intracellulaire et donc augmentation de la fluorescence. La protéine Hsp12 est ajoutée au contact des cellules à des concentrations croissantes allant de 0,001 mg/mL à 0,5 mg/mL et la réponse calcique intracellulaire est suivie par fluorescence. Pour analyser l'efficacité de la protéine Hsp12 à stimuler le récepteur T1R2/T1R3, une fonction dose-réponse est réalisée, permettant le calcul de la concentration efficace médiane (CE50).

7 Développement d'une méthode de dosage par ELISA

Une méthode de dosage par ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) a été développée afin de pouvoir quantifier la protéine Hsp12. L'objectif est de pouvoir quantifier la protéine Hsp12 de façon spécifique, dans différentes matrices et avec une grande sensibilité. Un dosage par ELISA « sandwich » a donc été développé.

Cette technique est réalisée en 6 étapes (Figure 12). Chaque étape nécessite un temps d'incubation allant d'une heure à une nuit entière. Entre chaque étape, des lavages sont réalisés afin d'éliminer l'excès d'échantillon. Les étapes sont les suivantes :

1. Un anticorps reconnaissant la protéine Hsp12 (anti-Hsp12) est adsorbé sur la surface des puits d'une microplaque. Il est appelé anticorps de capture.
2. Des protéines de lait sont déposées pour bloquer les sites restés libres sur la surface des puits. Cette étape permet d'éviter l'adsorption de la protéine Hsp12 ou du deuxième anticorps sur la surface.
3. L'échantillon contenant la protéine Hsp12 à doser est déposé. La protéine Hsp12 peut ainsi interagir avec l'anticorps de capture.
4. Un deuxième anticorps anti-Hsp12 est déposé. Il est appelé l'anticorps de détection car il peut reconnaître la protéine Hsp12 fixée par le premier anticorps et permettre sa détection.
5. Un anticorps secondaire est ensuite déposé. Cet anticorps reconnaît l'anticorps de détection. Il est couplé à une enzyme, qui est souvent la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase – HRP).
6. Un substrat est ensuite déposé dans les puits. La réaction enzymatique de la peroxydase transforme le substrat incolore en un produit coloré, dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie (ici, le TMB sera utilisé, il est incolore et sera transformé en un produit bleu).

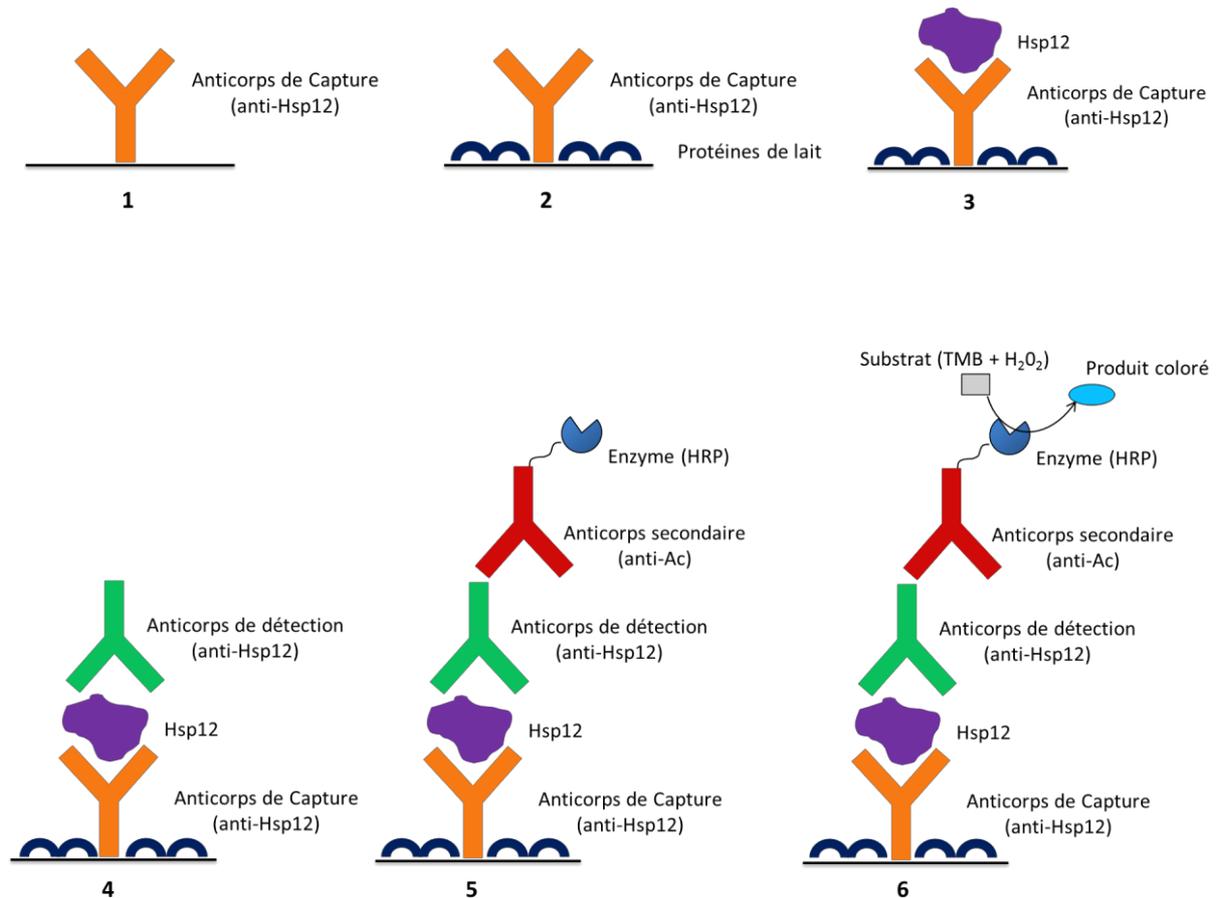


Figure 12 : Représentation des 6 étapes du dosage par ELISA sandwich.

7.1 Obtention des anticorps anti-Hsp12

Les anticorps anti-Hsp12 ont été obtenus grâce à l'immunisation d'animaux en utilisant comme immunogène la protéine Hsp12 recombinante pure, produite chez *Escherichia coli* lors d'une précédente étude (Léger *et al.*, 2017). Ce sont des anticorps polyclonaux pouvant reconnaître plusieurs épitopes de la protéine Hsp12. Des lapins et des cobayes ont été immunisés respectivement pour obtenir l'anticorps de capture et l'anticorps de détection (Entreprise Covalab). Les *sera* sont ensuite récupérés et immuno-purifiés, sur une colonne greffées avec la protéine Hsp12, afin de conserver uniquement les anticorps anti-Hsp12 (Figure 13).

L'antigène (Hsp12) est lié de façon covalente à une matrice.

Les anticorps spécifiques de l'antigène s'accrochent. Les anticorps non spécifiques sont lavés.

Les anticorps spécifiques de l'antigène sont élués.

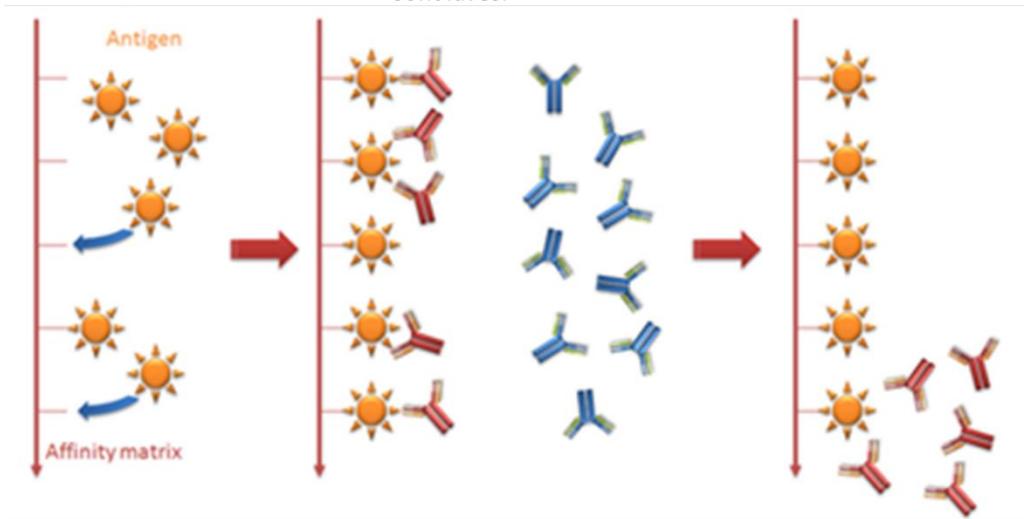


Figure 13 : Représentation du principe d'immuno-purification des anticorps.

Une fois les anticorps obtenus, le protocole de dosage ELISA a pu être développé. Initialement, un dosage par ELISA direct a été développé. Ce dosage consiste à déposer directement la protéine Hsp12 sur la microplaque sans utiliser d'anticorps de capture au préalable. La mise au point avec la protéine Hsp12 pure était prometteuse mais des problèmes sont apparus lors de la quantification d'échantillons complexes. En effet, lors du dépôt de l'échantillon sur la microplaque, il y a une compétition entre les protéines lors de l'adsorption sur la surface des puits. Ainsi, plus l'échantillon est complexe, moins la protéine Hsp12 peut s'adsorber et donc la concentration de protéine Hsp12 est sous-estimée. Cette méthode de dosage a donc été abandonnée au profit d'un dosage par ELISA sandwich. Ce dernier permet d'éviter le phénomène de compétition grâce à l'utilisation d'un anticorps de capture spécifique de la protéine Hsp12.

7.2 Développement du protocole de dosage ELISA

Le défi du développement du protocole de dosage ELISA est d'identifier les concentrations d'anticorps de capture, d'anticorps de détection et d'anticorps secondaire adaptées à la quantification de petites quantités de protéine Hsp12. Des microplaques

96 puits (Nunc) sont utilisées afin de tester de nombreuses conditions différentes. Il y a donc 4 paramètres à évaluer en parallèle, qui sont la concentration de la protéine Hsp12 et les concentrations des 3 anticorps. La méthode des cadrans est alors utilisée (Figure 14).

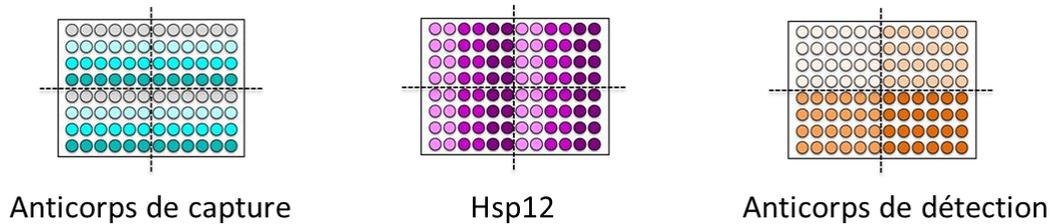


Figure 14 : Représentation de la méthode des cadrans.

Cette méthode consiste à utiliser 4 concentrations différentes de l'anticorps de capture selon les lignes de la microplaque. Puis la protéine Hsp12 recombinante est ajoutée à 5 concentrations différentes selon les colonnes. Enfin l'anticorps de détection est ajouté à 4 concentrations différentes selon 4 cadrans. Ainsi chaque puits correspond à une condition particulière. Cette technique permet d'évaluer sur une plaque 3 des 4 paramètres. La concentration en anticorps secondaire n'est pas évaluée dans ce premier test, ainsi une concentration recommandée par le fournisseur est choisie pour toute la microplaque. La concentration de l'anticorps de capture est rapidement déterminée puisque au-delà d'une certaine concentration, la surface des puits est saturée. La concentration pour saturer les puits avec l'anticorps de capture (de lapin) est de 4 $\mu\text{g/mL}$. Une fois ce paramètre déterminé, la méthode des cadrans est à nouveau utilisée mais cette fois-ci avec comme paramètre : la protéine Hsp12, l'anticorps de détection et l'anticorps secondaire. Afin d'avoir une limite de quantification de la protéine Hsp12 à 1 ng/mL , l'anticorps de détection (de cobaye) est utilisé à une concentration de 172 $\mu\text{g/mL}$ et l'anticorps secondaire à 25 ng/mL (anticorps anti-cobaye). La gamme de calibration permet de quantifier 1 ng/mL à 13 ng/mL de protéine Hsp12 (Figure 15).

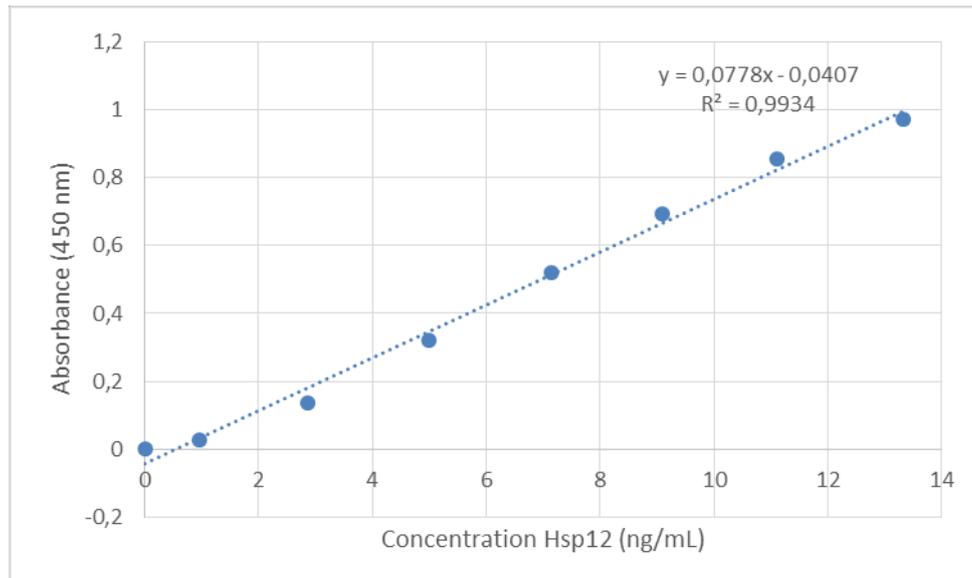


Figure 15 : Courbe de calibration du dosage ELISA.

La détermination des conditions optimales a été réalisée avec la protéine Hsp12 recombinante. Ces conditions doivent être validées avec différents échantillons pour vérifier l'efficacité du protocole développé.

7.3 Validation du protocole de dosage ELISA

7.3.1 Quantification de la protéine Hsp12 dans des cultures de levures

Afin de valider le protocole de dosage ELISA, la quantification de la protéine Hsp12 est réalisée dans du milieu de culture et dans des levures. Quatre souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées, dont deux souches œnologiques : Fx10 et VL3, une souche provenant de brasserie : A24 et une souche dont le gène *HSP12* est inactivé : Δ HSP12.

7.3.1.1 Cultures et traitements des échantillons

Ces 4 souches ont été cultivées en Erlenmeyer avec du milieu YPD à 30°C pendant 24h. Les levures sont ensuite récoltées par centrifugation. Les protéines sont récupérées

après lyse des cellules et chauffage, comme décrit précédemment (cf. 2 Préparation des extraits protéiques) afin d'obtenir des extraits protéiques.

7.3.1.2 *Dosage ELISA dans du milieu de culture*

Il est tout d'abord vérifié que la protéine Hsp12 peut être quantifiée dans le milieu de culture. Elle est ainsi ajoutée dans du milieu YPD à une concentration de 2 ng/mL. Suite au dosage par ELISA en triplicata, une concentration moyenne de 2,1 ng/mL est obtenue. Le protocole de dosage ELISA est donc adapté à la quantification de la protéine Hsp12 dans un milieu complexe tel que du milieu de culture YPD.

7.3.1.3 *Dosage ELISA dans les levures*

Le protocole de dosage ELISA est ensuite appliqué sur les 4 extraits protéiques obtenus suite aux cultures des 4 souches de levure. Les quantifications sont montrées ci-dessous et sont exprimées en quantité de protéine Hsp12 produite par litre de culture (Figure 16).

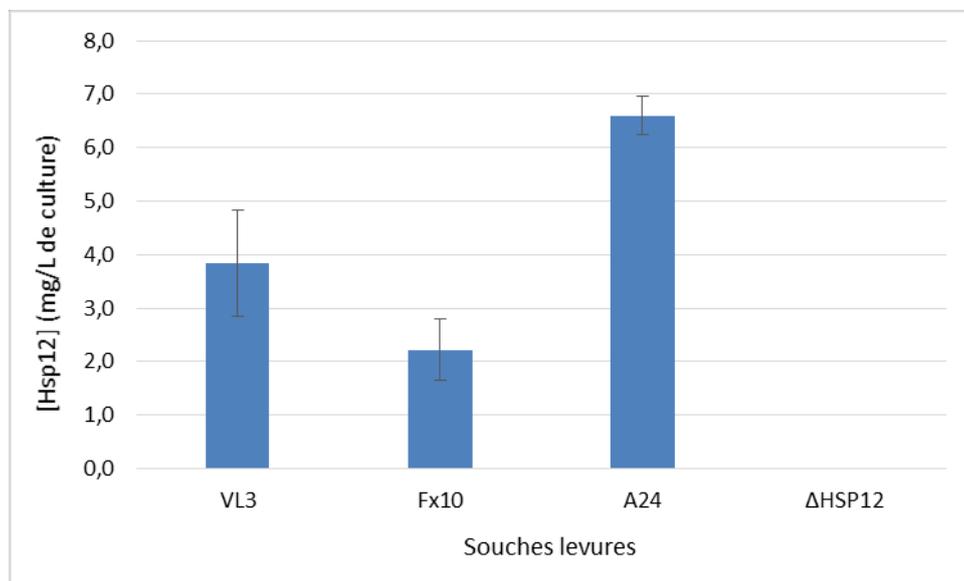


Figure 16 : Quantification par ELISA de la protéine Hsp12 produite par 4 souches de levure : VL3, Fx10, A24 et ΔHSP12.

Une concentration en protéine Hsp12 est obtenue pour 3 souches : Fx10, VL3 et A24. La comparaison des souches montre que la production de la protéine Hsp12 dépend des souches de levures. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude qui a analysé la quantité de transcrits du gène *HSP12* exprimés par ces 3 souches (Marchal *et al.*, 2015). Pour la souche Δ HSP12 n'exprimant pas le gène *HSP12*, la protéine Hsp12 n'est pas détectée. Cette souche sert de contrôle négatif et permet de vérifier que le dosage ne détecte pas de protéine Hsp12 lorsqu'elle n'est pas produite. Ces résultats prouvent que le protocole développé permet la quantification de la protéine Hsp12 native de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de cultures.

7.3.2 Quantification de la protéine Hsp12 dans du vin

Initialement, des peptides de la protéine Hsp12 ont été identifiés dans du vin, suggérant la présence de la protéine Hsp12 dans le vin. Le protocole de dosage ELISA a ainsi été testé pour la quantification de la protéine Hsp12 dans du vin.

Tout d'abord, il faut vérifier que le dosage ELISA permet la quantification de la protéine Hsp12 dans du vin. La protéine Hsp12 est ainsi ajoutée dans un vin blanc commercial à une concentration de 2 ng/mL. Suite au dosage par ELISA en triplicata, une concentration moyenne de 1,9 ng/mL est obtenue. Cela confirme que le protocole de dosage ELISA est adapté à la quantification de la protéine Hsp12 dans du vin.

Le protocole est ensuite utilisé pour quantifier directement la protéine Hsp12 dans des vins commercialisés. La quantification est réalisée sur 4 vins blancs, dont 2 vins ont été élevés sur lies de levures. Les résultats montrent que la protéine Hsp12 n'est détectée dans aucun des vins. Il a été montré précédemment que le dosage ELISA est adapté à la quantification de la protéine Hsp12 dans le vin jusqu'à une concentration de 1 ng/mL. Il y a donc plusieurs hypothèses :

- i. La concentration de la protéine Hsp12 est inférieure à 1 ng/mL dans le vin.
- ii. La protéine Hsp12 n'a jamais été présente dans ces vins malgré l'élevage sur lies.
- iii. Lorsqu'elle est libérée dans le vin, elle est rapidement dégradée par des protéases et le dosage ELISA ne permet pas de quantifier les peptides issus de sa digestion.

Ces hypothèses feront l'objet d'études dans la suite de la thèse.

7.4 Conclusion

Ce protocole de dosage ELISA permet donc une quantification de la protéine Hsp12 à partir de 1 ng/mL, ce qui correspond à une très bonne sensibilité pour ce type de dosage. De plus, ce protocole permet la quantification de la protéine Hsp12 dans différentes matrices, que ce soit directement dans du milieu de culture, après lyse des levures ou dans du vin.

Chapitre 3.

Impact du stress sur la production de la protéine Hsp12

Chapitre 3. Impact du stress sur la production de la protéine Hsp12

1 Introduction

La protéine Hsp12 a fait l'objet de plusieurs études afin d'identifier les stress responsables de son expression. La plupart des études se sont basées sur la quantification des transcrits du gène *HSP12* (Praekelt and Meacock, 1990; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Ivorra, Pérez-Ortín and Del Olmo, 1999; Amorós and Estruch, 2001; Carrasco *et al.*, 2001). Toutefois, la corrélation entre la quantité des transcrits du gène *HSP12* et la quantité de protéine Hsp12 traduite n'a pas été montrée. En effet, chez la levure la quantité de protéine est corrélée à la quantité d'ARNm pour seulement un tiers des protéines (Schwanhüusser *et al.*, 2011). Il est donc nécessaire de quantifier la protéine Hsp12 pour évaluer l'impact des stress sur la production de la protéine Hsp12. Le dosage ELISA développé au cours de la thèse permet de répondre à cet objectif. L'impact de trois stress sur la quantité de protéine Hsp12 est ainsi évalué : le stress thermique, le stress osmotique et le stress éthanolique.

Afin d'étudier l'impact de ces stress, des cultures de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont réalisées. La levure développe 2 métabolismes particuliers selon les conditions environnementales : un métabolisme respiratoire en condition aérobie et un métabolisme fermentaire en condition anaérobie. Elle peut également développer un métabolisme respiro-fermentaire, qui correspond à la combinaison des 2 métabolismes, en condition aérobie et en présence d'une concentration de glucose supérieure à 150 mg/L. Dans les 3 cas, la levure consomme le glucose présent dans le milieu et le transforme en pyruvate grâce à la glycolyse. Dans le cas du métabolisme respiratoire, le pyruvate est ensuite transformé en différents intermédiaires intervenant dans le cycle de Krebs menant à la consommation de dioxygène et à la production d'eau, de dioxyde de carbone et d'une grande quantité d'ATP (36 moles pour 1 mole de glucose) (Figure 17). Dans le cas d'un métabolisme fermentaire, le pyruvate est transformé en éthanol et permet la production de CO₂ et d'une petite quantité d'ATP (2 moles pour 1 mole de glucose) grâce à la glycolyse. De plus, des métabolites secondaires comme le glycérol et des acides organiques (acides

succinique et acétique principalement) sont également formés en faible quantité. Le glycérol, co-produit majoritaire après l'éthanol et le CO₂, est lui issu d'une déviation de la voie de la glycolyse (Figure 17).

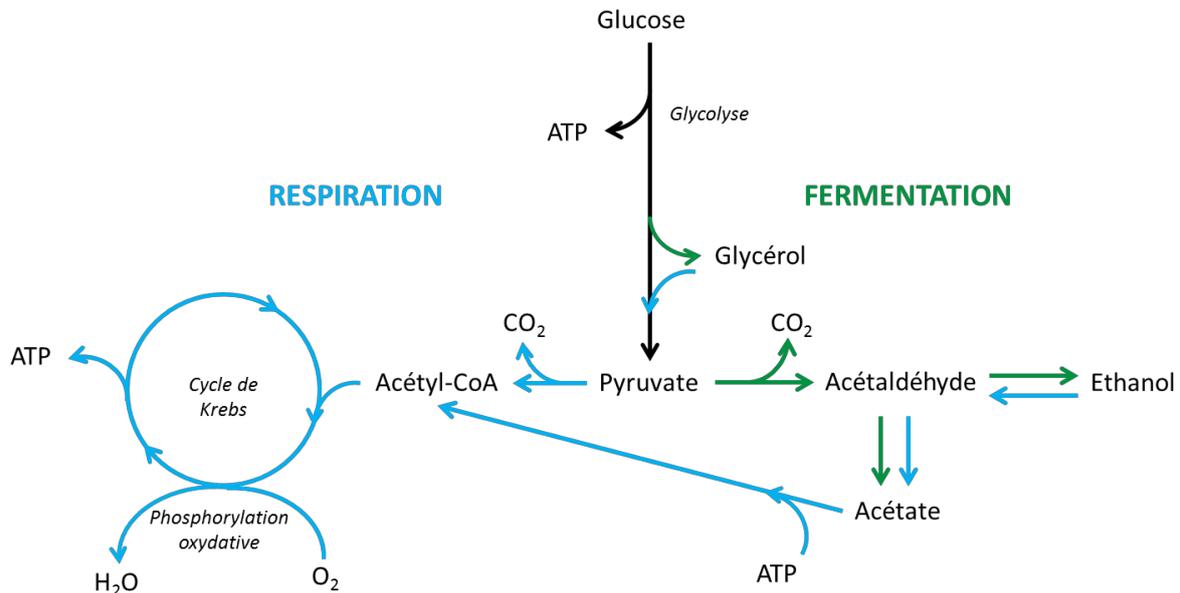


Figure 17 : Schéma simplifié représentant les métabolismes respiratoire et fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae*.

En milieu YPD et en condition aérobie, la levure *S. cerevisiae* va développer un métabolisme respiro-fermentaire avec une composante fermentaire majoritaire. Ceci est appelé l'effet Crabtree, qui se caractérise par l'utilisation préférentielle d'un métabolisme fermentaire en présence d'oxygène, lorsque la concentration en glucose est supérieure à 150 mg/L (Otterstedt *et al.*, 2004; Pfeiffer and Morley, 2014). La levure va ainsi transformer essentiellement le pyruvate en éthanol et en CO₂. Une partie du pyruvate intégrera toutefois un métabolisme respiratoire menant à la production d'ATP, permettant ainsi une croissance rapide des levures. Les levures vont donc consommer du glucose et de l'O₂ et produire de l'éthanol ainsi que du CO₂. Elles vont également produire des métabolites secondaires (glycérol, acides organiques). Ces conditions sont optimales pour la croissance des levures, elles vont donc se multiplier de façon exponentielle jusqu'à l'épuisement du glucose. Une fois la totalité du glucose consommée, les levures entrent dans une phase de changement métabolique appelée la transition diauxique (Uzawa *et al.*, 2004; Chu and Barnes, 2016). Elles passent ainsi d'un métabolisme respiro-fermentaire à un métabolisme respiratoire.

Cette transition se traduit par, d'une part le ralentissement de la croissance et de la production de CO₂ et, d'autre part l'utilisation de l'éthanol et des métabolites secondaires comme substrat. Puis, les levures vont entrer dans une deuxième phase de croissance exponentielle, caractérisée par un taux de croissance plus faible que lors de la consommation du glucose. Lorsque la totalité de l'éthanol et des métabolites secondaires sont consommés, les levures entrent alors en phase stationnaire, caractérisée par un taux de croissance nul.

La concentration cellulaire, la concentration en substrats et en métabolites, la consommation de l'O₂, le dégagement de CO₂ et le pH permettront de suivre les cultures de *Saccharomyces cerevisiae* et de standardiser l'application du stress à évaluer.

2 Evaluation de l'impact des stress

L'impact de 3 stress (thermique, osmotique et éthanolique) appliqués pendant 1h est évalué grâce à des cultures de la souche Fx10 réalisées en Erlenmeyer. Pour l'évaluation de chaque stress, 10 cultures sont menées en parallèle dont 5 cultures témoins et 5 cultures stressées. Le stress est appliqué au moment de la transition diauxique pour plusieurs raisons :

- i. s'affranchir de la répression de l'expression du gène *HSP12* lorsque la levure consomme le glucose (De Groot *et al.*, 2000).
- ii. standardiser le moment où est appliqué le stress et assurer la reproductibilité des résultats entre chaque culture.

Le stress est appliqué pendant 1h. Puis les cellules sont récoltées afin d'extraire la protéine Hsp12 par sonication et chauffage. La quantification de la protéine Hsp12 par dosage ELISA est réalisée à partir de 3 dilutions de chaque échantillon. Ainsi, 15 valeurs de concentration sont obtenues pour chaque condition expérimentale (témoin et stressée). Pour chaque échantillon, le quotient de sa concentration en protéine Hsp12 par rapport à la moyenne des concentrations des échantillons témoins est calculé.

$$Quotient = \frac{[Hsp12]}{\bar{m} [Hsp12]_{témoin}}$$

Ce calcul permet de comparer les facteurs d'augmentation ou de diminution de la quantité de protéine Hsp12. Après vérification de la normalité des valeurs et de l'homogénéité de leur variance, des tests statistiques de comparaison de moyenne permettent d'analyser l'impact de chaque stress sur la quantité de protéine Hsp12 produite.

2.1 Suivi de croissance des levures

Le suivi des cultures est réalisé par la mesure de la densité optique (DO) à 600 nm représentant la biomasse, et, par le dosage du glucose dans le milieu. A titre d'exemple, le suivi d'une culture témoin et d'une culture stressée lors de l'évaluation du stress thermique

est montré ci-dessous (Figure 18). Des résultats similaires sont obtenus avec les stress osmotique et éthanolique.

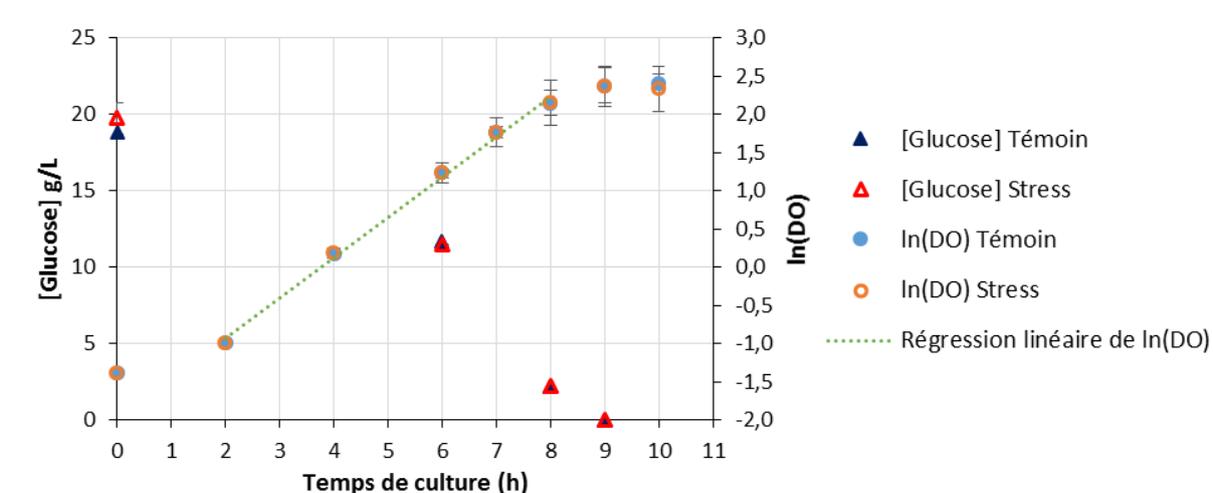


Figure 18 : Suivi des cultures témoin et stressée lors de l'évaluation du stress thermique. Pour les courbes ln(DO), les barres d'erreur correspondent aux déviations standards de la mesure de chaque valeur en triplicata.

Après adaptation des levures aux conditions de culture, la croissance se fait de manière exponentielle à partir de 2h de culture avec un taux de croissance maximal de $0,51 \text{ h}^{-1}$. A partir de 8h de culture, un ralentissement de la croissance des levures est observé. Ce ralentissement est concomitant de l'épuisement du glucose dans le milieu, substrat carboné principal. A 9h de culture, la transition diauxique intervient. Les stress sont alors appliqués : augmentation ou diminution de la température, augmentation de l'osmolarité ou ajout d'éthanol. A 10h de culture, la quantité de biomasse est stable dans les cultures témoins et dans les cultures stressées. Par conséquent, les stress étudiés ne semblent pas avoir d'effet notable sur la croissance des levures, mais quel est leur impact sur la quantité de protéine Hsp12 ?

2.2 Stress thermiques

Les cultures témoins sont menées à 30°C . L'impact de deux stress thermiques a été évalué, d'une part, l'augmentation de la température à 40°C et d'autre part, la diminution à 20°C .

2.2.1 Stress thermique à 40°C

La température des cultures est augmentée de 30°C à 40°C au moment de la transition diauxique et cette température est maintenue pendant 1h. La quantification de la protéine Hsp12 par dosage ELISA est réalisée pour les cultures témoins et les cultures stressées (Figure 19).

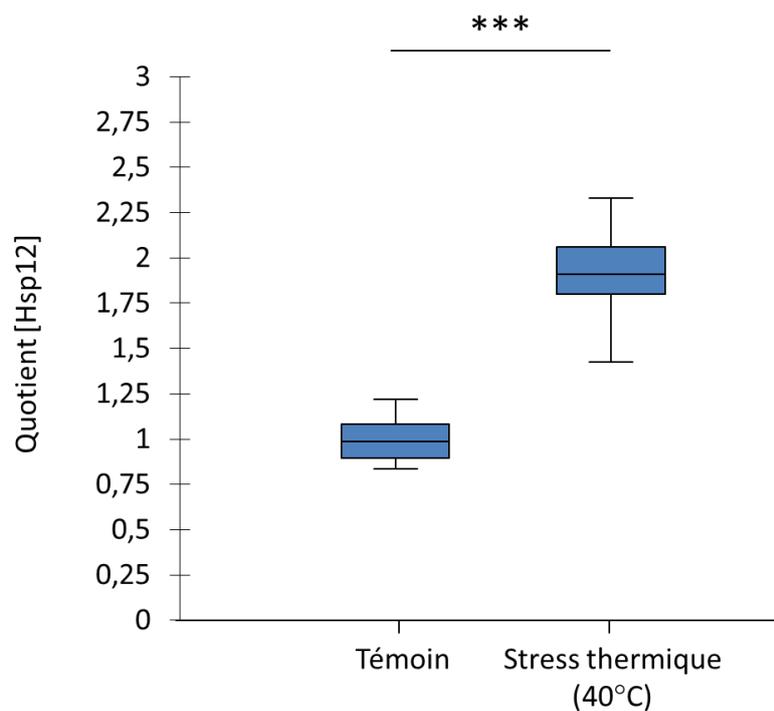


Figure 19 : Diagramme en boîte représentant les résultats de la quantification de la protéine Hsp12 suite au stress thermique à 40°C. Le quotient de la concentration de protéine Hsp12 est exprimé en fonction des deux conditions. (*) : p-value <0,01)**

Le diagramme en boîte est une représentation statistique des données, qui permet d'évaluer et comparer la forme, la tendance centrale et la variabilité de la distribution d'échantillons. La boîte colorée représente la distance entre les premier et troisième quartiles des données, ce qui correspond à la moitié centrale des données. La ligne dans la boîte représente la médiane et donc le centrage des données. Les barres représentent la dispersion des données. Les données de la condition témoin sont centrées et très peu dispersées. Les données de la condition stressée sont quant à elle moins centrées et un peu plus dispersées. Cette dispersion peut s'expliquer par l'utilisation de cellules vivantes, il y a donc une variabilité inhérente aux systèmes biologiques. Suite au stress thermique, la

quantité de protéine Hsp12 augmente en moyenne d'un facteur 1,9. Les données sont analysées statistiquement afin de vérifier si cette différence est significative. Un test non paramétrique de Mann Whitney est utilisé car les variances des données ne sont pas homogènes (p-value = 0,033). Ce test montre une différence significative à un risque inférieur à 1% (p-value < 0,0001) entre la quantité de protéine Hsp12 dans la condition témoin et la condition stressée. Par conséquent, la quantité de protéine Hsp12 produite par la souche Fx10 de *Saccharomyces cerevisiae* augmente significativement après un stress thermique à 40°C pendant 1h. Il a été montré que le stress thermique, par augmentation de la température, entraîne l'augmentation de la quantité de transcrits du gène *HSP12* (Praekelt and Meacock, 1990; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Ivorra *et al.*, 1999; Carrasco *et al.*, 2001). Les résultats obtenus confirment donc la traduction des ARNm en protéine Hsp12 au cours de ce stress.

2.2.2 Stress thermique à 20°C

Un stress thermique à 20°C est ensuite réalisé dans les mêmes conditions que précédemment (cf. 2.2.1 Stress thermique à 40°C). La quantification de la protéine Hsp12 par dosage ELISA est réalisée pour les cultures témoins et les cultures stressées (Figure 20).

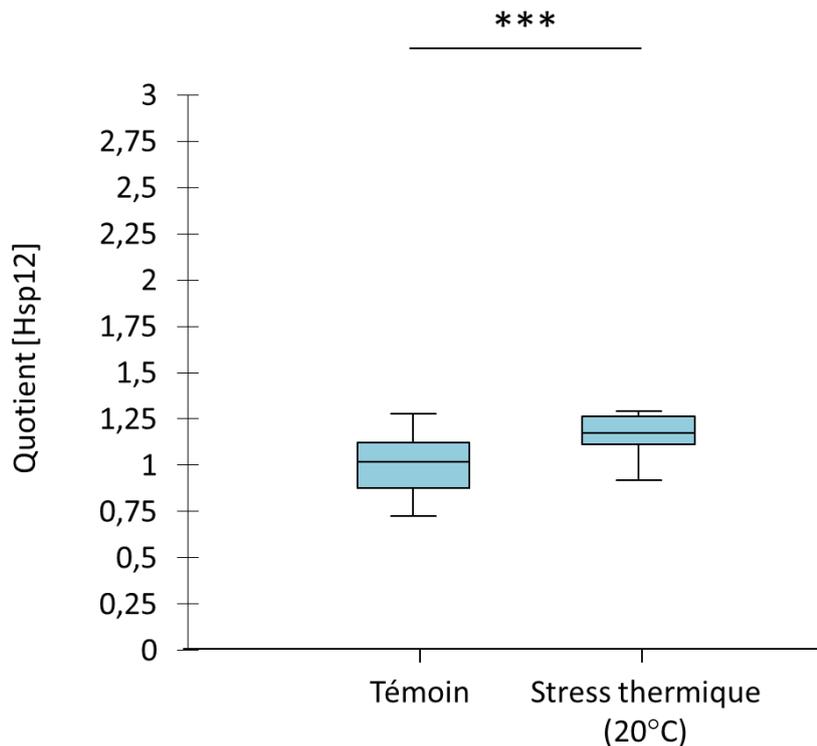


Figure 20 : Diagramme en boîte représentant les résultats de la quantification de la protéine Hsp12 suite au stress thermique à 20°C.

Le quotient de la concentration de protéine Hsp12 est exprimé en fonction des deux conditions. (*) : p-value <0,01)**

Suite au stress thermique à 20°C, la quantité de protéine Hsp12 augmente en moyenne d'un facteur 1,2. Les données sont analysées statistiquement afin de vérifier si cette différence est significative. Un test non paramétrique de Mann Whitney est utilisé car les données ne suivent pas une loi normale (p-value = 0,032). Ce test montre une différence significative à un risque inférieur à 1% (p-value = 0,002) entre la quantité de la protéine Hsp12 dans la condition témoin et la condition stressée. Par conséquent, une augmentation significative de la quantité de protéine Hsp12 produite par *S. cerevisiae* est observée après un stress thermique à 20°C pendant 1h. Le taux d'augmentation est toutefois inférieur à celui obtenu avec une augmentation de température. La souche Fx10 est tolérante à une température comprise entre 20°C et 35°C (Annexe). La diminution de la température à 20°C est une condition qui génère peut-être moins de stress pour cette souche, par rapport à l'augmentation de la température à 40°C.

En conclusion, à partir d'une culture de la souche Fx10 menée à 30°C, la modification de la température à 40°C ou à 20°C pendant 1h entraîne une augmentation significative de la

quantité de protéine Hsp12 produite. Le stress thermique à 40°C entraîne la production d'une quantité plus importante de protéine Hsp12 que celui à 20°C. Ceci suggère une réponse plus importante de la levure à l'augmentation de la température.

2.3 Stress osmotique

Le stress osmotique consiste à augmenter l'osmolarité du milieu de culture des levures en ajoutant 400 mM de chlorure de sodium (NaCl) et à maintenir les levures dans cette condition pendant 1h. La quantification par dosage ELISA est réalisée pour les cultures témoins et les cultures stressées (Figure 21).

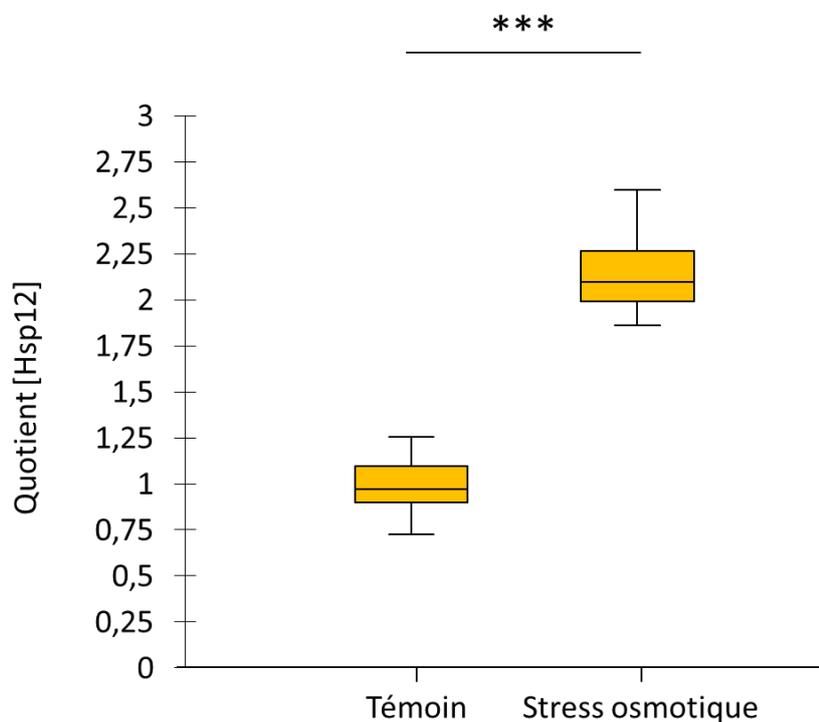


Figure 21 : Diagramme en boîte représentant les résultats de la quantification de la protéine Hsp12 suite au stress osmotique.
Le quotient de la concentration de protéine Hsp12 est exprimé en fonction des deux conditions.
(* : p-value <0,01)**

Une heure après l'application du stress osmotique, la quantité de protéine Hsp12 augmente en moyenne d'un facteur 2,1. Les données sont analysées statistiquement afin de vérifier si cette différence est significative. Le test paramétrique de Student est utilisé car les données suivent une loi normale (p-value = 0,231) et leurs variances sont homogènes

(p-value = 0,127). Ce test montre une différence significative à un risque inférieur à 1% (p-value < 0,0001) entre la concentration de la protéine Hsp12 dans la condition témoin et la condition stressée. Par conséquent, la quantité de protéine Hsp12 produite augmente significativement 1h après l'application du stress osmotique. Il a été montré que le stress osmotique, notamment par ajout de 400 mM NaCl, entraîne l'augmentation de la quantité de transcrits du gène *HSP12* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Amorós and Estruch, 2001). Les résultats obtenus confirment donc la traduction des ARNm en protéine Hsp12 au cours de ce stress.

2.4 Stress éthanolique

Le stress éthanolique consiste à ajouter de l'éthanol dans le milieu de culture des levures afin d'atteindre une concentration finale de 12% (v/v), soit 95 g/L. La quantification par dosage ELISA est réalisée 1h après l'ajout d'éthanol pour les cultures témoins et les cultures stressées (Figure 22).

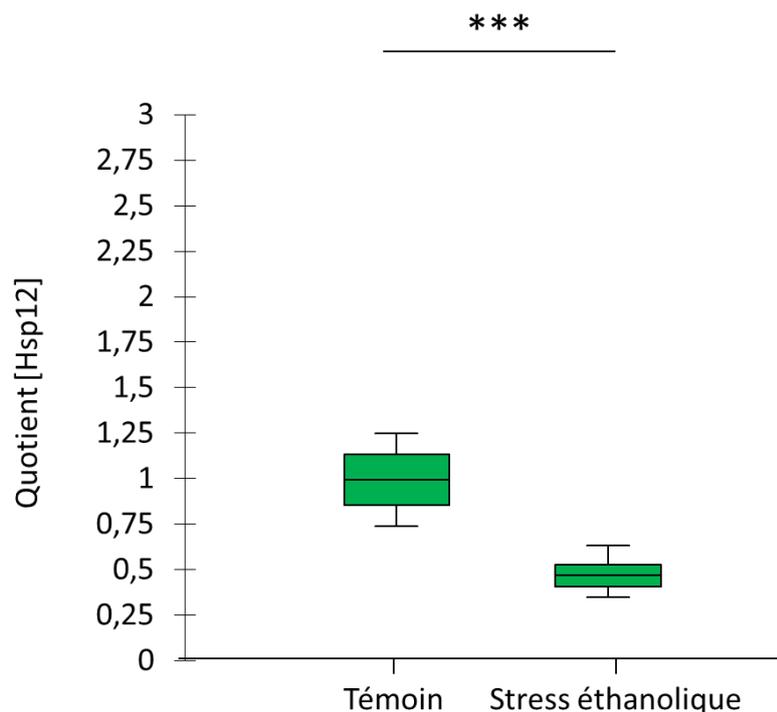


Figure 22 : Diagramme en boîte représentant les résultats de la quantification de la protéine Hsp12 suite au stress éthanolique.

Le quotient de la concentration de protéine Hsp12 est exprimé en fonction des deux conditions. (*) : p-value <0,01)**

Une heure après l'application du stress éthanologique, la quantité de protéine Hsp12 diminue en moyenne d'un facteur 2. Les données sont analysées statistiquement afin de vérifier si cette différence est significative. Un test non paramétrique de Mann Whitney est utilisé car les variances des données ne sont pas homogènes (p-value = 0,013). Ce test montre une différence significative à un risque inférieur à 1% (p-value < 0,0001) entre la concentration de la protéine Hsp12 dans la condition témoin et la condition stressée. Par conséquent, la quantité de protéine Hsp12 produite diminue significativement 1h après l'application du stress éthanologique. Pour rappel, cette étude est réalisée avec la souche œnologique Fx10 sélectionnée pour la vinification tolérante jusqu'à une concentration de 16% (v/v) d'éthanol.

Il a été montré que le stress éthanologique augmentait la quantité de transcrits du gène *HSP12* (Ivorra *et al.*, 1999; Izawa *et al.*, 2008). Il est possible que lors d'un stress éthanologique, les transcrits du gène *HSP12* soient exprimés mais ne soient pas traduits. Une étude a analysé l'impact de l'éthanol sur les ARNm de plusieurs protéines Hsp de *S. cerevisiae* (Izawa *et al.*, 2008). Les auteurs ont montré que malgré la forte augmentation de la quantité d'ARNm de plusieurs Hsp en présence d'éthanol, les quantités de protéines Hsp restaient plus faibles que lors d'un stress thermique à 42°C. Cela serait dû à une rétention des ARNm dans le noyau à cause d'une hyperadénylation. En effet, la polyadénylation est un élément critique pour le transport des ARNm du noyau vers le cytoplasme. Les ARNm étant bloqués dans le noyau, ils ne peuvent pas être traduits en protéines (Figure 23). Cette étude n'a pas analysé la protéine Hsp12 spécifiquement, mais ce mécanisme pourrait expliquer les résultats obtenus.

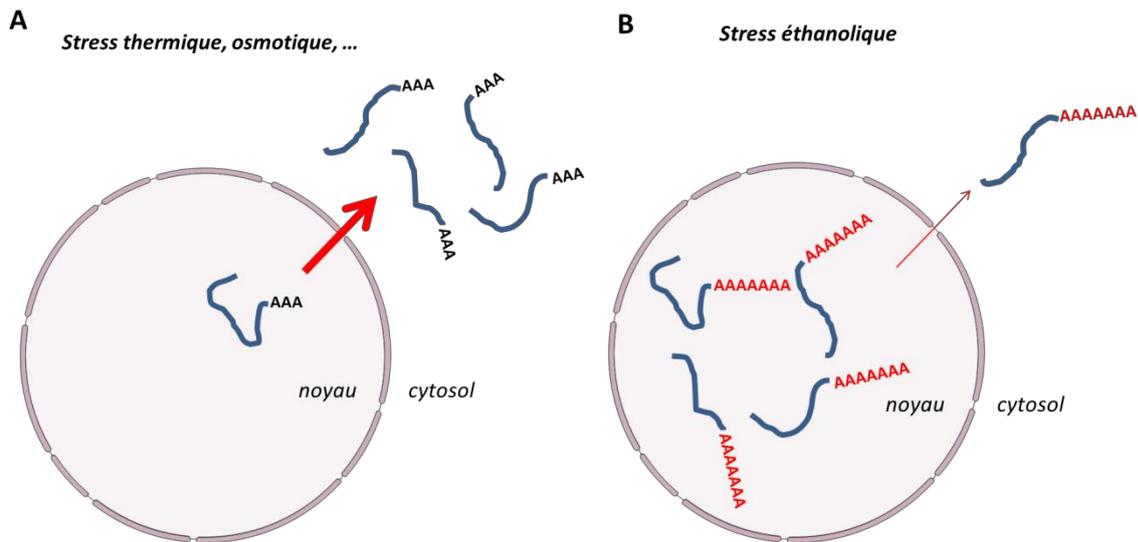


Figure 23 : Schéma représentant les résultats obtenus par Izawa et al sur l'analyse de l'impact du stress éthanolique sur les transcrits de certains gènes HSP.

Ces mécanismes ne sont pas observés suite à un stress thermique. En effet, *Izawa et al* ont montré que suite à l'application d'un stress thermique à 42°C, la quantité de transcrits des gènes *HSP* augmente ainsi que la quantité de protéines Hsp associées. Ces mécanismes semblent donc spécifiques de la réponse à un stress éthanolique.

Alors comment expliquer que la présence d'éthanol entraîne une augmentation des transcrits des gènes *HSP* mais qu'il n'y a pas traduction de ces ARNm ? Toujours dans cette étude, *Izawa et al* ont montré l'existence d'une relation concentration-effet. Pour une concentration en éthanol de 7% (v/v), il y a une rétention partielle des ARNm et avec 9% d'éthanol il y a une rétention totale. Plus la quantité d'éthanol est importante, plus les ARNm sont retenus dans le noyau, suggérant une régulation des ARNm lorsque l'éthanol est présent en quantité importante. Ceci pourrait expliquer les résultats obtenus avec la protéine Hsp12 et une concentration en éthanol de 12%.

Par ailleurs, *Izawa et al* ont montré que les ARNm hyperadénylés ne sont pas dégradés dans le noyau au cours de l'expérience. Ils suggèrent donc que l'hyperadénylation pourrait permettre de les stabiliser et de les « laisser en attente » dans le noyau. En effet, ils ont montré que l'hyperadénylation des ARNm est réversible lorsque le stress éthanolique est supprimé. Les ARNm bloqués dans le noyau sont alors exportés et traduits en protéines Hsp.

Ce mécanisme pourrait permettre à la cellule de créer un pool d'ARNm prêt à être traduits lorsque la totalité de l'éthanol est consommée.

Toutes ces observations montrent que la réponse au stress éthanolique est différente des autres (thermique, osmotique, dessiccation, ...), ce qui est également avancé dans d'autres études (Stanley *et al.*, 2010). Les mécanismes mis en jeu restent néanmoins mal compris. Il existe aussi probablement une variabilité entre les souches de levure, notamment ici avec une souche œnologique qui est sélectionnée selon des capacités bien spécifiques, telles que la production d'éthanol et la tolérance associée.

2.5 Conclusion

La protéine Hsp12 a été quantifiée suite à l'application de différents stress sur des cultures de la souche Fx10 de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étude démontre, pour la première fois, que la quantité de protéine Hsp12 native augmente significativement suite à des stress thermiques à 40°C et 20°C et à un stress osmotique à 400 mM de NaCl. Ces résultats sont corrélés avec des observations précédentes sur l'augmentation des taux de transcrits du gène *HSP12*. L'impact d'un stress éthanolique a montré une diminution de la quantité de protéine Hsp12. Ceci ne corrobore pas l'augmentation des taux de transcrits du gène *HSP12* décrite dans la littérature. Des mécanismes de régulation de l'expression des ARNm, telle que l'hyperadénylation, pourraient être responsables de la faible quantité de protéine Hsp12 traduite alors que la quantité de transcrits augmente.

L'impact de ces stress sur la production de la protéine Hsp12 a été évalué après une courte durée de culture (1h), qu'en est-il si ces stress sont maintenus pendant une durée plus longue ? Est-il possible d'identifier des liens entre le métabolisme de la levure et la production de la protéine Hsp12 ?

Un suivi de la croissance des levures et de la production de la protéine Hsp12 a ainsi été réalisé pendant 24h pour la condition témoin et la condition stressée à 20°C.

3 Suivi des cultures et de la production de la protéine Hsp12 pendant 24h

Des cultures de la souche Fx10 sont menées en conditions témoin et stressée (20°C), en bioréacteur. La protéine Hsp12 produite est quantifiée toutes les heures pendant 24h après traitement des échantillons comme décrit précédemment.

3.1 Suivi des cultures

3.1.1 Condition témoin

Les paramètres de suivi d'une culture témoin pendant 24h sont présentés dans les graphiques suivants (Figure 24).

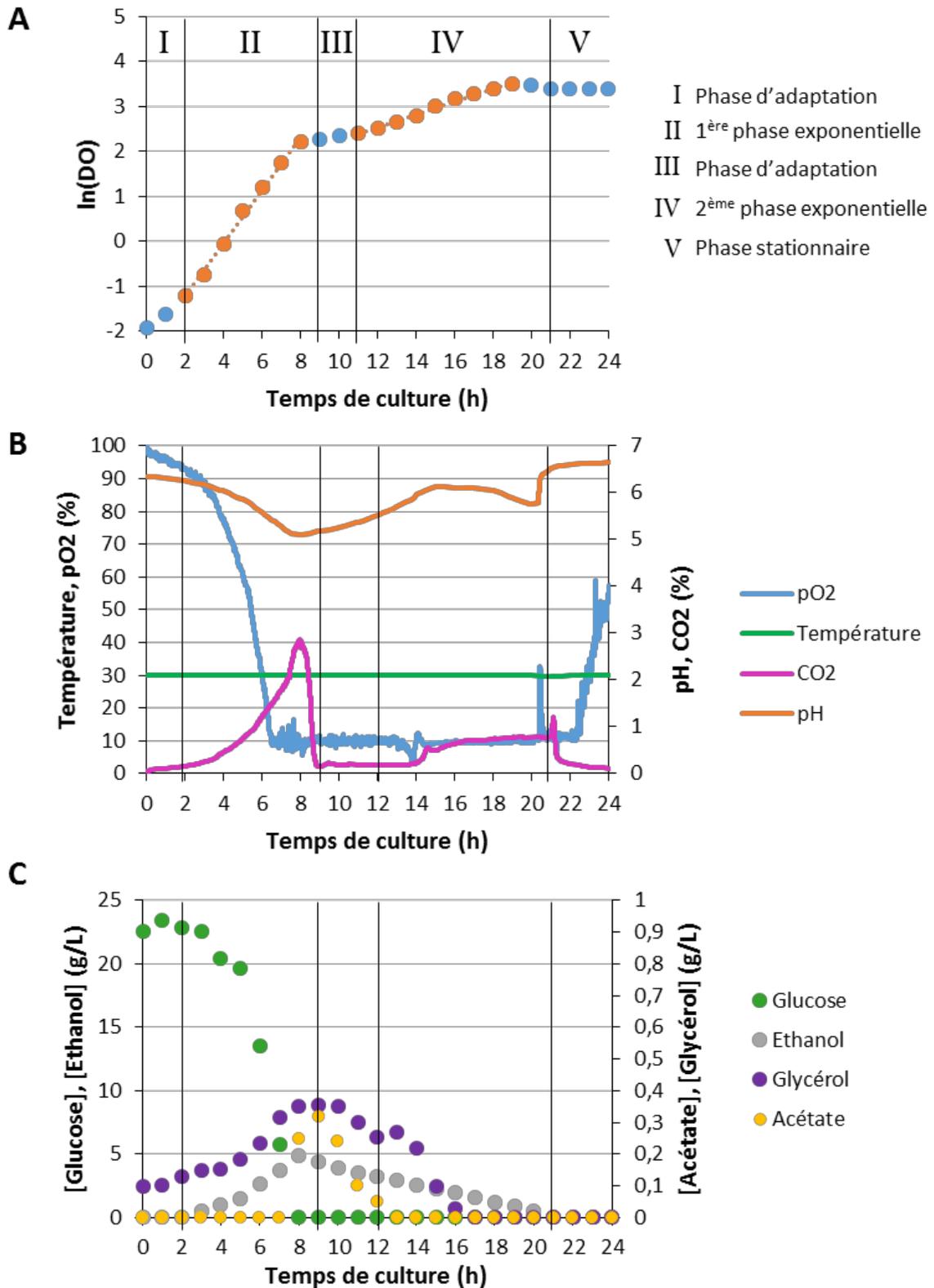


Figure 24 : Suivi de la culture témoin en bioréacteur pendant 24h.
A. Suivi de la densité optique. Les croissances exponentielles sont matérialisées en orange.
B. Suivi de la pO_2 , de la température, du CO_2 et du pH.
C. Suivi des substrats et produits du métabolisme.

Pendant les deux premières heures de culture, les levures sont en phase d'adaptation aux conditions de culture. A partir de 2h, les levures entrent en phase exponentielle de croissance avec un taux de croissance maximal de $0,6 \text{ h}^{-1}$ (Figure 24A). En métabolisme respiro-fermentaire, le glucose est consommé en présence d' O_2 pour produire de l'éthanol (Figure 24C), du CO_2 (Figure 24B) et de l'acétate (Figure 24C). La production d'acétate entraîne une diminution du pH du milieu (Figure 24B). A partir de 9h de culture, c'est la transition diauxique. Le changement métabolique se traduit par, d'une part le ralentissement de la croissance (Figure 24A) et de la production de CO_2 (Figure 24B) et, d'autre part l'utilisation de l'éthanol, du glycérol et de l'acétate comme substrat (Figure 24C). La consommation d'acétate entraîne une augmentation du pH du milieu (Figure 24B). A partir de 11h de culture, les levures entrent dans une deuxième phase exponentielle de croissance avec un taux de croissance de $0,17 \text{ h}^{-1}$ (Figure 24A). A partir de 21h, les levures entrent en phase stationnaire.

3.1.2 Cultures stressées (20°C)

Au cours des cultures en condition de stress thermique à 20°C, les données suivantes sont obtenues (Figure 25).

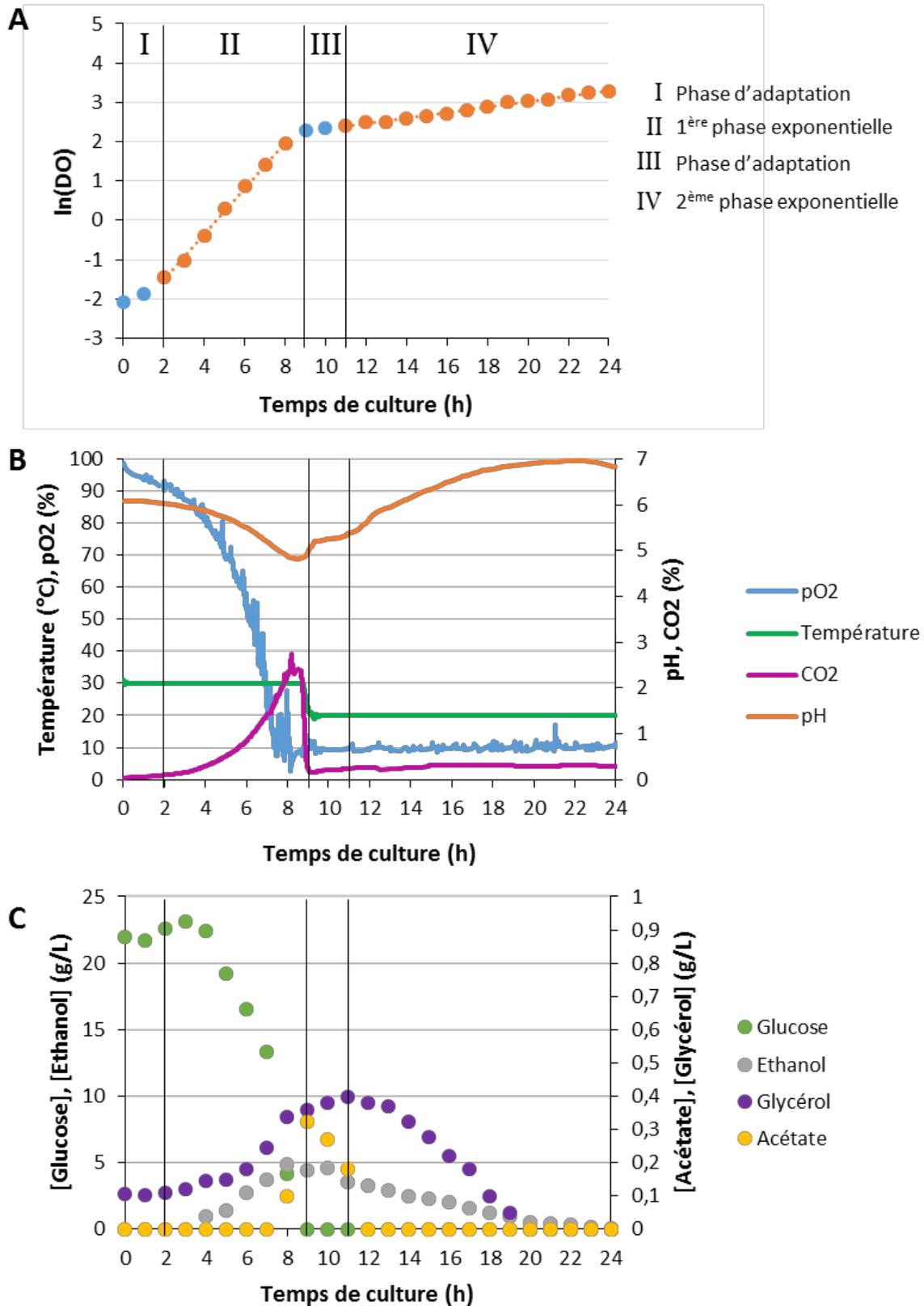


Figure 25 : Suivi de la culture stressée en bioréacteur pendant 24h.
A. Suivi de la densité optique. Les croissances exponentielles sont matérialisées en orange.
B. Suivi de la pO₂, de la température, du CO₂ et du pH.
C. Suivi des substrats et produits du métabolisme.

Pendant les huit premières heures de culture, le suivi de croissance est similaire à la condition témoin avec un taux de croissance maximal de $0,59 \text{ h}^{-1}$ (Figure 25A). Le suivi de la pO_2 , du CO_2 , du pH (Figure 25B) et des métabolites (Figure 25C) est également similaire. A partir de 9h, c'est la transition diauxique. La température de la culture est alors diminuée à 20°C jusqu'à la fin de la culture (Figure 25B). A 11h de culture, les levures entrent dans leur deuxième phase exponentielle (Figure 25A) en consommant l'éthanol, le glycérol et l'acétate présents dans le milieu (Figure 25C). Cette phase se prolonge jusqu'à au moins 24h avec un taux de croissance de $0,07 \text{ h}^{-1}$ (Figure 25A). Elle est donc plus longue d'au moins 3h et présente un taux de croissance plus faible que dans le cas de la condition témoin ($0,17 \text{ h}^{-1}$). En effet, le métabolisme est ralenti lorsque la température est diminuée (Salvadó *et al.*, 2011), la consommation des substrats est donc plus lente (Figure 25C). Quel est l'impact sur la quantité de protéine Hsp12 produite ?

3.2 Production de la protéine Hsp12

Les quantifications de la protéine Hsp12 pour chaque condition témoin et stressée sont présentées ci-dessous (Figure 26).

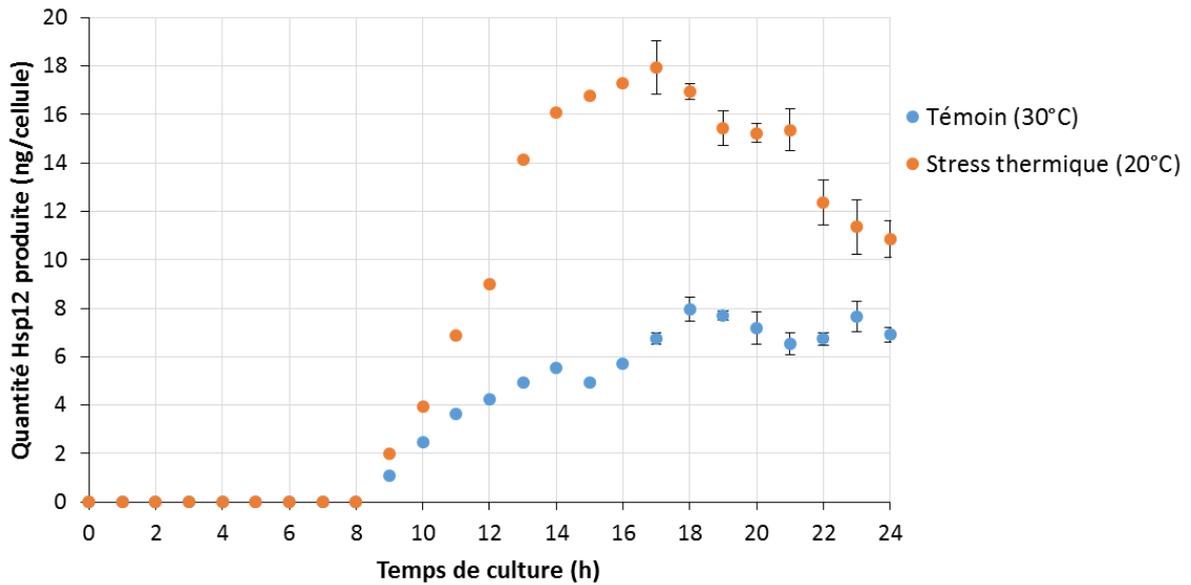


Figure 26 : Suivi de la production de la protéine Hsp12 dans des cultures témoins et stressées par diminution de la température à 20°C.
La quantité de protéine Hsp12 est exprimée en ng par cellule.
(n=1 de 0h à 17h, n=3 de 18h à 24h)

La protéine Hsp12 n'est pas exprimée durant les huit premières heures de culture. A partir de 9h de culture, la protéine Hsp12 commence à être exprimée. C'est à ce moment qu'à lieu la transition diauxique et que le stress thermique est appliqué.

Dans la condition témoin, entre 9h et 18h de culture, la quantité de protéine Hsp12 augmente pour atteindre une valeur de 8 ng/cellule, soit 0,25 mg/g de levure. A partir de 18h, la quantité de protéine Hsp12 se stabilise à environ 7 ng/cellule.

Dans la condition stressée, la vitesse de production de la protéine Hsp12 est plus élevée sur l'intervalle allant de 8h à 17h de culture : 2,6 ng/cellule/h contre 1 ng/cellule/h pour la condition témoin. A 17h de culture, une valeur maximale de 18 ng/cellule est atteinte. Cette quantité de protéine Hsp12 est significativement supérieure à celle de la condition témoin à la même heure (p-value < 0,0001). Puis la quantité de protéine Hsp12 diminue pour atteindre une valeur de 11 ng/cellule à 24h. La viabilité des levures a également été évaluée après 18h, 21h et 24h de culture. Une viabilité de 100% est observée dans les conditions témoin et stressée pour les 3 temps de culture.

Durant les 8 premières heures de culture, les levures sont en phase de croissance exponentielle et la protéine Hsp12 n'est pas exprimée. Il a été observé que le gène *HSP12* n'est pas transcrit lors de la phase exponentielle (Praekelt and Meacock, 1990), ce qui conforte donc les résultats obtenus. L'absence de protéine Hsp12 peut s'expliquer par la présence de glucose dans le milieu. En effet, il a été montré que la transcription du gène *HSP12* est réprimée en présence de glucose (De Groot *et al.*, 2000).

A partir de 9h, l'épuisement du glucose est à l'origine de la transition diauxique. L'expression de la protéine Hsp12 est alors activée suite à la disparition du glucose. En effet, il a été montré que la privation de glucose entraînait l'expression du gène *HSP12* (Ivorra *et al.*, 1999). Pour la condition témoin, la quantité de protéine Hsp12 augmente progressivement avant de se stabiliser 10h après l'épuisement du glucose à 7 ng/cellule. L'hypothèse proposée est que lorsque la répression du glucose est levée, la protéine pourrait être exprimée à un niveau basal, ce qui a également été observé avec l'expression du gène *HSP26* (Susek and Lindquist, 1990).

Pour la condition stressée, la vitesse de production de la protéine Hsp12 est plus élevée sur l'intervalle allant de 8h à 17h de culture, par rapport à la condition témoin. Cette différence est due à l'application du stress thermique. A partir de 18h, la quantité de protéine Hsp12 diminue pour atteindre une valeur proche de celle de la condition témoin. Suite au stress thermique, la première étape est la réponse au stress, qui se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine Hsp12. La deuxième étape semble être une phase d'adaptation durant laquelle l'expression de la protéine Hsp12 retourne à un niveau basal (Susek and Lindquist, 1990; Ferguson *et al.*, 2005). Afin de vérifier cette hypothèse, la culture pourrait être prolongée pour voir l'évolution de la quantité de protéine Hsp12.

Ces résultats suggèrent que la protéine Hsp12 serait exprimée en absence de glucose à un niveau basal et participerait au développement des levures (Ferguson *et al.*, 2005). En outre, la protéine Hsp12 est exprimée en réponse aux stress, suggérant son implication dans l'adaptation et/ou la résistance aux stress. Ces observations sont cohérentes avec la régulation de l'expression du gène *HSP12* par le facteur de transcription Hsf1 (cf. Chapitre 1 - 2.3.1 Hsf1). En effet, il a été montré que le facteur Hsf1 induit une expression basale des gènes *HSP*, qui peut être fortement augmentée en présence d'un stress thermique (Jakobsen and Pelham, 1988).

4 Conclusion

Dans ce chapitre, l'impact de différents stress sur la quantité de protéine Hsp12 produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été étudié.

D'une part, grâce à des stress de courte durée (1h) il a été montré, pour la première fois, que la quantité de protéine Hsp12 native augmente significativement suite à un stress thermique à 40°C et à 20°C et suite à un stress osmotique avec 400 mM de NaCl. Ces résultats confirment les observations précédentes sur les taux de transcrits du gène *HSP12*. L'impact du stress éthanolique a également été étudié et a montré une diminution significative de la quantité de protéine Hsp12. Ce résultat ne corrobore pas ceux obtenus avec les transcrits du gène *HSP12*. Des mécanismes de régulation de la traduction des ARNm seraient responsables de la faible quantité de protéine Hsp12 alors que la quantité de transcrits est importante. Il serait ainsi pertinent de vérifier la quantité de transcrits du gène *HSP12* dans notre modèle d'étude.

D'autre part, le suivi de la production de la protéine Hsp12 suggère qu'elle serait exprimée en absence de glucose à un niveau basal et participerait au développement des levures. En outre, la protéine Hsp12 est exprimée en réponse aux stress, suggérant son implication dans l'adaptation et/ou la résistance aux stress. La protéine Hsp12 pourrait donc être un marqueur de la présence de stress chez la levure.

Afin d'étudier l'expression basale de la protéine Hsp12, il serait intéressant d'évaluer l'impact du stress osmotique et du stress éthanolique plusieurs heures après leur application afin de voir comment la quantité de protéine Hsp12 évolue.

Chapitre 4.

Purification

Chapitre 4. Purification

1 Introduction

Afin de récupérer la protéine Hsp12 native, des cultures en conditions de stress, c'est à dire avec une diminution de la température à 20°C au moment de la transition diauxique ont été menées pendant 24h. Ces conditions de culture permettent d'obtenir 2,8 mg de protéine Hsp12 par litre de culture. L'extrait brut obtenu par sonication, chauffage et concentration contient la protéine Hsp12 ainsi que de nombreuses protéines contaminantes. Il est donc nécessaire de développer un protocole de purification afin d'éliminer les contaminants et ainsi obtenir une pureté suffisante pour la caractérisation physico-chimique et organoleptique de la protéine. La protéine Hsp12 étant native, elle n'est pas surexprimée par rapport aux autres protéines de la levure et ne possèdent pas de caractéristiques permettant de la séparer spécifiquement par chromatographie d'affinité. C'est donc un défi de l'isoler spécifiquement.

La purification est basée sur la séparation par chromatographie. Cette technique repose sur des liaisons ou interactions non covalentes réversibles entre les protéines et un groupe fonctionnel (ligand) immobilisé sur un support solide (matrice). L'ensemble ligand et matrice constitue la résine de chromatographie. Les interactions peuvent être de différents types : électrostatiques, hydrophobes (effet hydrophobe « stricto sensus»), de Van der Waals, liaisons hydrogène. Ainsi différents types de chromatographie vont pouvoir être utilisés en fonction des interactions mises en jeu. Traditionnellement, les ligands de chromatographie peuvent engager un seul type d'interaction du fait de leur structure chimique. La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur les interactions électrostatiques pouvant être engagées entre la charge du ligand et celle(s) de la protéine. La chromatographie d'interactions hydrophobes repose quant à elle sur l'effet hydrophobe obtenu à force ionique élevée entre le ligand hydrophobe et les groupements hydrophobes de la protéine. Cependant, des interactions dites « secondaires » non spécifiques peuvent parfois intervenir dans l'attraction protéine-ligand. Elles sont liées à la composition de la matrice et sont considérées comme indésirables. Par exemple, lors du développement des supports d'interaction hydrophobes, des interactions électrostatiques secondaires ont été

observées (Hofstee, 1973). Ces interactions sont non spécifiques et donc non désirées lors de la purification. Néanmoins, certaines équipes ont remarqué que la présence de groupements ioniques avec les groupements hydrophobes pouvait avoir des avantages en termes de séparation (Hofstee, 1973; Locke, 1973). Par la suite, des résines couplant des groupements ioniques et hydrophobes ont été développées afin d'utiliser de façon rationnelle plusieurs types d'interactions (Kennedy *et al.*, 1986). C'est ce que l'on appelle la chromatographie en mode mixte (ou multimodale).

La chromatographie en mode mixte a donc pour objectif de faire intervenir au moins deux types d'interactions de façon contrôlée sur un même support de chromatographie. De nouvelles sélectivités (capacités à séparer deux molécules) sont ainsi obtenues, différentes de la simple combinaison de chaque type de chromatographie. La plupart des résines en mode mixte combinent des interactions électrostatiques avec des groupements chargés et des interactions hydrophobes avec des groupements alkyles ou aryles. Il en découle une complexité dans le développement d'une étape de purification puisque plusieurs paramètres vont pouvoir influencer l'accrochage des protéines sur le ligand et leur élution. Dans le cas d'une résine couplant des interactions électrostatiques et hydrophobes, le pH va contrôler l'interaction électrostatique grâce à la charge. Les sels vont contrôler l'interaction hydrophobe mais également l'interaction électrostatique au travers de la force ionique. C'est tout l'intérêt de la chromatographie en mode mixte, car il est possible d'optimiser de nombreux paramètres (type et concentration en sel, pH, tampon, ...) afin de définir les conditions de purification optimales. La combinaison de ces paramètres va conférer aux résines leur potentiel unique de séparation (Santarelli and Cabanne, 2018). Pour le développement du procédé de purification de la protéine Hsp12, différents types de résines, échangeuses d'ions et en mode mixte, ont été testées.

2 Mise au point du procédé de purification

Les premières étapes du procédé de purification sont mises au point par criblage en microplaques puis validées en colonnes à petite échelle. Par la suite, une augmentation des volumes de résine et d'échantillon est réalisée afin de vérifier la pertinence du protocole et obtenir de plus grandes quantités de protéine Hsp12 pure.

2.1 Etape 1

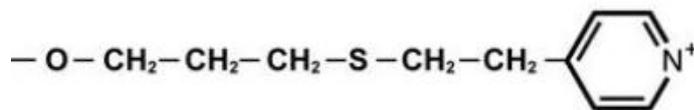
2.1.1 Criblage en microplaque avec la protéine Hsp12 recombinante

Afin d'identifier les meilleures conditions de purification, un criblage en microplaque est réalisé. Cette technique permet de tester différentes résines ainsi que différents tampons, pour la fixation de la protéine Hsp12 (adsorption) puis son décrochage (désorption). Ce criblage est réalisé avec cinq résines (Figure 27 et Tableau IV) :

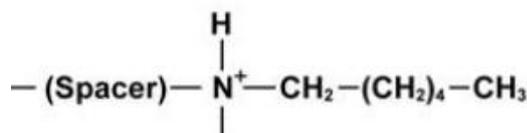
- i. quatre résines en mode mixte, combinant des interactions électrostatiques (échangeur d'anions) et hydrophobes : MEP HyperCel™ (Pall), HEA HyperCel™ (Pall), PPA HyperCel™ (Pall) et Cellufine MAX IB (JNC),
- ii. une résine échangeuse d'anions : Capto Q (GE Healthcare).

- Résines en mode mixte

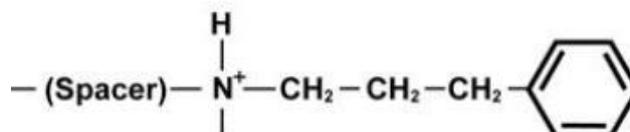
MEP HyperCel



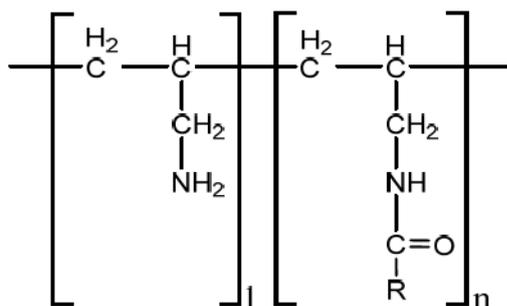
HEA HyperCel



PPA HyperCel



Cellufine Max IB



• Résine échangeuse d'anions

Capto Q

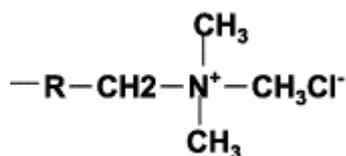


Figure 27 : Structure chimique des ligands pour les 5 résines de chromatographie.

Tableau IV : Caractéristiques des 5 résines de chromatographie.

Résine	Fabricant	Matrice	Tailles des billes (µm)	DBC (mg/mL)
HEA HyperCel	Pall	Cellulose réticulée	80-100	50 (BSA)
PPA HyperCel	Pall	Cellulose réticulée	80-100	50 (BSA)
MEP HyperCel	Pall	Cellulose réticulée	80-100	20 (Ac)
Cellufine MAX IB	JNC	Cellulose hautement réticulée	90	≥ 60 (BSA)
Capto Q	GE	Agarose réticulée et réseau de dextran	90	100 (BSA)

Les résines HEA, PPA et MEP HyperCel sont constituées d'une matrice formée de cellulose réticulée contrairement à celle de la résine Capto Q qui est formée d'agarose réticulée ainsi que de dextran. La taille des billes est similaire pour les 5 résines, comprise entre 80 et 100 µm permettant une résolution adaptée à une première étape de purification. La capacité de fixation dynamique (DBC), correspondant à la quantité de protéine modèle (BSA ou anticorps) qui peut se fixer par millilitre de résine en présence d'un flux de tampon. Elle est comprise entre 50 et 100 mg/mL selon les résines.

La protéine recombinante Hsp12 pure produite chez *Escherichia coli* a été utilisée comme échantillon pour ce criblage (Léger *et al.*, 2017). L'équilibration et le lavage ont été réalisés avec du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8. Pour l'élution, quatre tampons ont été testés : un tampon sodium-citrate 100 mM à pH 4 et trois tampons sodium-citrate 100 mM à pH 5 avec soit 0,1 M de NaCl, 0,5 M de NaCl ou 1 M de NaCl. La quantité de protéine Hsp12 est obtenue par spectrophotométrie dans les différentes fractions : fraction de protéines non retenues (NR), fraction de lavage et fraction d'élution (Figure 28). Dans chaque puits, 189 mg de protéine Hsp12 pure sont déposés.

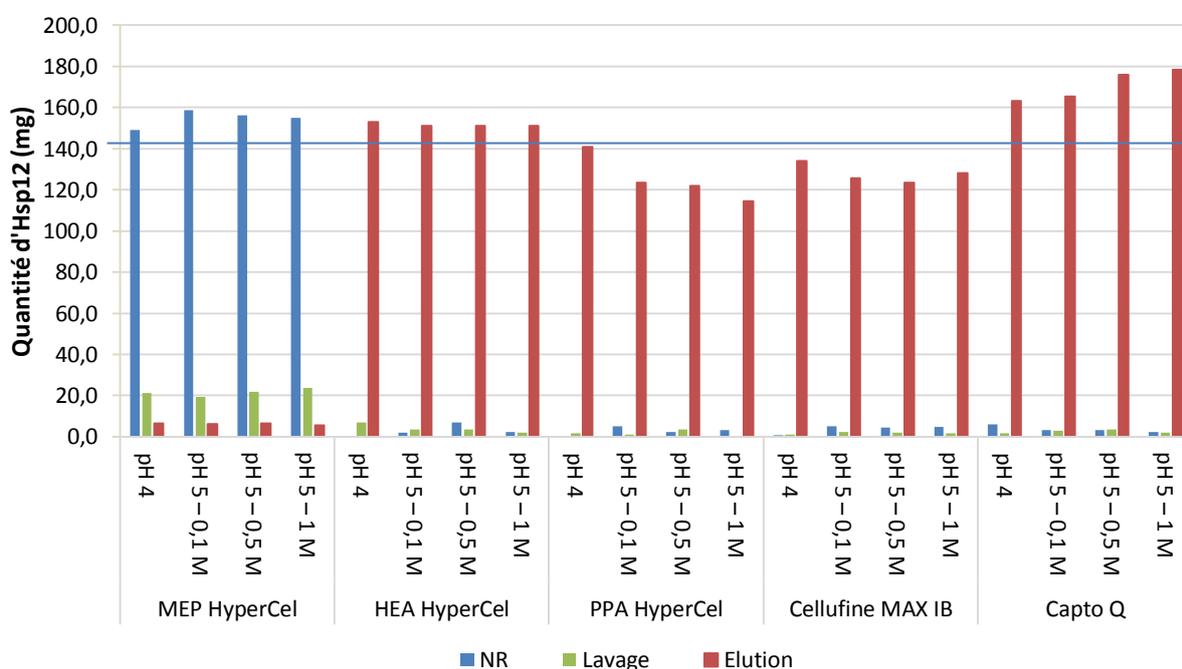


Figure 28 : Criblage en microplaque de différentes résines. La quantité de protéine Hsp12 est montrée dans chaque fraction (non retenue, lavage et élution) en fonction des 5 résines et des 4 conditions d'élution.

Avec la résine en mode mixte MEP HyperCel, 155 mg (82%) de protéine Hsp12 sont retrouvés en moyenne dans les fractions non retenues. La protéine ne s'est donc pas fixée sur la résine. Le ligand de la résine MEP HyperCel possède un pKa de 4,8. A pH 8, il n'est pas chargé et ne peut faire intervenir que des interactions hydrophobes. La protéine Hsp12 est majoritairement hydrophile et n'a visiblement pas pu créer d'interactions hydrophobes avec la résine.

Les trois résines en mode mixte HEA HyperCel, PPA HyperCel et Cellufine MAX IB présentent des résultats similaires. Il n'y a pas de protéine Hsp12 dans les fractions non retenues et de lavage. Elle s'est donc fixée sur ces trois résines. Ces trois résines possèdent des pKa basiques, elles sont donc chargées positivement lors de la phase d'accrochage à pH 8. La protéine Hsp12 quant à elle est chargée négativement du fait de son point isoélectrique ($pI = 5,2$). Elle peut donc interagir avec les résines au travers d'interactions électrostatiques, mais aussi éventuellement par des interactions hydrophobes. Dans les fractions d'élution, 151 mg (80%), 125 mg (66%) et 129 mg (68%) de la protéine Hsp12 sont récupérés respectivement pour les résines HEA HyperCel, PPA HyperCel et Cellufine MAX IB. La protéine Hsp12 est donc décrochée des résines grâce aux tampons d'élution utilisés.

La résine échangeuse d'anions Capto Q présente un comportement similaire à celui des trois résines précédentes. La protéine Hsp12 s'est fixée sur la résine et est éluée avec les différents tampons d'élution. Il faut noter que les quantités protéiques obtenues sont plus élevées qu'avec les résines en mode mixte, la quasi-totalité de la protéine Hsp12 est donc récupérée après l'étape d'élution. Cette résine a donc été choisie, avec le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 comme tampon d'équilibration. Le tampon sodium-citrate 100 mM à pH 4 est choisi comme tampon d'élution car il permet l'élution de la quasi-totalité de la protéine Hsp12 sans ajout de NaCl. Ceci permet de s'affranchir de l'ajout de NaCl qui pourrait être gênant pour l'étape de purification suivante.

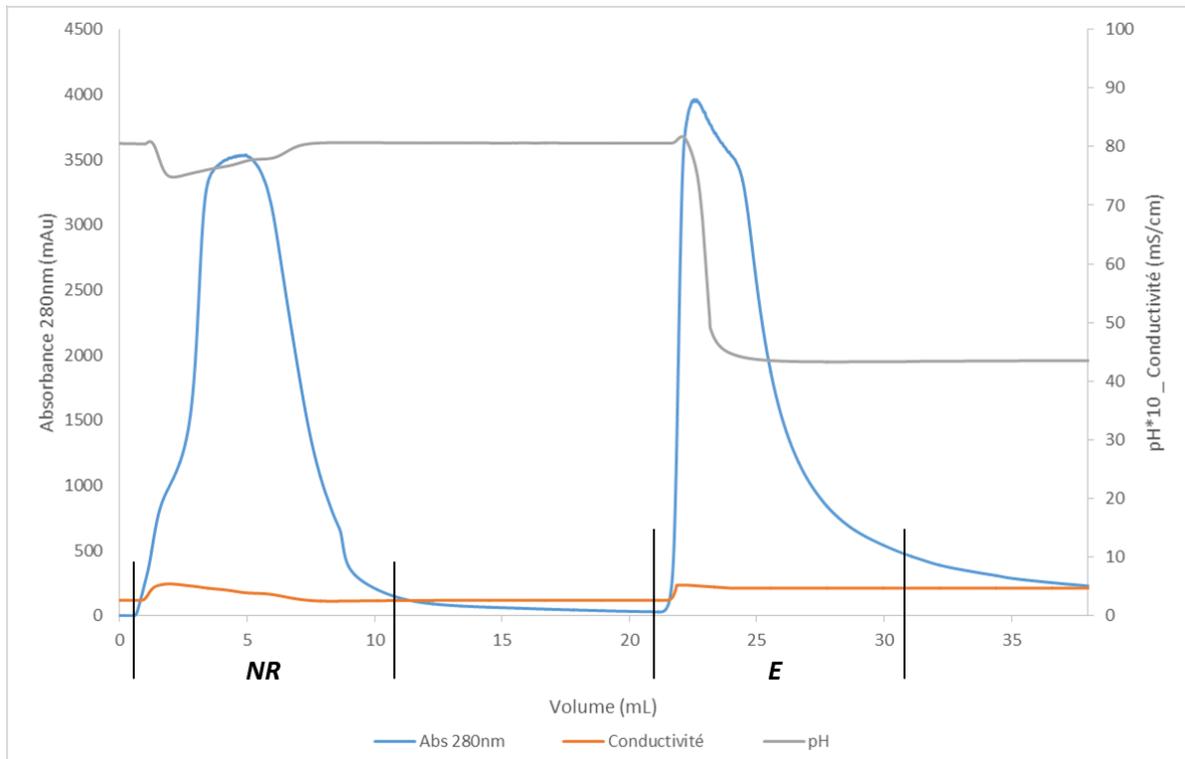
Ces observations ont été obtenues grâce à un criblage en microplaque. Il s'agit de conditions statiques, puisqu'il n'y a pas un flux continu des tampons au travers de la résine. Il faut donc confirmer ces résultats en condition dynamique et avec un échantillon brut obtenu après lyse des levures.

2.1.2 Validation des résultats

2.1.2.1 Résine Capto Q

Un automate de purification AKTA Avant (GE Healthcare) est utilisé avec une colonne contenant de la résine Capto Q. La purification est réalisée avec une colonne contenant 1 mL

de résine. 1,5 mL d'extrait brut sont injectés dans la colonne. Les tampons d'équilibration et d'éluion utilisés sont ceux choisis précédemment grâce au criblage. Le chromatogramme obtenu est présenté sur la Figure 29.



**Figure 29 : Chromatogramme obtenu lors de l'étape 1 avec 1 mL de résine Capto Q.
(NR : fraction non retenue. E : fraction d'éluion.)**

L'absorbance à 280 nm révèle un premier pic correspondant à la fraction de protéines non retenues sur la résine (Capto Q NR). L'éluion est réalisée par diminution du pH jusqu'à une valeur de 4. Un pic d'éluion, nommé Capto Q E, est observé. Les deux fractions obtenues : Non Retenue (Capto Q NR) et Elution (Capto Q E) sont ensuite analysées par immunodétection (Figure 30).

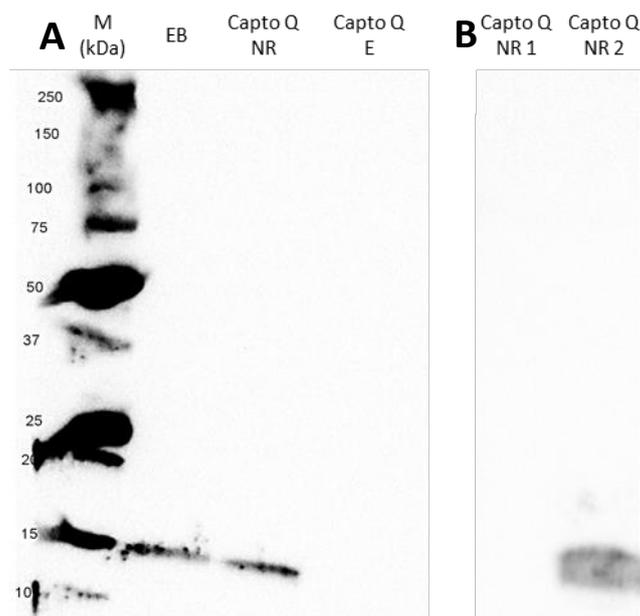


Figure 30 : Immunodétection de la protéine Hsp12 dans les fractions obtenues avec 1 mL de résine Capto Q.

**(EB : extrait brut. Capto Q NR 1 et 2 : fractions non retenues.
Capto Q NR : fractions NR1 et NR2 rassemblées. Capto Q E : fraction d'élution)**

La protéine Hsp12, présente dans l'extrait brut (EB) avant purification, est retrouvée uniquement dans la fraction non retenue (NR). La protéine Hsp12 ne s'est donc pas fixée sur la résine. Un résultat différent du criblage en microplaque est donc obtenu. Les différences par rapport au criblage sont certes le flux des tampons mais également le type d'échantillon. Lors du criblage, la protéine Hsp12 seule a été utilisée. Ici, c'est un échantillon complexe contenant à la fois la protéine Hsp12 et de nombreuses protéines contaminantes. L'expérience a été renouvelée en fractionnant en deux parties égales le pic de protéines non retenues (NR1 et NR2). L'immunodétection a montré que la protéine Hsp12 est présente dans la fraction NR2 seulement (Figure 30). Ce phénomène suggère que la protéine Hsp12 est accrochée puis décrochée. Il peut y avoir compétition entre certains contaminants qui ont une plus grande affinité pour la résine que la protéine Hsp12. Dans les années 40, ce phénomène a été décrit et valorisé sous le principe de « chromatographie de déplacement » (Andjelković *et al.*, 2017). Il est basé sur l'affinité différente des protéines composant un échantillon pour le ligand de chromatographie. Cette méthode a été largement utilisée pour la purification de peptides ou de protéines (Hodges *et al.*, 1988; Brgles *et al.*, 2011). D'autres essais ont ainsi été réalisés avec la résine Capto Q mais n'ont pas permis d'obtenir de

résultats satisfaisants (données non présentées). Il a donc été décidé de changer de résine. Au regard du criblage, ce sont les résines en mode mixte HEA HyperCel et PPA HyperCel (à pH 4) qui semblaient être intéressantes pour purifier la protéine Hsp12. La différence entre ces deux résines réside dans l'hydrophobicité de leur ligand. La résine PPA HyperCel est la résine en mode mixte la plus hydrophobe grâce à la présence d'un groupement propyle et d'un noyau phényle (Pezzini *et al.*, 2015). La protéine Hsp12 ne présente que quelques acides aminés non polaires (aromatiques et aliphatiques). Afin de favoriser sa fixation en combinant des interactions électrostatiques et hydrophobes, la résine la plus hydrophobe PPA HyperCel a été choisie.

2.1.2.2 Résine PPA HyperCel

La résine PPA HyperCel est constituée de billes de cellulose fonctionnalisées par un groupe phenylpropylamine. La fonction amine correspond au groupement ionique et le groupement phenylpropyle correspond au groupement hydrophobe. La liaison aux protéines peut donc se faire grâce à des interactions électrostatiques au niveau de la fonction amine et/ou grâce à des interactions hydrophobes avec le groupement phenylpropyle (Figure 31).

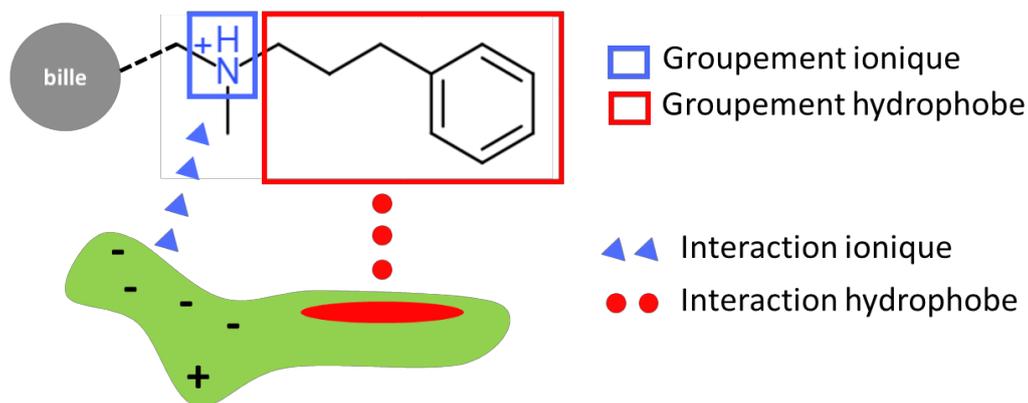


Figure 31 : Représentation schématique de la résine PPA HyperCel et des interactions avec les protéines.

Le groupement ionique possède un pKa de 8, ce qui lui confère une charge positive dans un environnement de type biologique et ainsi l'assimile à un échangeur d'anions fort.

La partie hydrophobe est constituée d'un groupement phényle, ce qui lui confère une hydrophobicité supérieure à celle d'un groupement alkyle. Ce ligand en mode mixte permet donc d'obtenir des sélectivités non accessibles avec la chromatographie échangeuse d'ions ou bien la chromatographie d'interaction hydrophobe.

L'essai en condition dynamique est réalisé avec une colonne contenant 1 mL de résine PPA HyperCel. 1,5 mL d'extrait protéique brut sont ainsi injectés avec un débit de 0,5 mL/min. Le tampon d'équilibration sélectionné est du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8. D'après les résultats obtenus par le criblage en microplaques, l'élution est réalisée par modification de pH grâce à du tampon sodium-citrate 100 mM à pH 4. Enfin, afin de décrocher les protéines encore fixées sur la résine, un lavage est réalisé avec une solution de NaOH à 0,5 M avec 0,5 M de NaCl (Figure 32).

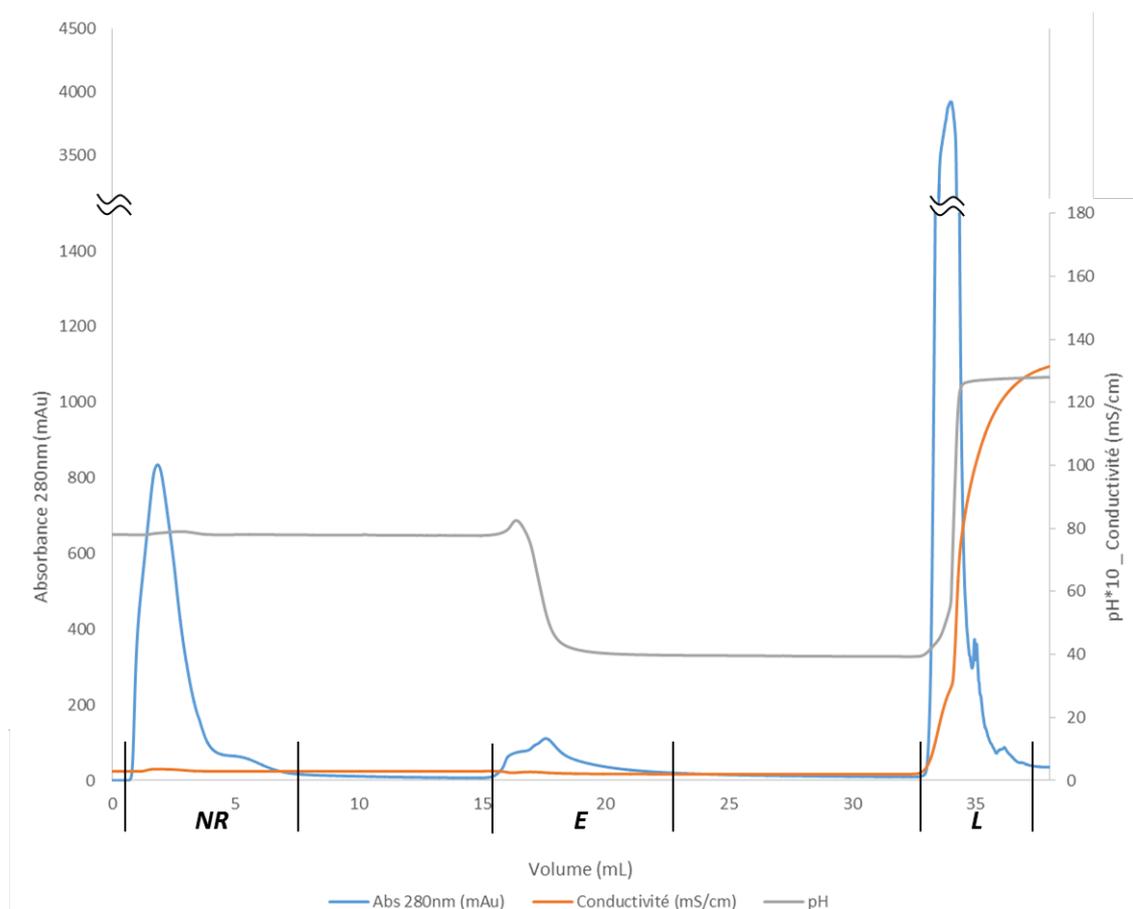


Figure 32 : Chromatogramme obtenu lors de l'étape 1 avec 1 mL de résine PPA.
(Plusieurs fractions sont collectées. NR : fraction non retenue. E : fraction d'élution. L : fraction de lavage)

L'absorbance à 280 nm révèle un premier pic correspondant à la fraction de protéines non retenues (PPA NR) sur la résine. Celle-ci correspond à des protéines non fixées. A environ 15 mL, l'élution est réalisée, le pH diminue ainsi jusqu'à une valeur de 4. Un pic d'élution, nommé PPA E, est observé. Puis, à environ 33 mL, un lavage est réalisé afin de décrocher les molécules encore fixées sur la résine. La fraction nommée PPA L est ainsi récupérée avec une très forte d'absorbance à environ 4000 mAu. Les trois fractions obtenues : Non Retenue (PPA NR), Elution (PPA E) et Lavage (PPA L) sont ensuite analysées par gel SDS-PAGE et immunodétection (Figure 33).

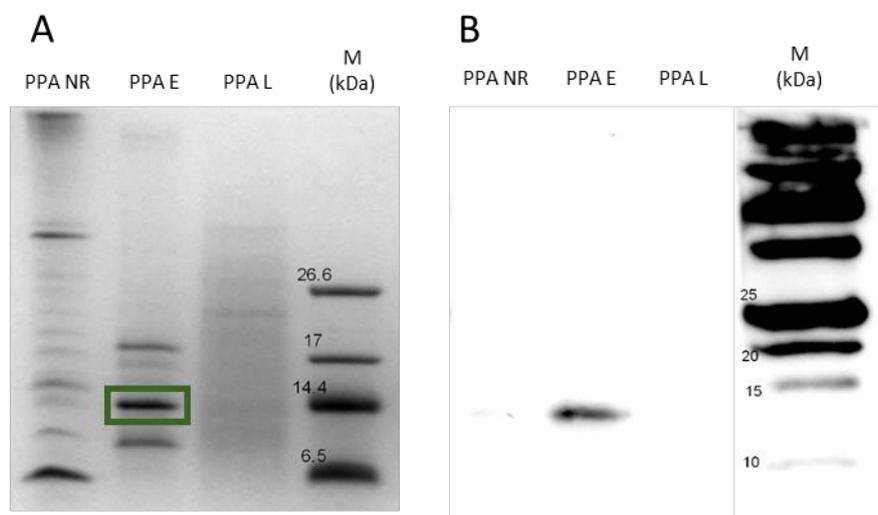


Figure 33 : Gel SDS-PAGE et immunodétection de la protéine Hsp12 dans les fractions obtenues lors de l'étape 1 avec 1 mL de résine PPA. (NR : Non Retenue. E : Elution. L : Lavage)

A. Gel SDS-PAGE

B. Immunodétection

Dans la fraction Non Retenue (PPA NR), de nombreuses protéines sont éliminées. Dans la fraction d'élution (PPA E), trois bandes majoritaires sont visibles. La bande la plus intense possède une masse moléculaire d'environ 14 kDa. Cette bande correspond à la protéine Hsp12, identifiée grâce à l'immunodétection. Pour la fraction de lavage (PPA L), une trainée est observée sur la quasi-totalité du gel. Il y a donc de nombreuses protéines adsorbées sur la résine et qui nécessitent des conditions drastiques (NaOH) pour être désorbées. Ces protéines présentent probablement de nombreuses zones hydrophobes. Ainsi, de nombreuses protéines sont éliminées au cours des phases d'adsorption et de

lavage, grâce aux différentes interactions possibles en chromatographie en mode mixte. Les interactions mises en jeu dans cette étape de purification sont schématisées ci-après (Figure 34).

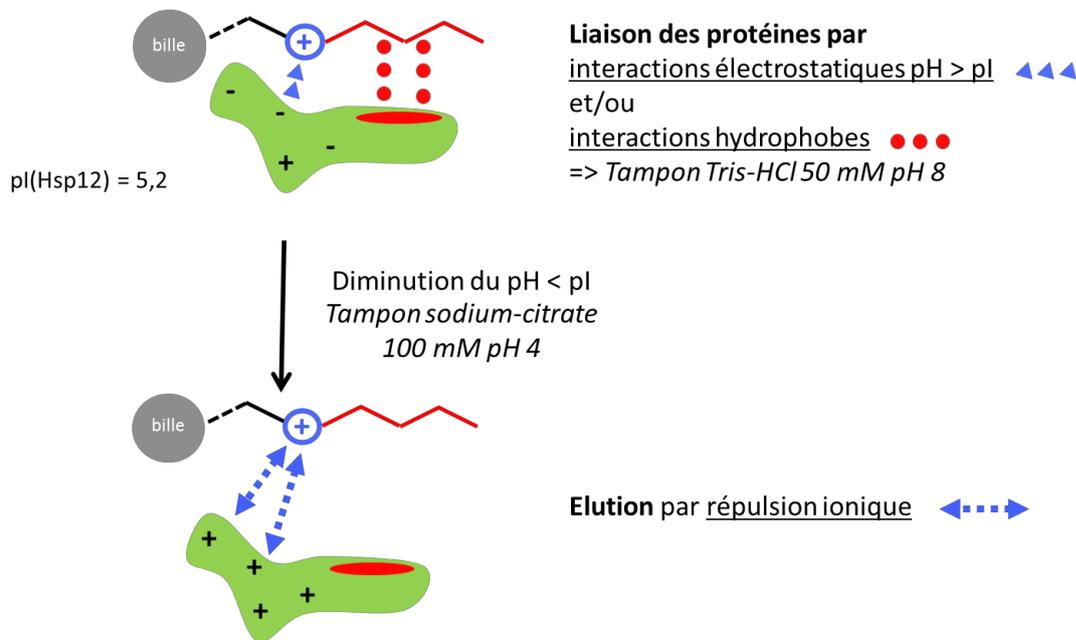


Figure 34 : Représentation des interactions mises en jeu lors de l'étape 1 de purification avec la résine PPA.

La liaison de la protéine Hsp12 est réalisée grâce à des interactions électrostatiques avec l'amine et possiblement des interactions hydrophobes. Les protéines ne présentant pas les caractéristiques requises (*i.e.* charge négative et/ou présence de zones hydrophobes) ne sont pas retenues sur la résine (fraction NR). Puis lors de l'éluion, la diminution de pH modifie la charge globale de la protéine Hsp12 et entraîne une répulsion ionique. Avec les résines en mode mixte, il y a une balance permanente entre les interactions électrostatiques et hydrophobes. Ici, la répulsion ionique est supérieure à une potentielle attraction due aux interactions hydrophobes. La protéine Hsp12 est ainsi décrochée de la résine. D'autres protéines sont co-éluées de la résine avec la protéine Hsp12. Elles ont probablement un point isoélectrique compris entre 4 et 8, comme la protéine Hsp12 puisqu'elles sont éluées par répulsion ionique.

En conclusion, la protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction d'élution. De plus, de nombreux contaminants protéiques sont éliminés. Cependant, il reste encore à éliminer au moins deux protéines d'environ 10 et 20 kDa visible en gel SDS-PAGE. Une deuxième étape de purification est donc développée.

2.2 Etape 2

L'objectif de cette deuxième étape est d'éliminer les deux contaminants visibles dans la fraction d'élution de la première étape de purification. Afin de choisir une méthode de purification de manière rationnelle, une identification des protéines a été réalisée par spectrométrie de masse (Figure 35).

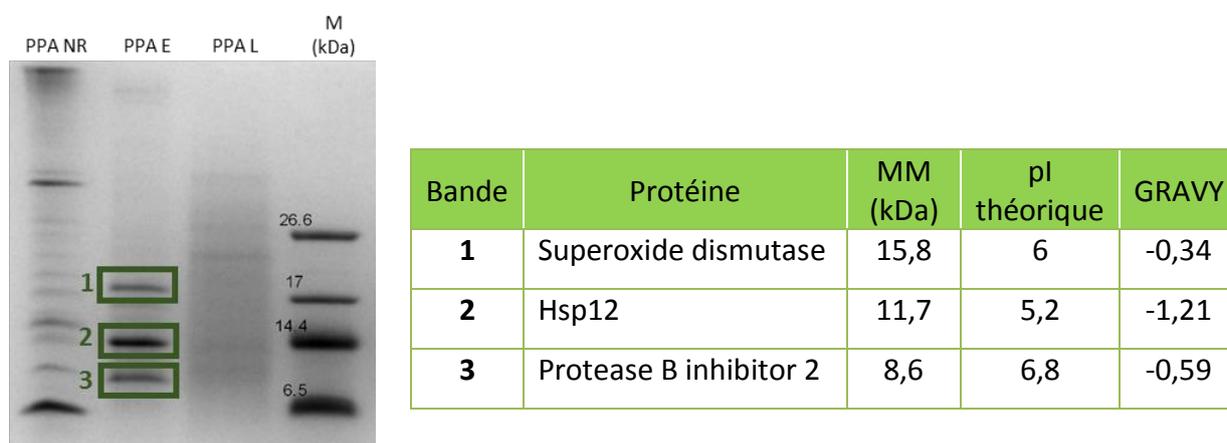


Figure 35 : Protéines identifiées après analyse des bandes par spectrométrie de masse. (MM : masse moléculaire, pI théorique : point isoélectrique théorique, GRAVY : indice d'hydrophobicité)

L'analyse par spectrométrie de masse confirme l'identification de la protéine Hsp12 pour la bande 2, comme le suggérait l'immunodétection. Les deux autres bandes correspondent à la superoxide dismutase (SD) et à la protease B inhibitor 2 (PBI2). Les principaux paramètres permettant la séparation de ces trois protéines sont la masse moléculaire, l'hydrophobicité et le point isoélectrique. Il a été envisagé de séparer les protéines selon leur masse moléculaire par chromatographie d'exclusion stérique. Cependant cette technique n'a pas permis de les séparer (données non présentées). Les masses moléculaires des protéines sont donc trop proches pour permettre leur séparation

par chromatographie d'exclusion stérique. Il a été envisagé de modifier le pH du tampon d'équilibration lors de l'étape 1. Cependant, cela n'a pas permis la séparation des trois protéines (données non présentées). Les points isoélectriques des 3 protéines étant proches, la différence de charges à un pH donné n'est pas suffisante pour les séparer.

Il a ensuite été envisagé d'utiliser l'hydrophobicité des protéines. L'indice GRAVY permet de comparer l'hydrophobicité des protéines. Dans notre cas, les protéines contaminantes semblent présenter plus de régions hydrophobes (-0,34 et -0,59) que la protéine Hsp12 (-1,21). Différents types de résines sont donc testées grâce à un criblage en microplaque : hydrophobes et en mode mixte. Les profils obtenus (données non présentées) nous ont permis d'obtenir les conclusions suivantes.

1. En chromatographie d'interactions hydrophobes, l'élution successive de la protéine Hsp12 puis des 2 contaminants a été observée lors du gradient décroissant de sels. Cependant, ce type de chromatographie n'a pas permis de discriminer de manière suffisamment efficace la protéine Hsp12 des contaminants.
2. En chromatographie en mode mixte, les résines HEA et PPA ont été testées. Avec la résine PPA, l'utilisation de NaCl a permis la séparation de la protéine Hsp12 des 2 contaminants. Elle s'avère suffisamment hydrophobe pour fixer les 2 contaminants et ainsi permettre leur séparation de la protéine Hsp12.

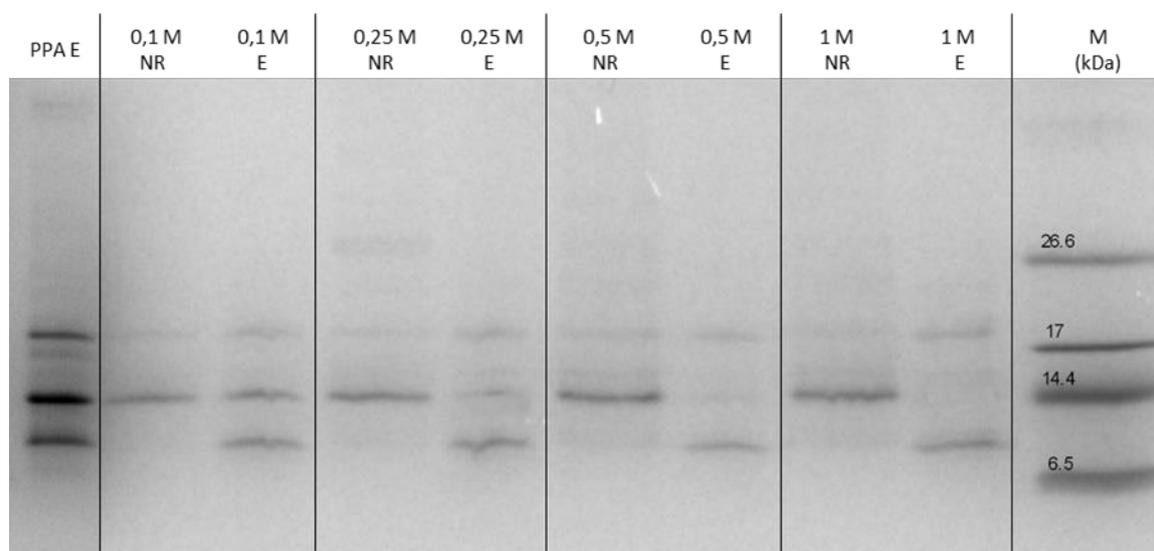
Ainsi, d'après ces différents résultats, l'utilisation de la résine PPA est envisagée. La stratégie mise en œuvre pour séparer la protéine Hsp12 de ces contaminants est développée ci-après.

La résine HyperCel PPA a donc été choisie, du fait de son importante hydrophobicité conférée par le groupement phényle. Lors de la première étape, la propriété d'échangeur ionique de la résine PPA a été principalement utilisée pour l'élution de la protéine Hsp12. L'objectif est d'utiliser dans cette deuxième étape la combinaison des deux propriétés de la résine en mode mixte dès l'équilibration. La concentration en chlorure de sodium (NaCl) va être le paramètre clé pour séparer les protéines. Dans le cas d'interactions électrostatiques, plus la concentration en NaCl est importante, plus les protéines se décrochent de la résine par effet de compétition avec le NaCl. Dans le cas d'interactions hydrophobes, plus la concentration en NaCl augmente, plus les interactions hydrophobes seront fortes entre les

protéines et la résine. Le NaCl occupe donc une place centrale lors de l'utilisation de résines en mode mixte combinant des interactions électrostatiques et hydrophobes.

2.2.1 Criblage en microplaque

Afin d'évaluer l'impact du NaCl sur la séparation de la protéine Hsp12 et des deux protéines contaminantes, un criblage en microplaque est réalisé. La résine PPA HyperCel (Pall) et quatre conditions d'équilibration sont alors testées. Pour l'équilibration, du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 est utilisé avec 4 concentrations en NaCl différentes : 0,10 M, 0,25 M, 0,5 M et 1 M de NaCl. L'échantillon utilisé est la fraction d'élution de l'étape 1 (PPA E), qui a été reconditionnée avec les tampons d'équilibration correspondant. L'élution est réalisée avec du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4. Pour chaque concentration en NaCl, les fractions non retenue (NR) et d'élution (E) sont analysées par gel SDS-PAGE (Figure 36).



**Figure 36 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions obtenues avec le criblage en microplaque.
(NR : fraction non retenue, E : fraction d'élution)
(Concentrations en NaCl : 0,1M ; 0,25M ; 0,5M et 1M)**

Avec une concentration en NaCl de 0,1 M, la protéine Hsp12 est présente dans les deux fractions NR et E. Les deux protéines contaminantes sont retrouvées dans la fraction d'élution. Avec une concentration en NaCl de 0,25 M, 0,5 et 1 M, la majorité de la protéine

Hsp12 est retrouvée dans la fraction NR alors que les deux protéines contaminantes sont présentes dans la fraction d'élution. La protéine Hsp12 ne s'accroche donc plus sur la résine au-delà d'une certaine concentration en NaCl. Ce phénomène suggère que les interactions électrostatiques prédominent sur les interactions hydrophobes dans le cas de la protéine Hsp12. Il semble que, dans le cas des protéines contaminantes, ce soit l'inverse. La présence de fortes concentrations en NaCl n'entraîne pas leur élution. Donc l'interaction hydrophobe prédomine et est renforcée par la présence de sel. Ces interactions sont schématisées sur la Figure 37.

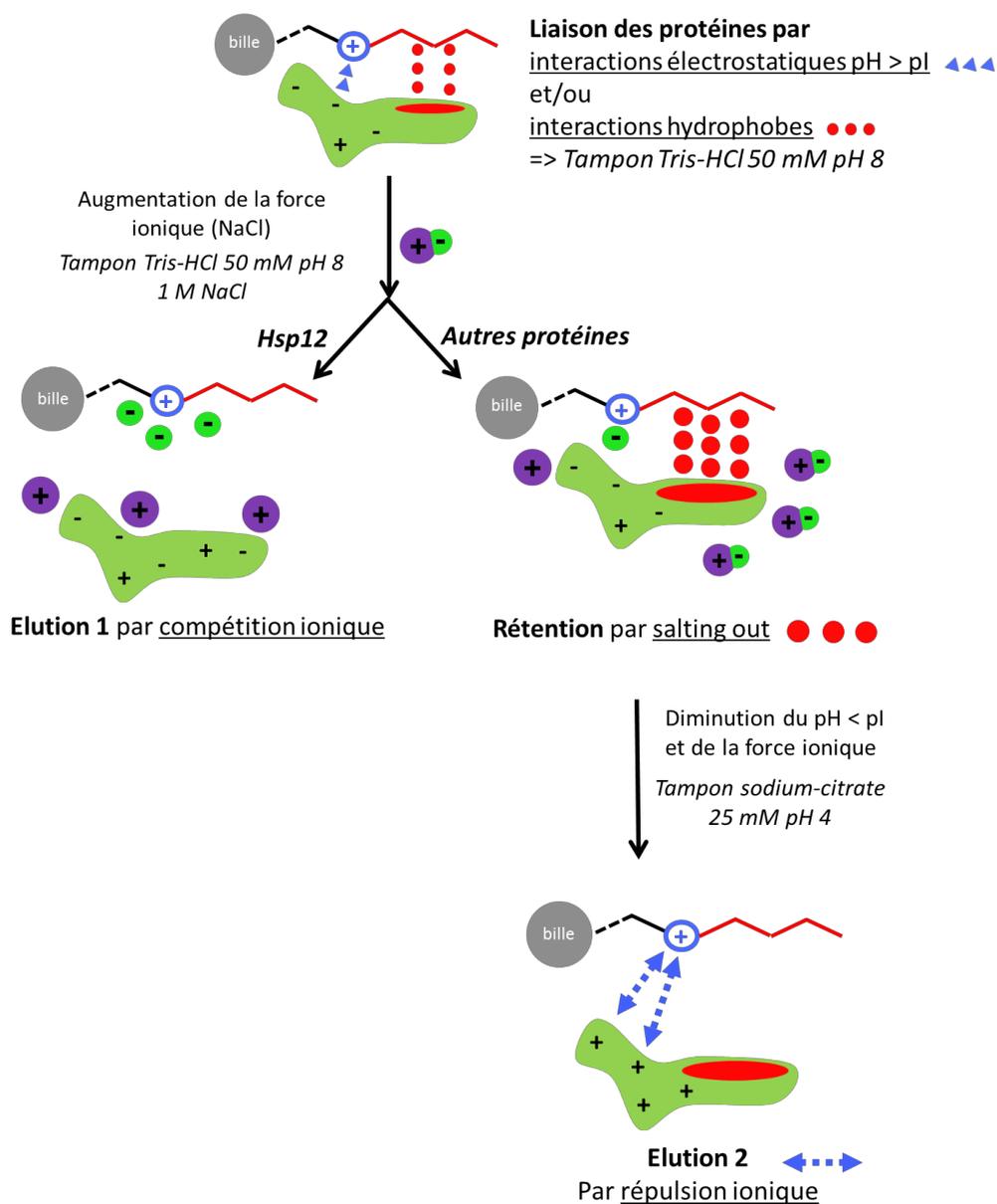


Figure 37 : Représentation des interactions mises en jeu lors de l'étape 2 de purification avec la résine PPA.

La protéine Hsp12 est globalement hydrophile avec 50% d'acides aminés chargés et elle semble interagir avec la résine principalement par des interactions électrostatiques. En effet, l'ajout de NaCl permet de décrocher la protéine Hsp12 de la résine par compétition ionique. Il faut noter que la protéine Hsp12 peut présenter quelques zones hydrophobes qui interagissent avec le ligand. Mais cette possible interaction n'est pas suffisante pour contrebalancer la compétition ionique. Par ailleurs, l'ajout de NaCl n'entraîne pas le décrochage des 2 protéines contaminantes. En effet, elles possèdent des zones hydrophobes qui interagissent avec le ligand. L'interaction hydrophobe est ainsi renforcée par l'ajout de sels par l'effet de « salting out ». Cet effet est caractérisé par une plus grande affinité des molécules d'eau pour le NaCl que pour les protéines. Les protéines seront ainsi dans un environnement moins aqueux et vont donc exposer leurs zones hydrophobes, qui vont interagir avec la résine PPA. Dans ce cas, la compétition ionique n'est pas suffisante pour contrebalancer la rétention par « salting-out » et entraîner le décrochage des deux protéines. Un tampon à pH 4 est nécessaire pour les décrocher via la répulsion ionique. Il est essentiel de garder à l'esprit que, pour la chromatographie en mode mixte, l'ajout de sels fait intervenir un équilibre entre la compétition ionique qui entraîne la répulsion des protéines et l'effet de « salting-out » qui entraîne leur attraction.

Ces observations sont obtenues grâce à un criblage en microplaque. Il faut donc confirmer ces résultats avec une colonne contenant de la résine PPA, en condition dynamique.

2.2.2 Essai en condition dynamique

La deuxième étape est réalisée sur une colonne de 1 mL avec un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,25 M de NaCl (27 mS/cm) (Figure 38). 10 mL de la fraction d'élution de la première étape de purification (PPA E) sont reconditionnés dans le tampon d'équilibration correspondant à l'aide de filtres à centrifuger (Amicon Ultra-15, 3 kDa). 9 mL d'échantillon reconditionné sont ensuite injectés sur la colonne. Après élimination des protéines non retenues grâce à du tampon d'équilibration, l'élution est réalisée avec du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4 (4 mS/cm). Le débit appliqué est de 0,5 mL/min. Les fractions non retenues et d'élution sont récupérées : PPA NaCl NR et PPA NaCl E (Figure 38). La fraction

non retenue est concentrée grâce à des filtres à centrifuger. Les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE (Figure 39).

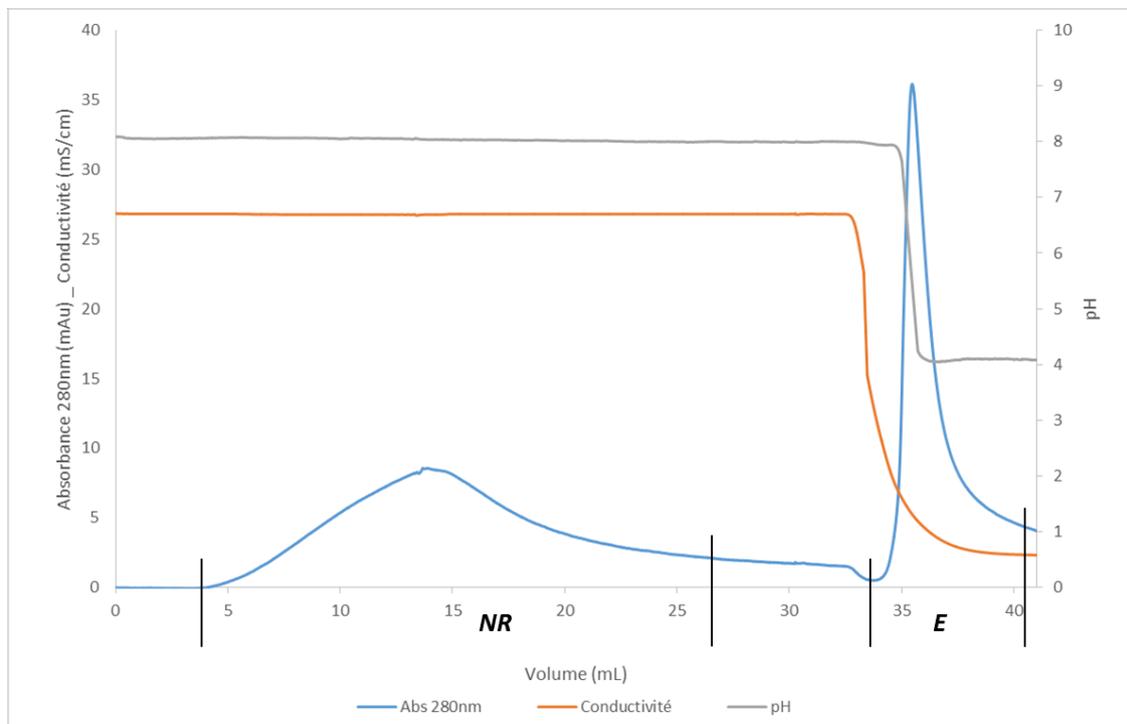


Figure 38 : Chromatogramme obtenu lors de l'étape 2 en condition dynamique avec 1 mL de résine PPA (NR : Non Retenue, E : Elution).

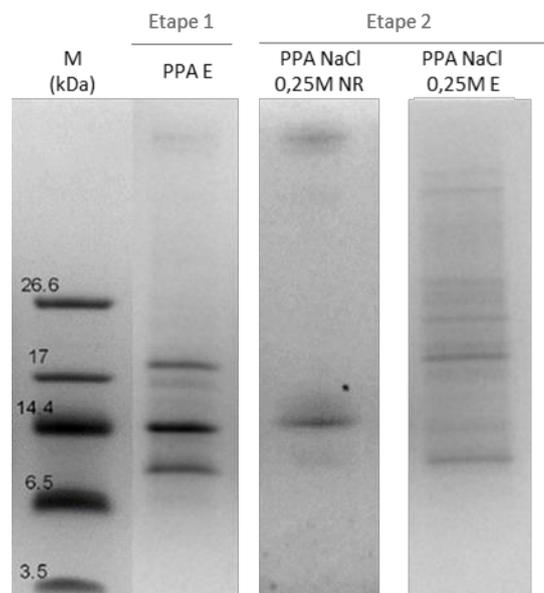


Figure 39 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions obtenues lors de l'étape 2.

L'essai en colonne confirme les résultats observés en microplaques. En effet, la protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction non retenue et de nombreux contaminants sont éliminés dans la fraction d'éluion. La pureté de la protéine Hsp12 semble être améliorée. Il reste tout de même quelques protéines contaminantes, notamment un groupe de protéine à haute masse moléculaire. Une chromatographie d'exclusion stérique est donc envisagée.

2.3 Etape 3

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) permet de séparer les protéines selon leur encombrement stérique, qui est corrélé à la masse moléculaire des protéines lorsqu'elles ont une forme globulaire. Une colonne Superdex 75 Increase 10/300GL (GE Healthcare) a été utilisée. 0,5 mL d'échantillon PPA NaCl NR concentré est injecté. Du tampon sodium-phosphate 50 mM à pH 7,2 est utilisé avec un débit de 0,8 mL/min (Figure 40).

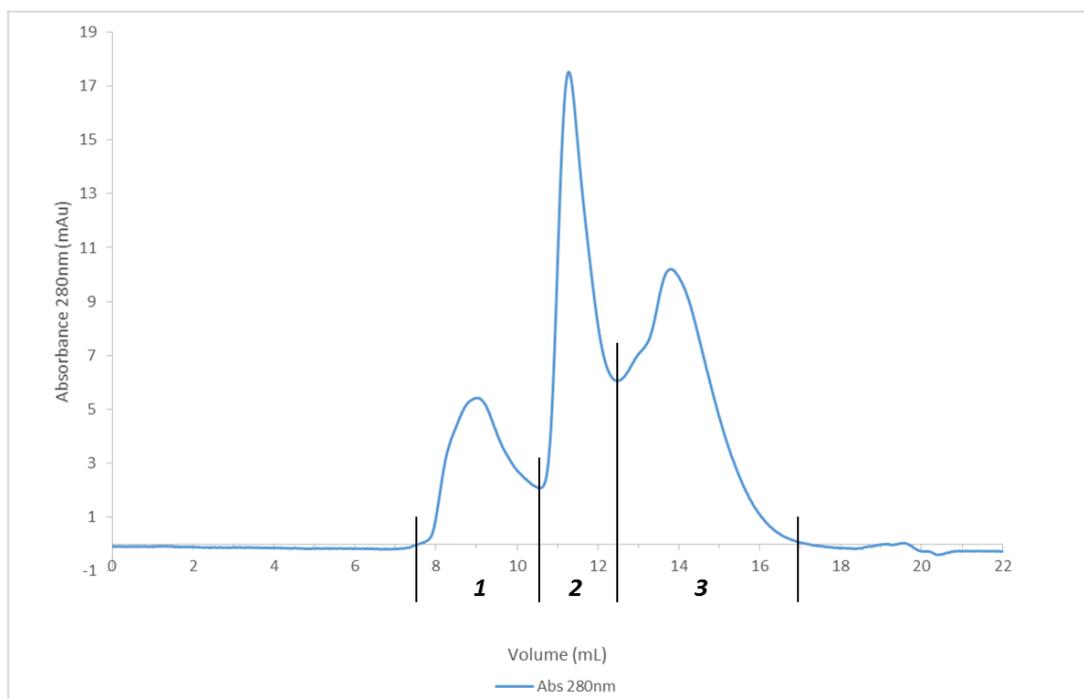


Figure 40 : Chromatogramme obtenu lors de l'étape 3 par chromatographie d'exclusion stérique.

Trois fractions sont obtenues : SEC 1, SEC 2 et SEC 3. Celles-ci sont analysées par gel SDS-PAGE (Figure 41).

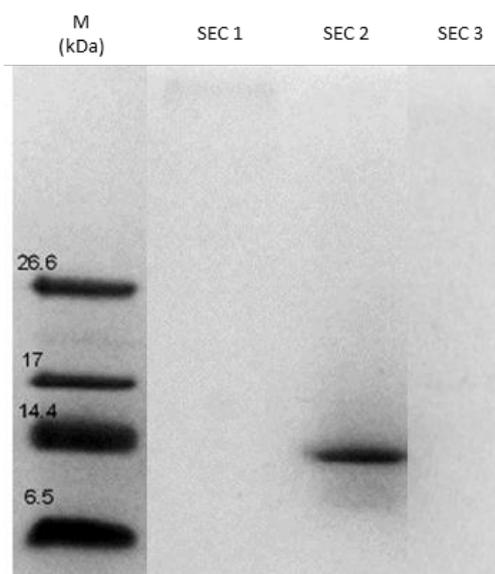


Figure 41 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions obtenues par chromatographie d'exclusion stérique.

La fraction SEC 2 contient la protéine Hsp12 sans aucune autre protéine contaminante visible. Dans les fractions SEC 1 et SEC 3, les protéines ne sont pas visibles à cause de la dilution de l'échantillon au cours de la purification.

L'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique en troisième étape permet d'obtenir la protéine Hsp12 pure. Afin de confirmer le protocole de purification en trois étapes, une purification globale est réalisée à partir d'1,5 mL d'extrait protéique brut.

2.4 Récapitulatif

Les conditions de purification de chaque étape sont rappelées dans le tableau suivant (Tableau V).

Tableau V : Récapitulatif des conditions de purification

Etape	Résine	Volume d'injection	Débit	Tampon d'équilibration	Tampon d'élution	Fraction contenant Hsp12
1	PPA (mode mixte)	1,5 mL	0,5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA E
2	PPA (mode mixte)	9 mL	0,5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8 0,25 M NaCl	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA NaCl NR
3	Superdex 75 Increase (SEC)	0,5 mL	0,8 mL/min	Sodium-phosphate 50 mM pH 7,2	-	SEC 2

La première étape est réalisée avec la résine PPA. La résine est équilibrée avec un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 afin que la protéine Hsp12 soit chargée négativement et s'adsorbe sur la résine chargé positivement. Le débit appliqué est de 0,5 mL/min. 1,5 mL d'extrait protéique brut sont injectés. Après élimination des protéines non retenues grâce au tampon d'équilibration, l'élution est réalisée avec du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4. Enfin, la protéine éluée est reconditionnée dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,25 M de NaCl afin de permettre la deuxième étape.

La deuxième étape est également réalisée avec la résine PPA. La résine est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,25 M de NaCl. Le débit appliqué est de 0,5 mL/min. 10 mL de la fraction d'élution de la première étape de purification (PPA E) sont reconditionnés dans le tampon d'équilibration à l'aide de filtres à centrifuger (Amicon Ultra-15, 3 kDa). 9 mL d'échantillon reconditionné sont ensuite injectés sur la colonne. Après élimination des protéines non retenues, dont la protéine Hsp12, grâce à du tampon d'équilibration, l'élution est réalisée avec du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4.

La troisième étape consiste en une chromatographie d'exclusion stérique avec la résine Superdex 75 increase et du tampon sodium-phosphate 50 mM à pH 7,2. Suite à cette étape, la protéine Hsp12 pure est récupérée.

Ce protocole est réalisé et les fractions obtenues sont analysées par gel SDS-PAGE (Figure 42).

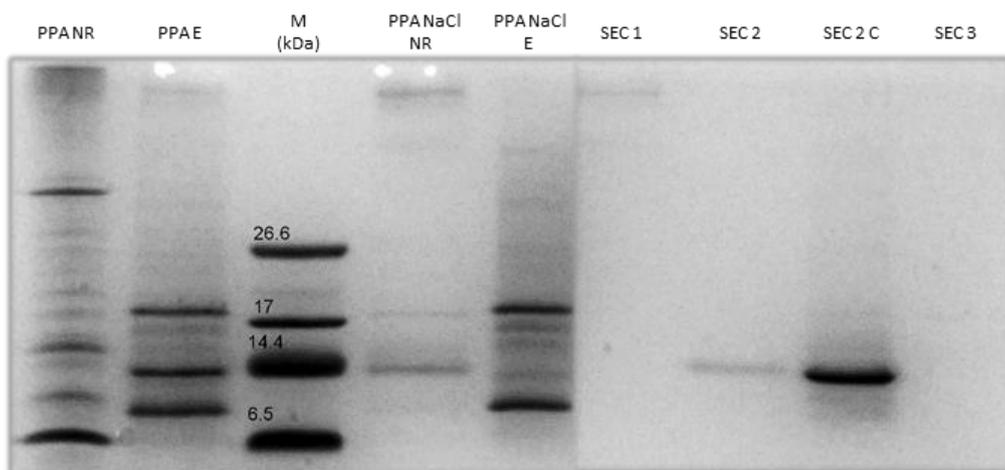


Figure 42 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions des trois étapes de purification. (PPA NR et E : étape 1. PPA NaCl NR, E et L : étape 2. SEC 1, 2 et 3 : étape 3).

Le profil des fractions PPA NR et E confirment les résultats obtenus pour la première étape. La protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction d'élution (PPA E). Deux protéines contaminantes sont encore majoritairement présentes (SD et PBI2). Lors de la deuxième étape, la protéine Hsp12 est bien récupérée dans la fraction non retenue (PPA NaCl NR) avec des protéines de masses moléculaires élevées. Les deux protéines contaminantes (SD et PBI2) sont retrouvées dans la fraction d'élution (PPA NaCl E). Enfin, suite à la troisième étape, la protéine Hsp12 pure est récupérée dans la fraction SEC 2. Pour discriminer d'éventuelles protéines contaminantes, la fraction SEC 2 a été concentrée et analysée (SEC 2 C). Il apparaît une légère trainée mais aucune autre bande n'est visible. Par conséquent, le protocole global confirme les résultats précédents.

La validation du protocole a été réalisée à petite échelle sur des colonnes contenant 1 mL de résine PPA. Afin de disposer de plus grandes quantités de protéines, une augmentation d'échelle (scale up) d'un facteur 5 est réalisée. Les quantités de résine mais également d'échantillon sont ainsi augmentées.

3 Changement d'échelle

Pour réaliser un changement d'échelle ou « scale-up », plusieurs paramètres peuvent être augmentés (GE Healthcare Life Science, 2013), tels que les dimensions de la colonne, le volume d'échantillon injecté ou le débit volumique. Dans notre cas, les dimensions de la colonne sont augmentées afin de multiplier le volume de résine par 5. Pour cela, la hauteur ainsi que le diamètre de la colonne sont augmentés, on parle alors de scale up combiné. Afin d'assurer la performance de la purification lors du scale-up, il est nécessaire de conserver le même temps de résidence de l'échantillon sur la résine. Le temps de résidence est défini comme le temps mis par l'échantillon pour traverser la colonne. Un débit de 2,5 mL/min sera ainsi appliqué. De plus, comme le volume de résine augmente, il y aura plus de sites d'interaction disponibles, le volume d'échantillon est donc également augmenté, d'un facteur 5. Ces différents paramètres sont ainsi implémentés pour évaluer la purification.

Les conditions de purification de chaque étape sont rappelées dans le tableau suivant (Tableau VI).

Tableau VI : Récapitulatif des conditions de purification

Etape	Résine	Volume d'injection	Débit	Tampon d'équilibration	Tampon d'élution	Fraction contenant Hsp12
1	PPA (mode mixte)	7 mL	2,5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA E
2	PPA (mode mixte)	50 mL	2,5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8 0,25 M NaCl	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA NaCl NR
3	Superdex 75 pg (SEC)	5 mL	1 mL/min	Sodium-phosphate 50 mM pH 7,2	-	SEC 2

3.1 Etape 1 : PPA

7 mL d'extrait brut sont injectés sur une colonne contenant 5 mL de résine PPA avec un débit de 2,5 mL/min. Les tampons restent inchangés, soit du tampon Tris-HCl 50 mM à pH

8 pour l'équilibration, du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4 pour l'élution et une solution de NaOH à 0,5 M avec 0,5 M de NaCl pour le lavage. Le chromatogramme (non présenté) montre un premier pic correspondant à la fraction non retenue (PPA NR) sur la résine. Puis, l'élution est réalisée par diminution du pH. Un pic d'élution est observé, nommé PPA E. Les deux fractions obtenues : Non Retenue (PPA NR) et Elution (PPA E) sont ensuite analysées par gel SDS-PAGE (Figure 43).

3.2 Etape 2 : PPA NaCl

50 mL de l'échantillon PPA E, au préalable reconditionné dans le tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,25 M de NaCl, sont injectés avec un débit de 2,5 mL/min. Du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4 est utilisé comme tampon d'élution. Le chromatogramme (non présenté) montre un premier pic large, nommé PPA NaCl NR. Ce pic correspond aux protéines non-retenues sur la résine. Puis l'élution est réalisée, ce qui est identifiable par la baisse du pH à 4. Un deuxième pic, nommé PPA NaCl E, est alors observable avec une plus grande absorbance. La fraction PPA NaCl NR est concentrée grâce à un filtre à centrifuger (Amicon Ultra-15, 3 kDa). Les deux fractions sont ensuite analysées par gel SDS-PAGE (Figure 43).

3.3 Etape 3 : SEC

0,5 mL de la fraction PPA NaCl NR concentrée sont injectés sur la colonne d'exclusion stérique afin d'éliminer les protéines contaminantes restantes. Le chromatogramme (non présenté) montre trois pics, nommés SEC 1, SEC 2 et SEC 3. Ces trois fractions sont également analysées par gel SDS-PAGE (Figure 43).

3.4 Bilan

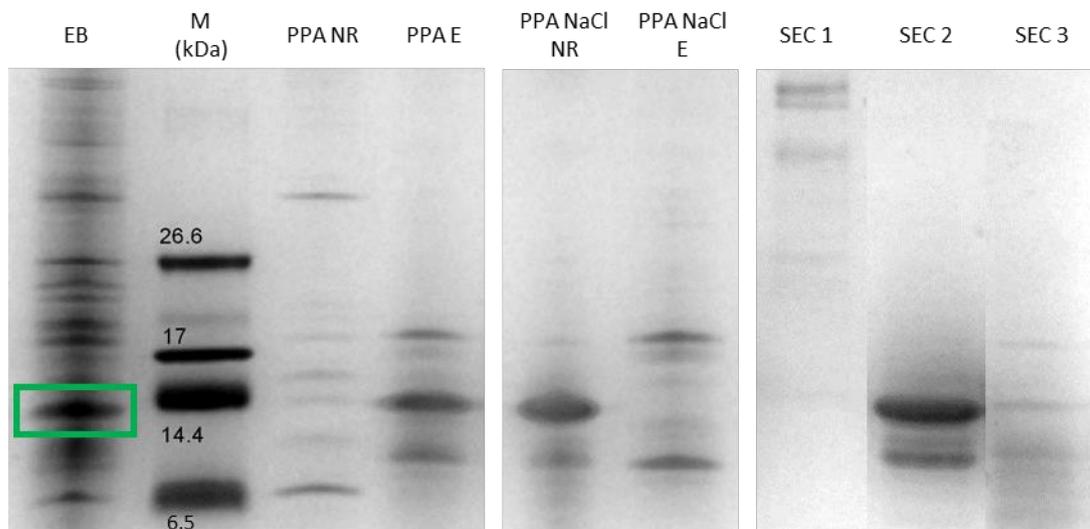


Figure 43 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions des trois étapes de purification suite au scale up. (PPA NR et E : étape 1. PPA NaCl NR et E : étape 2. SEC 1, 2 et 3 : étape 3).

Pour l'étape 1, de nombreuses protéines ont été éliminées dans la fraction non retenue (PPA NR). La protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction d'élution (PPA E) avec principalement deux protéines contaminantes (Figure 43). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus à petite échelle.

Pour l'étape 2, la protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction non retenue (PPA NaCl NR), comme cela avait été observé à petite échelle. Cependant, dans cette fraction PPA NaCl NR, une bande à environ 10 kDa apparaît. La fraction d'élution (PPA NaCl E) présente quant à elle les deux protéines contaminantes comme observé précédemment. Par conséquent, cette étape 2 permet d'éliminer les deux protéines contaminantes (SD et PBI2). Toutefois, une protéine, qui n'était pas visible à petite échelle, apparaît, probablement du fait de l'augmentation des quantités protéiques purifiées.

Pour l'étape 3, dans la fraction SEC 1, les protéines de masses moléculaires élevées sont visibles. La protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction SEC 2 mais la bande contaminante à environ 10 kDa est toujours présente. Toutefois la bande Hsp12 est beaucoup plus intense, ce qui révèle que la quantité de protéine Hsp12 purifiée est augmentée. Cette protéine semble avoir des propriétés très proches de la protéine Hsp12 puisque malgré les 3 étapes de purification, elle est toujours présente. Une

immunodétection et une analyse de la bande par spectrométrie de masse sont réalisées pour identifier cette protéine (Figure 44).

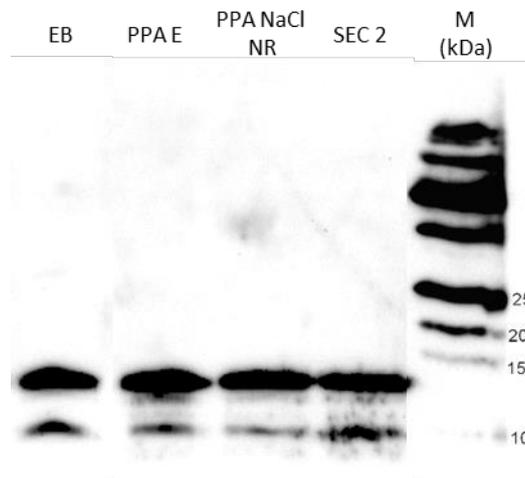
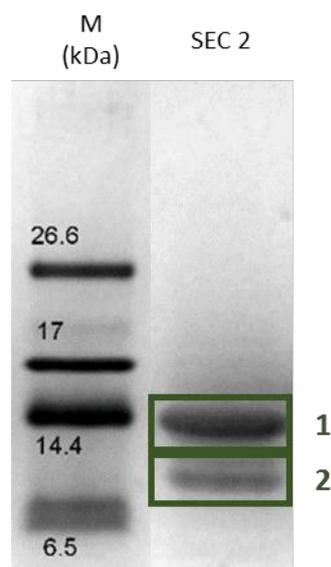


Figure 44 : Immunodétection de la protéine Hsp12 dans les fractions des trois étapes de purification.

L'immunodétection révèle que cette protéine est reconnue par les anticorps anti-Hsp12, ce qui suggère qu'il peut s'agir d'une forme tronquée de la protéine. Ceci est confirmé par l'analyse par spectrométrie de masse ESI-Orbitrap (Figure 45).



Bande	Recouvrement de séquence
1	MSDAGR K GFGEKASEALKPDSQKS Y AEQG K EYITDKADKVAGKVQ P EDNKGV F Q G VHDSA E K G KD N AE G Q G ESLADQARD Y M G AAK S KLND A VE Y VS G RVH G EED P TK K
2	MSDAGR K GFGEKASEALKPDSQKS Y AEQG K EYITDKADKVAGKVQ P EDNKGV F Q G VHDSA E K G KD N AE G Q G ESLADQARD Y M G AAK S KLND A VE Y VS G RVH G EED P TK K

Figure 45 : Séquences obtenues suite à l'analyse par spectrométrie de masse des deux bandes visibles sur gel SDS-PAGE.

(Les acides aminés représentés en bleu correspondent aux séquences identifiées par spectrométrie de masse)

L'analyse par spectrométrie de masse permet de mettre en évidence la séquence en acide aminé des protéines présentes dans chaque bande. Toutefois, ce type d'analyse fournit rarement une couverture totale de la séquence protéique. Les peptides peu ou pas ionisés ne sont pas détectés par l'analyse.

La bande 1 correspondant à la protéine Hsp12 intègre (cf. Chapitre 5 - 2. Spectrométrie de masse) montre une importante couverture de séquence. En effet, seulement 2 peptides ne sont pas détectés, probablement car ils ne sont pas ionisés (acides aminés en noir). Pour la bande 2, deux séquences ne sont pas identifiées en N-term et C-term. La capacité d'ionisation des peptides est la même dans les 2 analyses. Par conséquent, les résultats indiquent que la bande 2 correspond à une forme tronquée de la protéine Hsp12. Il semble que la protéine soit tronquée d'environ 36 acides aminés, l'équivalent d'environ 3 kDa.

Il apparaît que cette forme tronquée est présente dès le début de la purification dans l'extrait brut après lyse des levures (Figure 44). Cette forme tronquée reste minoritaire par rapport à la protéine Hsp12 entière. Toutefois, elle doit être éliminée ou du moins réduite au maximum pour que la caractérisation soit réalisée sur la forme entière de la protéine Hsp12.

3.5 Elimination de la protéine Hsp12 tronquée

3.5.1 Protéases et anti-protéases

L'observation de protéines tronquées est souvent associée à des protéases. Celles-ci sont notamment présentes naturellement chez la levure à l'intérieur des cellules. Il a été remarqué précédemment que la protéine tronquée était présente dès le début de la purification dans l'extrait brut (Figure 44), c'est-à-dire dès la lyse des levures. Lors de la lyse par sonication, il y a libération de la protéine Hsp12 mais également de tout le contenu cellulaire dont notamment des protéases. L'ajout d'inhibiteurs de protéases est donc envisagé. Il existe 4 types principaux de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les métallo-protéases et les protéases aspartiques. Pour chaque type de protéases, il existe des inhibiteurs spécifiques. Des inhibiteurs sont testés uniquement pour les trois premiers types de protéases. En effet, les protéases aspartiques sont actives à pH acide et la lyse des levures est effectuée dans un tampon à pH 8. Le cocktail d'inhibiteur de protéase cOmplete™ (Roche) qui est un mélange d'inhibiteurs dirigés contre les protéases à sérine et cystéine ; et l'EDTA (10 mM) qui inhibe les métallo-protéases par séquestration des ions métalliques, sont testés. Ces anti-protéases sont ajoutés avec le tampon de lyse aux levures. Après sonication et chauffage, les extraits protéiques (EP) pour chaque condition : contrôle (sans anti-protéases), cOmplete et EDTA sont analysés par immunodétection (Figure 46).

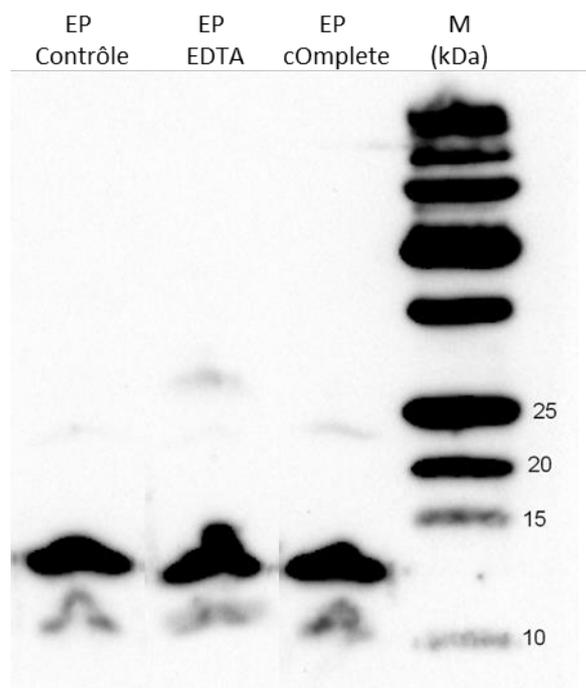


Figure 46 : Immunodétection de la protéine Hsp12 dans les extraits protéiques obtenus avec et sans anti-protéases.

Le même profil est observé en absence ou en présence des inhibiteurs de protéases. Par conséquent, les inhibiteurs de protéases n'ont pas permis d'éviter la protéolyse de la protéine Hsp12. Il se pourrait donc que la protéolyse ait lieu avant même la lyse par sonication. Il est donc envisagé d'éliminer la protéine tronquée au cours d'une étape de purification.

3.5.2 Protocole de purification

Pour séparer la protéine tronquée de la protéine entière lors de la purification il faut des différences physicochimiques suffisantes. Cependant, les protéines entière et tronquée ont des propriétés très proches (Tableau VII).

Tableau VII : Propriétés physico-chimiques de la protéine Hsp12 entière et tronquée.

	Hsp12	Hsp12 tronquée
Point isoélectrique	5,2	5,1
GRAVY	-1,21	-1,27
Masse moléculaire	12 kDa	9 kDa

La différence de point isoélectrique peut être exploitée pour les séparer lors de l'étape 1, en modifiant les pH d'équilibration et d'élution. Le GRAVY peut être utilisée pour les séparer lors de l'étape 2 en modifier la concentration en NaCl lors de l'équilibration. Enfin, la différence de taille peut être exploitée pour les séparer lors de l'étape 3 par chromatographie d'exclusion stérique. Différents essais sont réalisés à chaque étape (Figure 47).



Figure 47 : Récapitulatif des essais réalisés pour séparer la protéine Hsp12 et la protéine tronquée.

A l'étape 1, plusieurs essais ont été réalisés (données non présentées) mais les protéines n'ont pas pu être séparées. Les points isoélectriques sont probablement trop proches pour permettre leur séparation. A l'étape 2, la modification de la concentration en NaCl lors de l'équilibration a permis la séparation des 2 protéines. La mise au point est détaillée par la suite. A l'étape 3, différentes résines de chromatographie d'exclusion stérique sont testées mais leur résolution n'est pas suffisante pour permettre la séparation des 2 protéines.

Lors du développement de l'étape 2 du procédé à petite échelle, le tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,25 M de NaCl a été sélectionné. L'impact de concentrations en NaCl comprises entre 0,1 M et 0,25 M n'a pas été testé. Quatre concentrations intermédiaires en NaCl sont ainsi testées pour l'élution. 10 mL d'échantillon PPA E sont injectés sur une colonne de 1 mL de résine PPA. Le tampon d'équilibration utilisé est du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8. Puis l'élution est réalisée en cinq étapes. Tout d'abord, quatre étapes sont réalisées avec des concentrations en NaCl croissantes grâce à un mélange du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,25 M de NaCl. Une élution en palier est réalisée avec les concentrations en NaCl suivantes : 0,09 M ; 0,14 M ; 0,18 M et 0,25 M. Enfin la cinquième étape d'élution consiste à utiliser du tampon sodium-citrate 25 mM à pH 4. Le chromatogramme obtenu est le suivant (Figure 48).

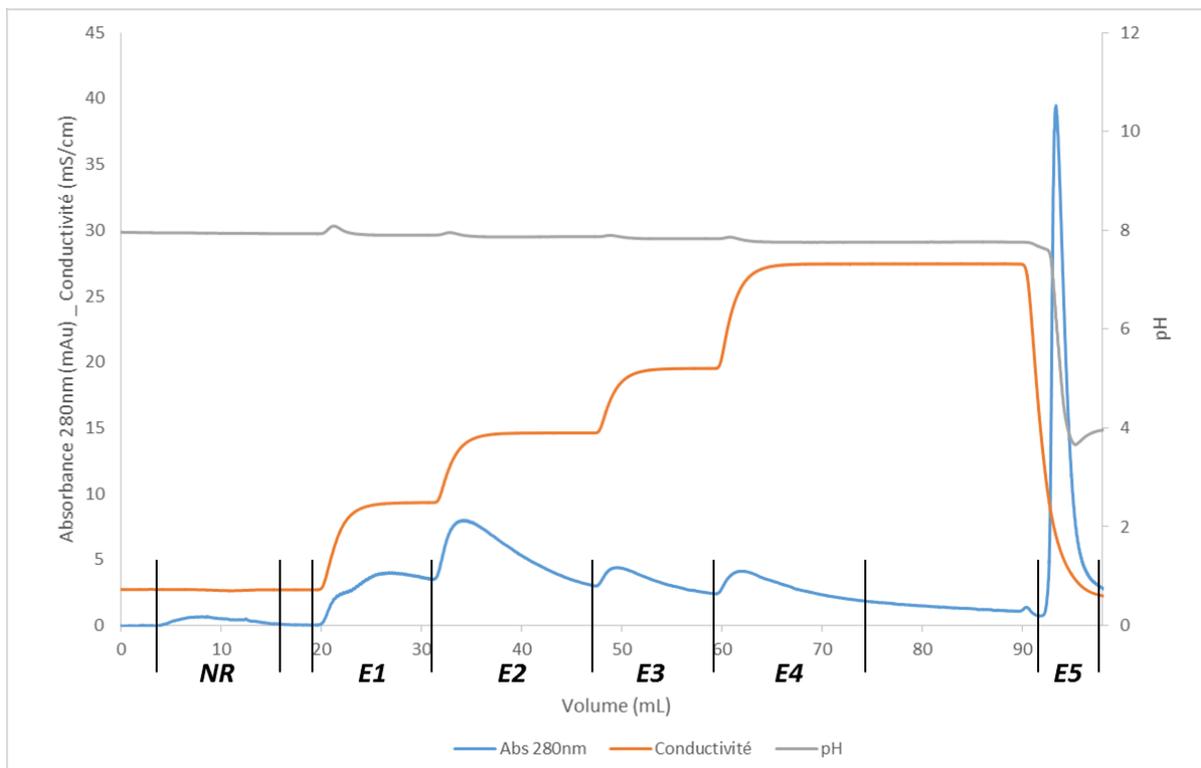


Figure 48 : Chromatogramme obtenus lors de l'étape 2 avec 5 étapes d'élution.

La conductivité augmente progressivement au travers de quatre paliers, traduisant l'augmentation de la concentration en NaCl. A Chaque palier, une fraction est récoltée. Six fractions sont ainsi obtenues et analysées par gel SDS-PAGE (Figure 49).

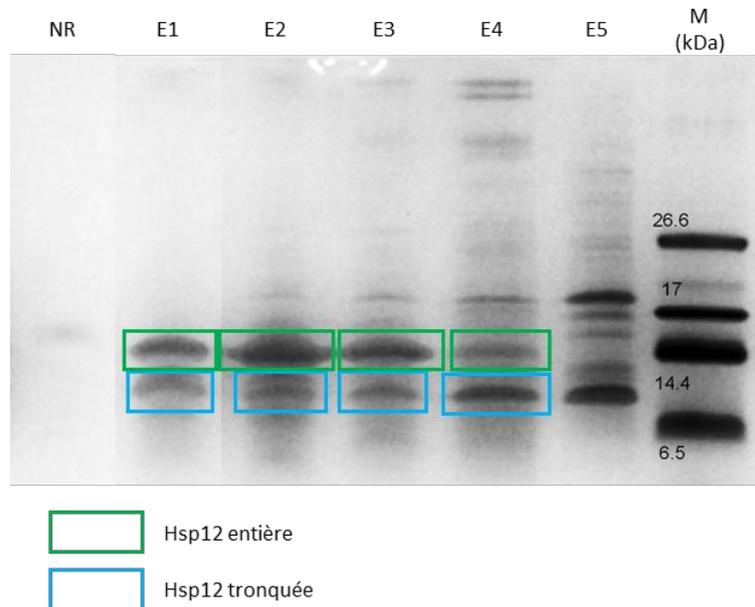


Figure 49 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions obtenues lors de l'étape 2 avec les 5 étapes d'élution.

Dans les fractions E1, E2 et E3, la protéine Hsp12 entière est présente majoritairement avec la protéine tronquée. Dans la fraction E4, la protéine tronquée est majoritaire par rapport à la protéine entière. De plus, de nombreuses protéines contaminantes avec des masses moléculaires élevées sont éluées dans cette fraction. Enfin dans la fraction E5, les protéines SD et PBI2 sont retrouvées lors de l'élution à pH 4, comme observé précédemment. Il faut donc conserver fractions E1, E2 et E3 puisque la majorité de la protéine Hsp12 entière est récupérée avec une petite quantité de protéine tronquée. Le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,18 M de NaCl a ainsi été sélectionné pour un nouvel essai.

Cette nouvelle condition de purification pour l'étape 2 est donc évaluée en injectant 50 mL d'échantillon PPA E reconditionné sur une colonne contenant 5 mL de résine. Le tampon d'équilibration Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,18 M de NaCl et le tampon d'élution sodium-citrate 25 mM à pH 4 sont utilisés (Figure 50).

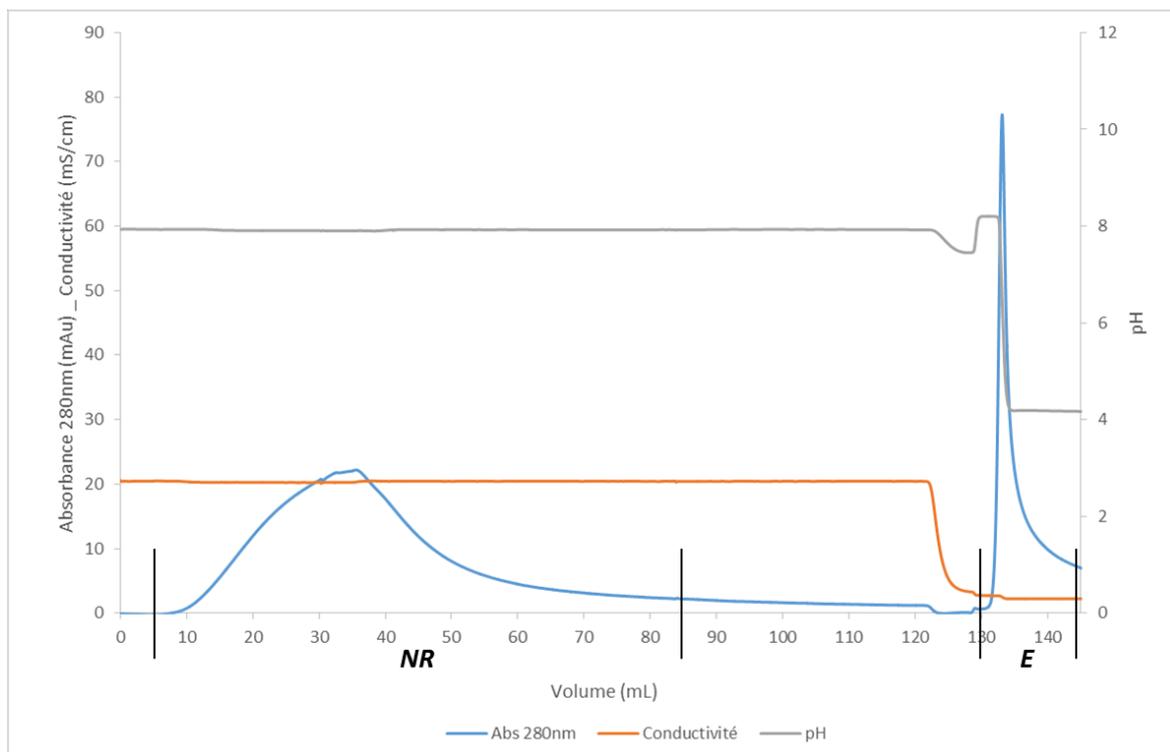


Figure 50 : Chromatogramme obtenu pour l'étape 2 avec le tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,18 M de NaCl.

La fraction PPA NaCl NR est concentrée grâce à des filtres à centrifuger (Amicon Ultra-15, 3 kDa) et utilisée pour l'étape 3 de purification (SEC). Les fractions obtenues lors des étapes 2 et 3 sont analysées par gel SDS-PAGE (Figure 51).

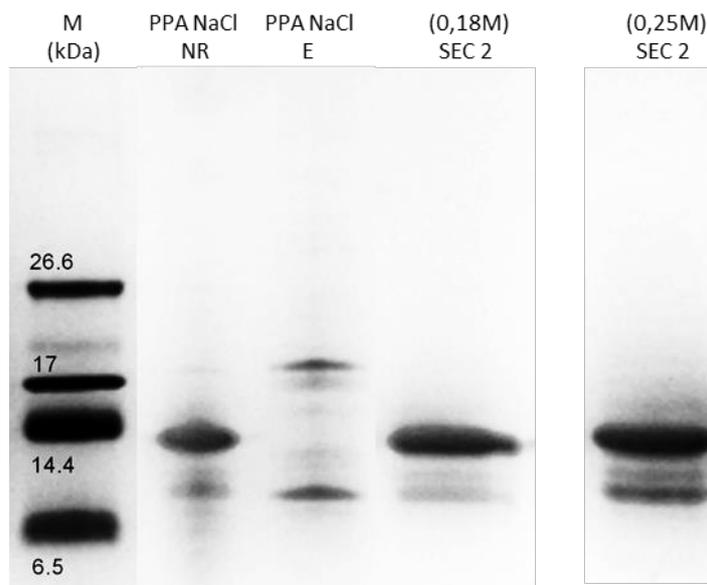


Figure 51 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions obtenues lors de l'étape 2 et 3. (PPA NaCl NR et E : étape 2. SEC 2 : étape 3)

Suite à la modification de l'étape 2, la protéine Hsp12 entière est retrouvée en totalité dans la fraction PPA NaCl NR, séparée des protéines SD et PBI2 (PPA NaCl E). Cela confirme que la modification de la concentration en NaCl n'a pas d'influence sur la séparation des protéines contaminantes SD et PBI2. Concernant l'étape 3, uniquement la fraction SEC 2 est analysée. Dans cette fraction (0,18M SEC 2) la protéine Hsp12 est majoritaire. A dépôt équivalent, la bande correspondant à la protéine tronquée est moins intense, comparée à la purification avec 0,25 M de NaCl lors de l'étape 2 (0,25M SEC 2).

La diminution de la concentration en NaCl lors de l'équilibration de l'étape 2 a donc permis de diminuer l'intensité de la bande correspondant à la protéine Hsp12 tronquée. Il est toutefois nécessaire de la réduire de façon plus importante.

3.5.3 Conditions de culture

L'essai avec les anti-protéases a montré que la protéine tronquée est présente avant la lyse des levures. Il est donc probable que la protéolyse ait lieu dans les cellules pendant la culture. Afin d'étudier l'impact du temps de culture sur la protéolyse de la protéine Hsp12, plusieurs prélèvements de culture ont été réalisés à des temps différents : après 17h, 19h, 21h, 22h et 24h de culture. Les levures prélevées sont lysées et chauffées afin d'obtenir un extrait protéique pour chaque prélèvement. Les extraits protéiques sont analysés par immunodétection (Figure 52).

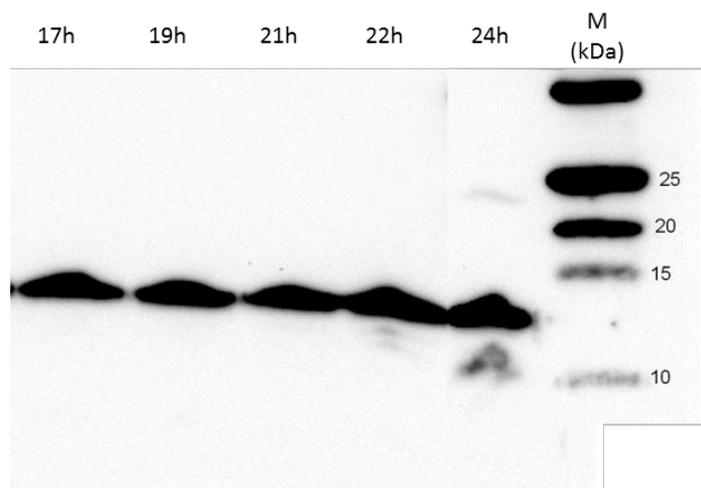


Figure 52 : Immunodétection de la protéine Hsp12 dans les extraits bruts obtenus après différents temps de culture.

La protéine tronquée est visible au cours de la culture aux alentours de 22h. Puis, l'intensité de la bande augmente à 24h. Il semble donc pertinent de réduire le temps de culture à 21h pour limiter l'apparition de la protéine tronquée.

Au travers de cette analyse, il apparaît que la purification est étroitement liée à la culture. La modification des paramètres de culture peut avoir une incidence importante sur l'échantillon à purifier. Il faut donc avoir à l'esprit cette relation lors du développement de la purification de protéines (Hennicke *et al.*, 2019).

3.5.4 Implémentation des nouvelles conditions

Les nouvelles conditions identifiées : utilisation d'un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 avec 0,18 M de NaCl lors de l'étape 2 et durée de culture de 21h ; ont été implémentées afin de vérifier la diminution, voir la disparition, de la protéine tronquée.

Pour rappel, les conditions de purification avec 5 mL de résine PPA sont les suivantes (Tableau VIII).

Tableau VIII : Récapitulatif des conditions de purification avec 5 mL de résine PPA

Etape	Résine	Volume d'injection	Débit	Tampon d'équilibration	Tampon d'élution	Fraction contenant Hsp12
1	PPA (mode mixte)	7 mL	2,5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA E
2	PPA (mode mixte)	50 mL	2,5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8 0,18 M NaCl	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA NaCl NR
3	Superdex 75 pg (SEC)	5 mL	1 mL/min	Sodium- phosphate 50 mM pH 7,2	-	SEC 2

Les fractions présentant la protéine Hsp12 sont analysées par gel SDS-PAGE (Figure 53).

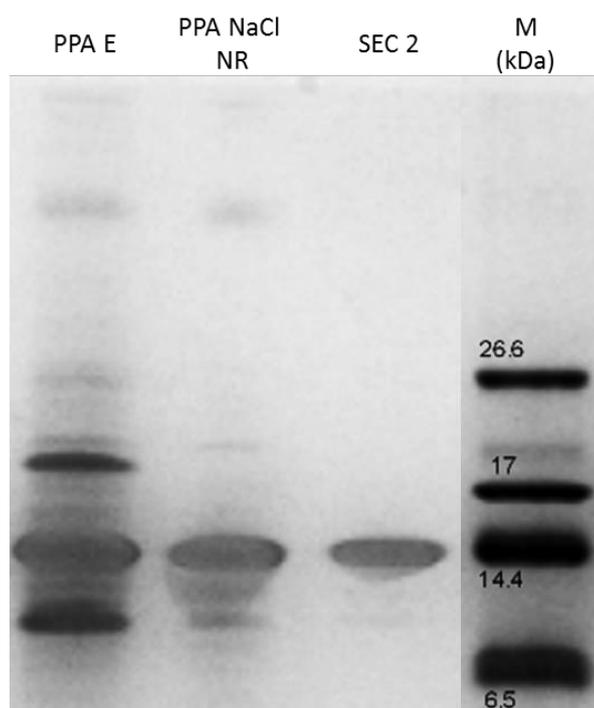


Figure 53 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions contenant Hsp12 pour les trois étapes de purification.

Le profil des échantillons est cohérent avec les expériences précédentes. Dans la fraction SEC 2, la bande correspondant à la protéine tronquée n'est quasiment plus visible.

Une fois le protocole établi avec 5 mL de résine PPA, une nouvelle augmentation d'échelle est réalisée. Le protocole est évalué sur des colonnes contenant 10 mL de résine PPA, afin d'obtenir de plus grande quantité de protéine Hsp12 pour la caractérisation. C'est le même principe que détaillé précédemment, le temps de résidence de 2 min est conservé. Ainsi avec 10 mL de résine, le débit appliqué sera de 5 mL/min et le volume d'échantillon sera augmenté d'un facteur deux.

4 Chromatographie préparative

Les conditions de purification avec 10 mL de résine PPA sont les suivantes (Tableau IX).

Tableau IX : Récapitulatif des conditions de purification avec 10 mL de résine PPA

Etape	Résine	Volume d'injection	Débit	Tampon d'équilibration	Tampon d'élution	Fraction contenant Hsp12
1	PPA (mode mixte)	15 mL	5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA E
2	PPA (mode mixte)	100 mL	5 mL/min	Tris-HCl 50 mM pH 8 0,18 M NaCl	Sodium-citrate 25 mM à pH 4	PPA NaCl NR
3	Superdex 75 (SEC)	5 mL	1 mL/min	Sodium-phosphate 50 mM pH 7,2	-	SEC 2

Les chromatogrammes (non présentés) montrent les mêmes profils qu'avec 5 mL de résine PPA à la différence de l'aire des pics qui est multipliée par deux, due à l'injection d'échantillon deux fois plus importante. Les fractions obtenues sont analysées par gel SDS-PAGE (Figure 54).

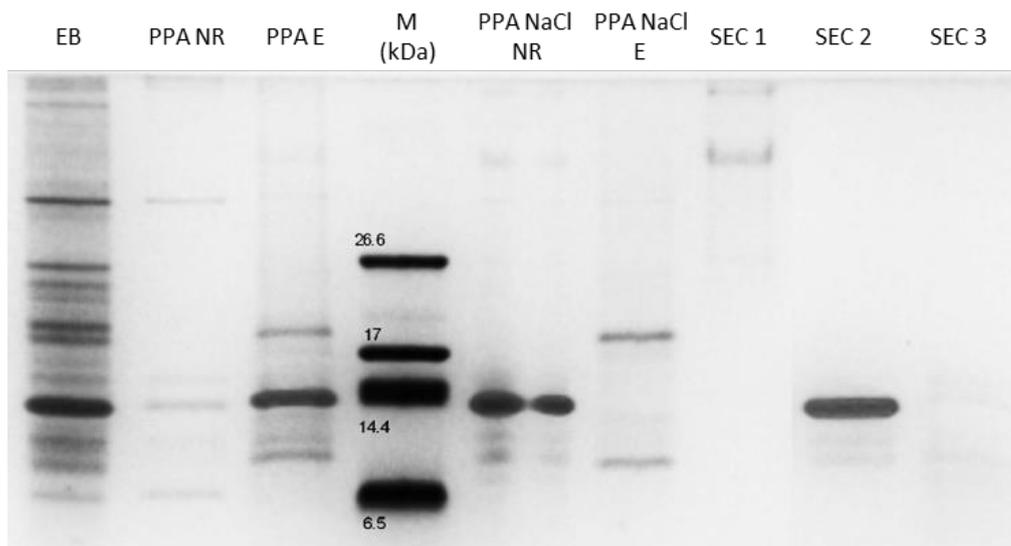


Figure 54 : Gel SDS-PAGE analysant les fractions des trois étapes de purification avec 10 mL de résine PPA.

Les profils sont similaires avec la purification utilisant 5 mL de résine. La protéine tronquée reste très faible par rapport à la protéine Hsp12 entière (2% d'après la densitométrie sur le gel SDS-PAGE). Le protocole de purification est donc validé à cette échelle. La protéine Hsp12 a été dosée dans les fractions de purification grâce à un dosage ELISA (Tableau X).

Tableau X : Quantités d'Hsp12 dans les fractions de purification, obtenues par dosage ELISA.

Fraction	Volume (mL)	[Hsp12] (µg/mL)	Quantité d'Hsp12 (mg)	Rendement global	Rendement / étape
Extrait brut	15	773,3	11,6	100%	
Etape 1 (PPA E)	26	269,0	7,1	61%	61%
Etape 2 (PPA NaCl NR)	5	1397,9	7,0	60%	98%
Etape 3 (SEC 2)	13,3	430,4	5,7	49%	82%

Le rendement de la première étape est assez faible (61%), due à une perte d'une partie de la protéine Hsp12 dans la fraction non retenue (PPA NR). Cela est en partie dû au déplacement partiel de la protéine Hsp12 par des contaminants de l'extrait brut (EB). Ces contaminants entrent en compétition avec la protéine Hsp12 et ont probablement une meilleure affinité pour la résine que la protéine Hsp12. Ils vont donc se lier préférentiellement à la résine. C'est pour ça qu'une partie (environ 1/3) de la protéine Hsp12 est retrouvée dans la fraction non retenue. Pour rappel, la résine PPA HyperCel a été choisie pour éviter le déplacement total de la protéine Hsp12 observé avec la résine Capto Q. Lors de l'étape 2, le rendement est optimal (98%), il y a donc très peu de perte de la protéine Hsp12. Enfin lors de l'étape 3, le rendement est correct (82%). Une partie de la protéine Hsp12 est perdue dans les fractions contiguës. Cela est dû au manque de résolution entre les pics lors de la séparation. L'amélioration de la pureté se fait au détriment du rendement.

Ce protocole de purification permet de purifier en une seule fois la production d'un bioréacteur de 2,5 L de culture et ainsi d'obtenir environ 6 mg de protéine Hsp12 pure, soit 2,4 mg d'Hsp12 pure par litre de culture (0,28 mg/g de levure). Le rendement final est donc de 49%. La priorité lors du développement de ce protocole de purification est d'obtenir une pureté élevée afin de permettre la caractérisation de la protéine Hsp12. La pureté est ainsi évaluée grâce à différentes techniques.

5 Evaluation de la pureté

5.1 SDS-PAGE/densitométrie

Une première évaluation de la pureté par densitométrie a été faite sur le gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomassie réalisé pour la chromatographie préparative (Figure 54). Les puretés obtenues sont présentées dans le Tableau XI.

Tableau XI : Valeurs de pureté obtenues pour chaque échantillon déposé sur gel SDS-PAGE.

Etape	Fraction	Pureté
-	EB	17%
1	PPA E	39%
2	PPA NaCl NR C	60%
3	SEC 2	97%

La pureté initialement de 17% dans l'extrait brut augmente au fur à mesure des étapes pour atteindre une valeur de 97% après les trois étapes de purification. La pureté finale est donc très élevée.

5.2 UPLC

Afin de confirmer la pureté, une seconde technique est utilisée. La fraction SEC 2 est analysée par SEC-UPLC, une chromatographie d'exclusion stérique analytique (Figure 55).

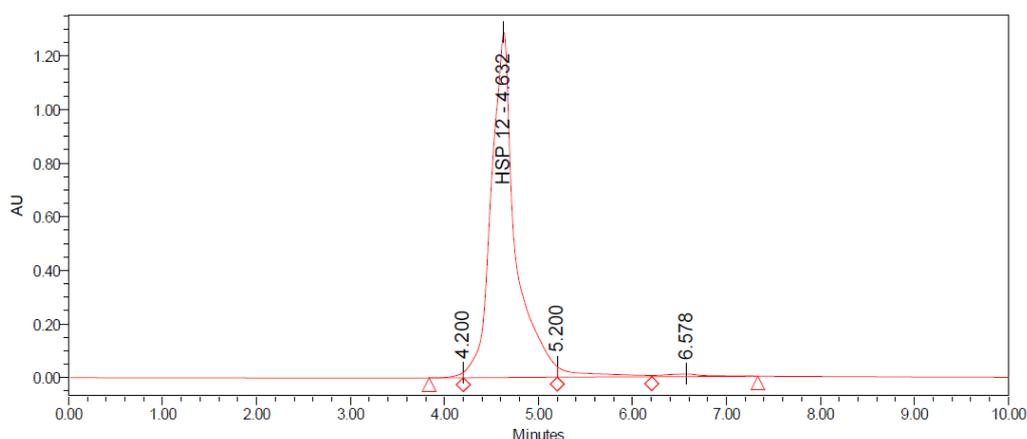


Figure 55 : Chromatogramme obtenu pour la fraction 2 analysée par SEC-UPLC.

L'absorbance à 280 nm montre un pic majoritaire à 4,6 min correspondant à la protéine Hsp12. La pureté est calculée comme l'aire du pic Hsp12 par rapport à l'aire totale des pics obtenus. Une pureté de 95% est ainsi obtenue. Cette valeur est légèrement inférieure à celle obtenue précédemment. La protéine Hsp12 absorbe très peu à 280 nm ($\epsilon = 5960 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sa quantité est donc sous-estimée par rapport aux éventuelles protéines contaminantes présentes. La pureté peut ainsi être sous-estimée.

5.3 ELISA – BCA

Afin d'obtenir des valeurs plus précises, un dosage BCA (Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit) a été réalisé pour obtenir la quantité de protéines totales. Cette valeur est comparé à la quantité de protéine Hsp12 obtenue par dosage ELISA, afin d'avoir la pureté de chaque échantillon (Tableau XII).

Tableau XII : Valeurs de pureté obtenus par dosage ELISA et BCA.

Etape	Fraction	Quantité protéines totales (mg)	Quantité Hsp12 (mg)	Pureté
-	EB	123,3	11,6	10%
1	PPA E	22,2	7,1	31%
2	PPA NaCl NR C	11,2	7,0	62%
3	SEC 2	5,8	5,7	99%

Les valeurs de pureté obtenues sont similaires à celles observées précédemment. A la fin du procédé de purification, une pureté de 99% est obtenue. Ce haut niveau de pureté était requis pour envisager la caractérisation de la protéine Hsp12.

6 Conclusion

Un procédé de purification a été développé en 3 étapes afin d'obtenir la protéine Hsp12 pure.

Pour la première étape, la résine en mode mixte PPA HyperCel a été sélectionnée et a permis l'élimination de nombreux contaminants. Pour la deuxième étape, le choix de la résine a été fait de manière rationnelle. Les 2 contaminants majoritaires observés à la fin de la première étape ont été analysés par spectrométrie de masse. Leur caractéristiques ont permis de sélectionner à nouveau la résine PPA HyperCel du fait de son importante hydrophobicité. Cependant, lors du changement d'échelle, un contaminant est apparu : la protéine Hsp12 tronquée. La modification du tampon d'équilibration lors de l'étape 2 ainsi que de la durée de la culture ont permis d'éliminer la protéine tronquée. Pour la troisième étape, une chromatographie d'exclusion stérique a permis d'éliminer les derniers contaminants présents.

Une pureté de 99% est obtenue pour la protéine Hsp12 native, suite à 3 étapes de purification. La purification de la protéine native était un défi car elle n'est pas surexprimée par rapport aux autres protéines de levure et ne possède pas de caractéristiques permettant de la purifier spécifiquement par chromatographie d'affinité. Ce défi a été relevé à l'aide de seulement 3 étapes, qui ont permis d'obtenir une pureté très élevée. Ce haut niveau de pureté était requis pour envisager la caractérisation physico-chimique et organoleptique de la protéine Hsp12.

Chapitre 5.

Caractérisation

Chapitre 5. Caractérisation

Partie I. Caractérisation structurale

1 Introduction

L'analyse de la structure de la protéine Hsp12 recombinante a fait l'objet de plusieurs études. L'absence de structures secondaires en solution aqueuse a été mise en évidence par des analyses en dichroïsme circulaire. En revanche, en présence de SDS et de certains phospholipides, la protéine acquiert des structures secondaires sous forme d'hélices α (Welker *et al.*, 2010; Singarapu *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2018), suggérant un rôle possible en lien avec la membrane des levures. Plusieurs phospholipides ont été testés et il apparaît que la protéine Hsp12 se structure uniquement avec des phospholipides possédant une charge négative (les dérivés du phosphatidylglycérol et du phosphatidylinositol). Ces résultats obtenus par dichroïsme circulaire ont également été confirmés par RMN (Singarapu *et al.*, 2011). La protéine Hsp12 a donc un comportement particulier, typique du groupe des protéines intrinsèquement non ordonnées (intrinsically disordered protein – IDP). De plus, la protéine Hsp12 présente d'autres caractéristiques spécifiques aux protéines IDP, comme le fort caractère hydrophile, la grande quantité de résidus chargés (37%), la petite quantité de résidus hydrophobes (17%) et la résistance aux températures élevées (Mtwisha *et al.*, 1998).

Au vu de ces caractéristiques, il a été admis que la protéine Hsp12 rentre dans la classification des protéines IDP et que cette structure particulière est probablement en lien avec sa fonction physiologique chez la levure. Toutefois, les analyses structurales ont été réalisées avec la protéine Hsp12 recombinante, il est donc intéressant de confirmer ces résultats avec la protéine Hsp12 native. Une analyse approfondie de la structure de la protéine Hsp12 native est donc réalisée afin de confirmer que la protéine Hsp12 est une protéine IDP et afin de comprendre son rôle chez la levure.

2 Spectrométrie de masse

La protéine Hsp12 native purifiée est analysée par spectrométrie de masse afin de vérifier son intégrité. L'ionisation par électronébuliseur (ESI) est utilisée pour mesurer la masse moyenne de la protéine. Le spectre déconvolué est montré ci-dessous (Figure 56).

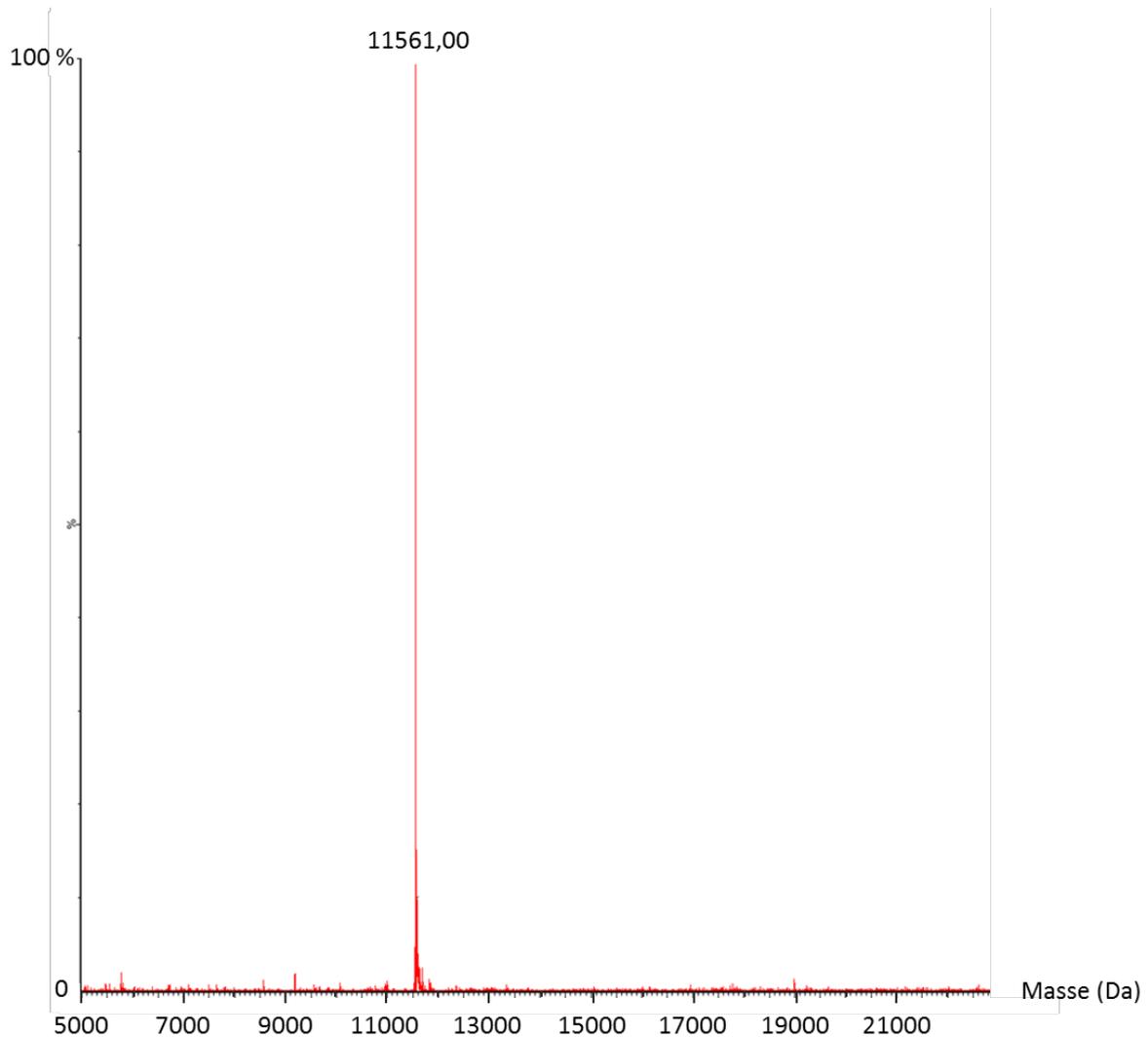


Figure 56 : Spectre déconvolué de la protéine Hsp12, après analyse par spectrométrie de masse ESI.

Cette analyse montre la présence d'un seul pic majoritaire à une masse de 11561,0 Da. Cette masse correspond exactement à la masse de la protéine Hsp12 calculée à partir de sa séquence en acides aminés sans la méthionine N-terminale. Tous les organismes initient la traduction des protéines par une méthionine, qui est ensuite excisée sur 2/3 des protéines (Nguyen *et al.*, 2019). L'intégrité de la protéine Hsp12 purifiée est donc validée.

3 Stabilité thermique

Les protéines IDP sont caractérisées par une stabilité à des températures élevées. Afin de déterminer la stabilité de la protéine Hsp12, un traitement à haute température est réalisé sur la protéine Hsp12 et la BSA (Bovine Serum Albumin), utilisée comme contrôle. Après un chauffage à 100°C pendant 10 min, les solutions de protéines sont centrifugées et analysées par gel SDS-PAGE (Figure 57).

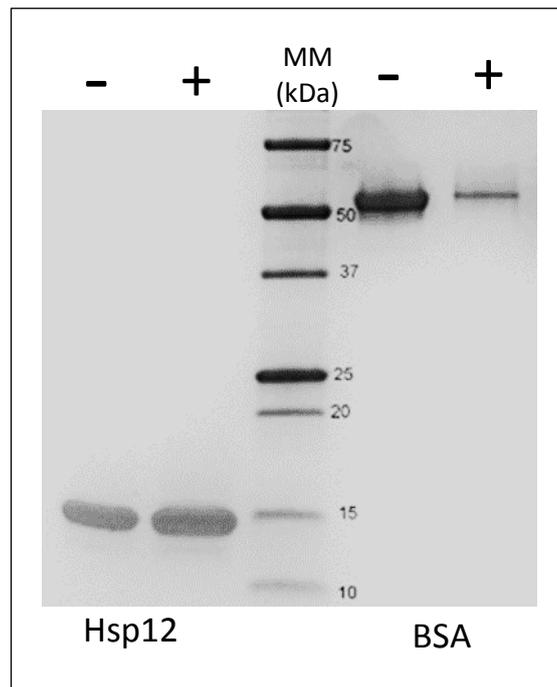


Figure 57 : Stabilité thermique de la protéine Hsp12 et de la BSA

Après chauffage, la bande de BSA (environ 60 kDa) est fortement diminuée. Le chauffage entraîne la dénaturation de la BSA. En effet, l'exposition des régions hydrophobes auparavant enfouies entraîne l'agrégation et la précipitation des protéines. A l'inverse, pour la protéine Hsp12 il n'y a pas de différence entre les pistes avant et après chauffage. La protéine Hsp12 ne s'agrège pas suite à un traitement thermique à 80°C. Ceci est caractéristique des protéines IDP (Weinreb *et al.*, 1996; Szollosi *et al.*, 2008). Les protéines IDP étant non conformées, elles ne sont pas dénaturées et présentent ainsi une stabilité thermique.

4 Détermination de la masse moléculaire par SEC

La chromatographie d'exclusion stérique est une méthode de séparation de molécules basée sur leur encombrement stérique. Grâce à une calibration utilisant des protéines standards, il est possible d'obtenir la masse moléculaire apparente d'une protéine en fonction de son volume de rétention. La protéine Hsp12 pure est ainsi analysée par chromatographie d'exclusion stérique grâce à un automate UPLC (Figure 58).

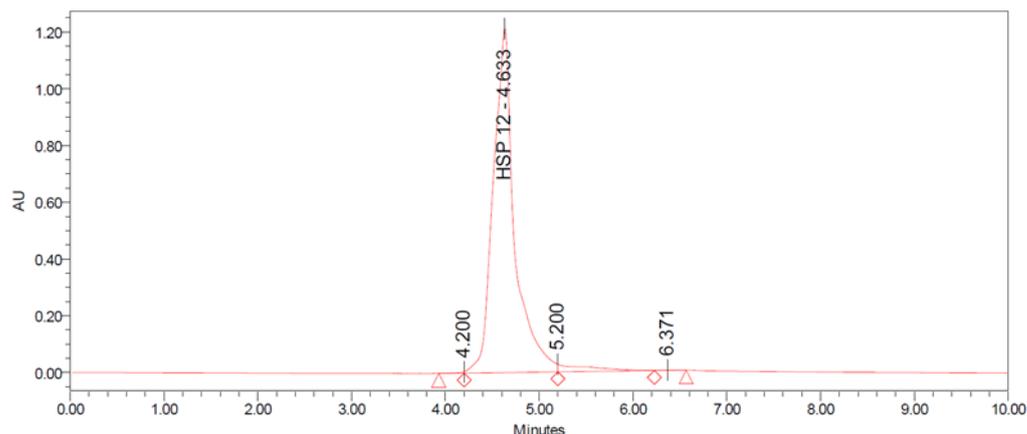


Figure 58 : Chromatogramme de la protéine Hsp12 pure, obtenu par SEC-UPLC.

Le pic correspondant à la protéine Hsp12 possède un temps de rétention de 4,6 min. D'après une calibration réalisée avec plusieurs protéines standards, ce temps de rétention correspond à une masse moléculaire de 42 kDa. La masse moléculaire observée est donc largement supérieure à la masse théorique (12 kDa). Pour rappel, lorsque la protéine Hsp12 est analysée par gel SDS-PAGE, une bande est observée à environ 14 kDa (cf. Chapitre 4 - 4. Chromatographie préparative).

Au vu de ces résultats, 2 hypothèses peuvent être avancées :

1. La protéine Hsp12 est sous forme oligomérique et le SDS dénature les oligomères lors de l'électrophorèse.
2. La forme linéaire de la protéine Hsp12 lui confère un encombrement stérique supérieur à une protéine globulaire de 12 kDa.

Afin de vérifier s'il y a présence d'oligomères ou non, la protéine Hsp12 est analysée par réticulation chimique.

5 Réticulation chimique

Le principe de la réticulation chimique (ou cross-linking) est de lier deux ou plusieurs molécules par des liaisons covalentes en utilisant un agent de réticulation (cross-linker). Initialement, les expériences de réticulation ont été utilisées pour comprendre les interactions entre différentes protéines mais elles peuvent également être utilisées pour mettre en évidence la présence d'oligomères (Szollosi *et al.*, 2008; Tang and Bruce, 2009). Le glutaraldéhyde est ainsi utilisé pour lier de façon covalente les possibles oligomères de la protéine Hsp12. Le glutaraldéhyde est formé de 2 groupements carbonyles à chaque extrémité pouvant réagir avec des amines primaires. Cet agent va ainsi pouvoir créer des liaisons covalentes entre les lysines des protéines Hsp12 et fixer leur état d'oligomérisation. S'il y a des oligomères, le SDS ne sera ainsi plus capable de les dénaturer. Un contrôle positif est réalisé avec l'aldolase, du fait de sa forme tétramérique de 160 kDa. Les réactions sont menées avec 0,01% et 0,1% de glutaraldéhyde pendant 15min et 1h. Les échantillons sont analysés par gel SDS-PAGE (Figure 59).

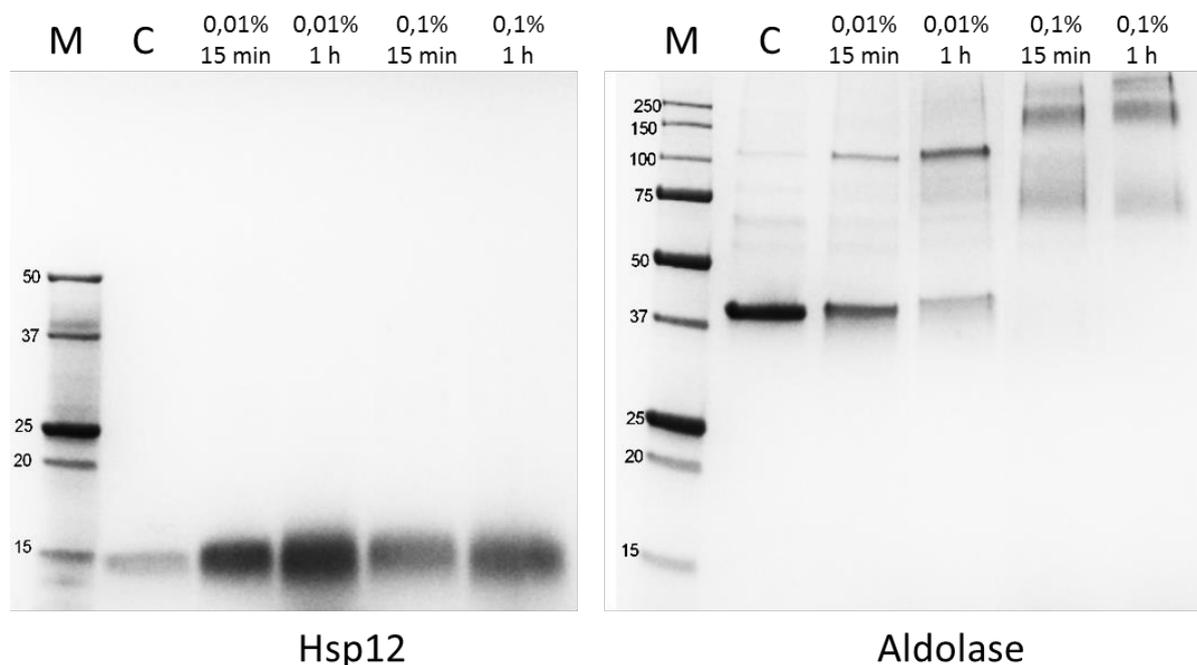


Figure 59 : Réticulation chimique de la protéine Hsp12 et de l'aldolase analysée par gel SDS-PAGE.

Avec la protéine Hsp12, une seule bande à environ 15 kDa est observée pour le contrôle sans glutaraldéhyde (C) et pour toutes les conditions de réticulation. A noter que la bande de la protéine Hsp12 est observée à une masse moléculaire plus élevée que la masse moléculaire réelle de la protéine, soit 12 kDa. Ceci est lié à la présence de nombreux acides aminés chargés dans la séquence de la protéine Hsp12 (Receveur-Bréhot *et al.*, 2006). Sa mobilité électrophorétique est donc particulière, ce qui est caractéristique des protéines IDP. Avec l'aldolase, une bande à environ 40 kDa est observée sans agent de réticulation, correspondant au monomère. Avec 0,01% de glutaraldéhyde, un mélange de monomère et de dimère est observé. Avec 0,1%, la forme tétramérique est observée. Cette technique permet donc de mettre en évidence des formes oligomériques de protéines. Par conséquent, pour la protéine Hsp12, il n'y a pas d'oligomères mais uniquement des monomères. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un autre agent de réticulation : le DSS (disuccinimidyl suberate). Aucun oligomère n'a été observé avec cet agent (données non présentées). Ces résultats prouvent donc que la protéine Hsp12 est sous forme monomérique en solution.

La masse moléculaire obtenue en SEC est donc bien due à la forme linéaire de la protéine Hsp12. Ceci lui confère un encombrement stérique équivalent à une protéine globulaire de 40 kDa. Ce comportement est caractéristique des protéines IDP, caractérisées par l'absence de structure et donc une forme linéaire. Afin de confirmer l'absence de structure en solution aqueuse de la protéine Hsp12 native, des études de dichroïsme circulaire sont réalisées.

6 Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (circular dichroism – CD) repose sur la capacité des structures optiquement actives à absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. La liaison peptidique est une structure optiquement active qui absorbe différemment les lumières polarisées à droite et à gauche entre 190 et 250 nm. En fonction des orientations des liaisons peptidiques de la protéine, le spectre de CD adopte un profil particulier propre à chaque structure secondaire. La structuration de la protéine Hsp12 a été évaluée en présence de différents composés : le SDS ainsi que différents liposomes.

6.1 Hsp12 et SDS

Le spectre de la protéine Hsp12 dans du tampon sodium-phosphate 10 mM à pH 7,2 est enregistré ainsi que le spectre en présence de 0,1% de SDS (Figure 60).

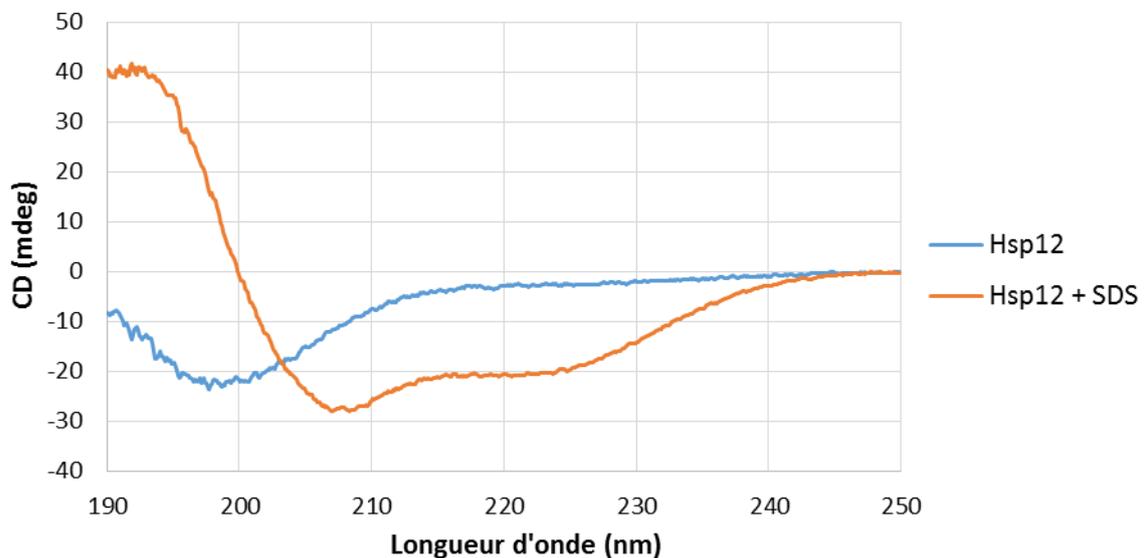


Figure 60 : Spectre de dichroïsme circulaire obtenu pour la protéine Hsp12 en solution aqueuse seule et avec 0,1% de SDS.

Pour la protéine Hsp12 en solution aqueuse, le spectre montre un pic négatif à environ 198 nm. Cette courbe est spécifique d'une structure désorganisée, sans éléments de

structure secondaire, dite « random coil ». La protéine semble donc non structurée en solution aqueuse. En présence de SDS, une courbe différente est observée avec un pic négatif à environ 208 nm et un épaulement entre 215 nm et 230 nm. Cette courbe est spécifique de la présence d'une protéine structurée en hélices α . Il apparaît donc que la protéine Hsp12 se structure en présence de SDS sous forme d'hélices α . Ces résultats sont en accord avec les précédentes observations, ainsi que les données de la littérature (Welker *et al.*, 2010; Singarapu *et al.*, 2011). La protéine Hsp12 native peut donc être classée parmi les protéines IDP.

6.2 Hsp12 et liposomes

Dans la littérature, il a été montré que la protéine Hsp12 pouvait également se structurer en présence de certains phospholipides (Welker *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018). Ceci pourrait peut-être expliquer son rôle en lien avec la membrane plasmique des levures. Afin de vérifier cette hypothèse, des liposomes sont réalisés avec des phospholipides présents dans la membrane plasmique des levures afin de mimer les conditions physiologiques de la levure.

Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux (Lorin *et al.*, 2004), qui permettent de mimer une membrane, ici de levure. Les phospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol à laquelle sont liés deux acides gras et un phosphate, lui-même lié à un groupement polaire. La désignation des lipides dépend de la fonction polaire qui constitue la tête lipidique et des acides gras qui constituent la queue hydrophobe. Les phospholipides de la membrane de *S. cerevisiae* sont principalement des esters de la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et du phosphatidylinositol (PI). Des esters d'acide palmitique et d'acide oléique (PO) ont été sélectionnés car ce sont les acides gras les plus représentés chez la levure. Le POPC, le POPS et le PiP₂ ont été utilisés pour former des liposomes car ce sont des lipides facilement utilisables pour la formation de liposomes contrairement au POPE qui induit une courbure négative. Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des 3 phospholipides utilisés (Tableau XIII).

Tableau XIII : Caractéristiques des phospholipides utilisés pour former des liposomes.

Nom abrégé	Tête polaire	Charge	Structure
POPC	Choline	Zwitterion	
POPS	Sérine	Négative	
PiP ₂	Inositol-phosphates	Négative	

Plusieurs compositions de liposomes ont été réalisées : POPC seul, POPC-POPS (80:20) et POPC-PiP₂ (80:20) afin de mimer les proportions de chaque lipide chez la levure. Pour chaque composition, des SUVs (small unilamellar vesicles) ont été préparées. Le spectre de la protéine Hsp12 en présence des liposomes a ensuite été enregistré (Figure 61).

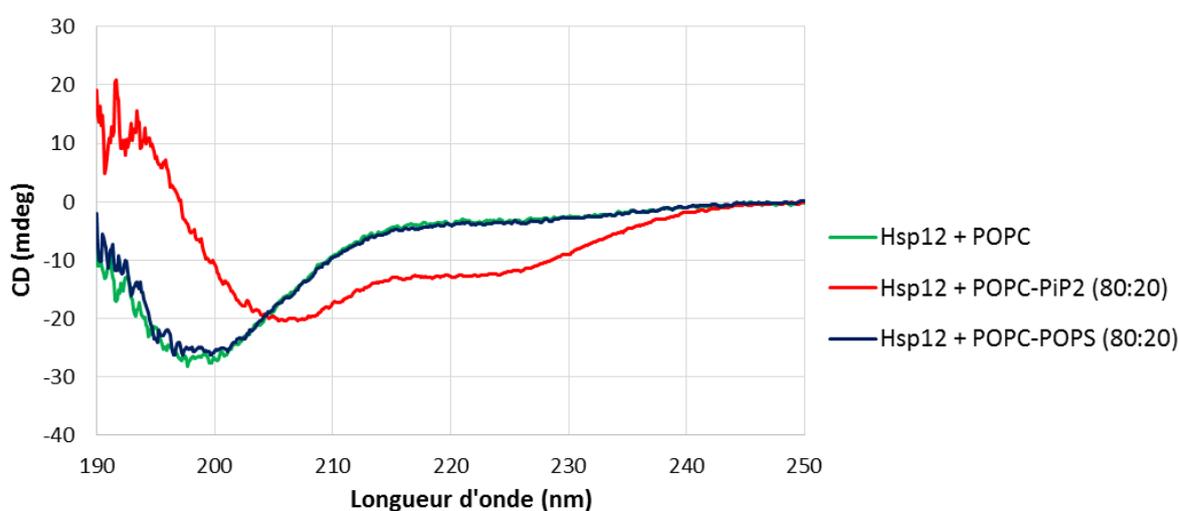


Figure 61 : Spectre de dichroïsme circulaire obtenu pour la protéine Hsp12 en présence de trois types de liposomes : POPC, POPC-PiP₂ (80:20) et POPC-POPS (80:20).

Le comportement de la protéine Hsp12 est différent selon les lipides utilisés. En présence de POPC et POPC-POPS, la courbe est caractéristique d'une structure désorganisée comme observée précédemment pour la protéine Hsp12 en solution aqueuse. Il semble donc que la protéine Hsp12 ne se structure pas en présence de ces lipides. En présence de POPC-PiP₂, la courbe est caractéristique de la présence d'hélices α . Il apparaît donc que la protéine Hsp12 se structure sous forme d'hélices α en présence de PiP₂.

Le POPC est zwitterionique avec une charge négative sur le groupement phosphate et une charge positive sur le groupement choline. Le POPS est quant à lui chargé globalement négativement mais il possède une charge positive. La présence de ces charges positives pourrait expliquer l'absence de structuration de la protéine Hsp12. Comme vu précédemment, le PiP₂ est un lipide chargé négativement, constitué d'une tête polaire et d'une queue hydrophobe, comme le SDS. De plus, le PiP₂ a la capacité de former de nombreuses liaisons hydrogènes du fait de la présence de plusieurs fonctions hydroxyles (OH). Les liaisons hydrogènes associées à la charge négative pourraient faciliter la structuration de la protéine Hsp12. *Welker et al* ont observé le même type de comportement en dichroïsme circulaire avec la protéine Hsp12 recombinante en présence de phosphatidylinositol (PI) ou de phosphatidylglycérol (PG) (*Welker et al.*, 2010). Ce dernier est un lipide chargé négativement qui possède également des groupements OH en surface, permettant la formation de liaisons hydrogènes. Néanmoins il est absent des membranes de la levure.

Le dichroïsme circulaire a ainsi permis de mettre en évidence que la protéine Hsp12 se structure sous forme d'hélices α en présence de SDS et de PiP₂. Cette structuration suggère une interaction entre la protéine Hsp12 et ces molécules. Afin de caractériser l'interaction de la protéine Hsp12 avec le PiP₂, des analyses par titration calorimétrique isotherme (ITC) sont menées.

7 ITC

La titration calorimétrique isotherme (Isothermal Titration Calorimetry - ITC) est une technique de calorimétrie utilisée pour caractériser l'interaction entre deux partenaires. Elle est notamment utilisée pour évaluer l'interaction entre des protéines et des lipides. Cette technique repose sur une mesure directe de la chaleur libérée ou absorbée au cours de la liaison entre des biomolécules. La quantité de chaleur mesurée est directement proportionnelle au nombre de liaisons et permet donc de caractériser l'interaction (K_d). Une suspension de LUVs de POPC-PiP₂ (80:20) à 1,3 mM est déposée dans la cellule échantillon et 40 μ L de solution de protéine Hsp12 à 150 μ M sont prélevés avec la seringue. Les titrations sont effectuées en ajoutant 3 μ L de protéine Hsp12 toutes les 3 minutes pour permettre l'équilibre complet de la liaison (Figure 62A). L'analyse des données est réalisée en utilisant le logiciel Origin 7,0 MicroCal en appliquant le modèle de liaison "One set of sites" (interaction 1:1) (Figure 62B).

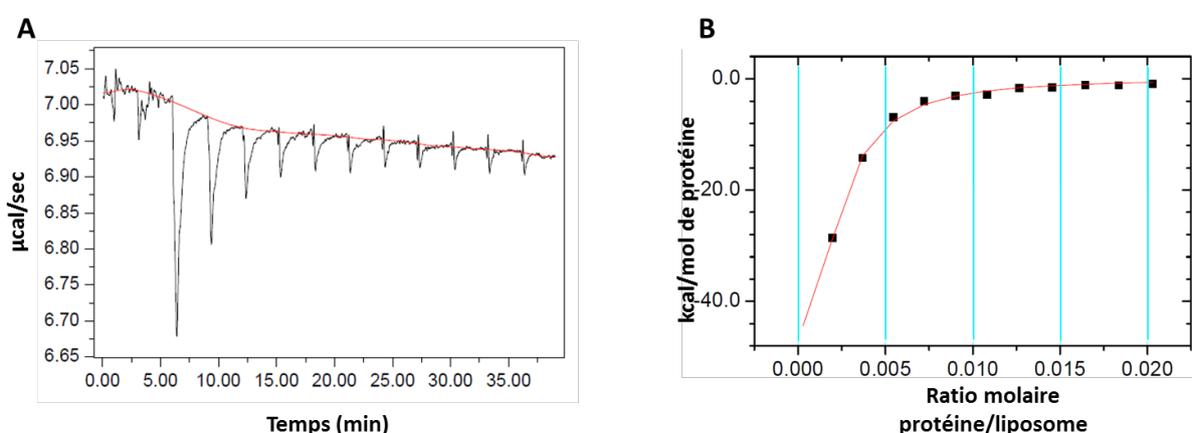


Figure 62 : Résultats de la titration calorimétrique isotherme.

A. Titration de la suspension de LUVs de POPC-PiP₂ (1,3 mM) avec des aliquotes de 3 μ L de protéine Hsp12 (150 μ M).

B. Intégration du signal de la titration.

L'ajout successif de la solution de protéine Hsp12 entraîne l'apparition de pics négatifs (Figure 62A). Il y a donc bien une interaction entre la protéine Hsp12 et le PiP₂ et cette interaction est exothermique. L'intégration des pics successifs permet de calculer une

constante d'affinité de 2,6 μM (Figure 62B). Il y a donc une forte affinité entre la protéine Hsp12 et le PIP_2 .

L'ITC a permis de valider l'interaction entre la protéine Hsp12 et le PIP_2 et de montrer une forte affinité entre les deux partenaires. Afin de voir si cette interaction a un impact sur les lipides, des expériences de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sont réalisées.

8 DSC

La calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry – DSC) est une technique de calorimétrie permettant de mesurer des différences de chaleur entre une référence et un échantillon lors du balayage d'une rampe de température. Les liposomes sont caractérisés par leur température de transition de phase (T_m), ainsi que par l'enthalpie de cette transition (ΔH), traduisant un changement d'état des lipides. L'impact de la protéine Hsp12 sur ces deux paramètres est donc évalué. Une suspension de MLVs de DPPC-PiP₂ a ainsi été utilisée à une concentration de 1,3 mM. La protéine Hsp12 a été ajoutée à une concentration de 16 μ M. Les signaux obtenus pour les MLVs de DPPC-PiP₂ seuls et avec la protéine Hsp12 sont montrés ci-dessous (Figure 63).

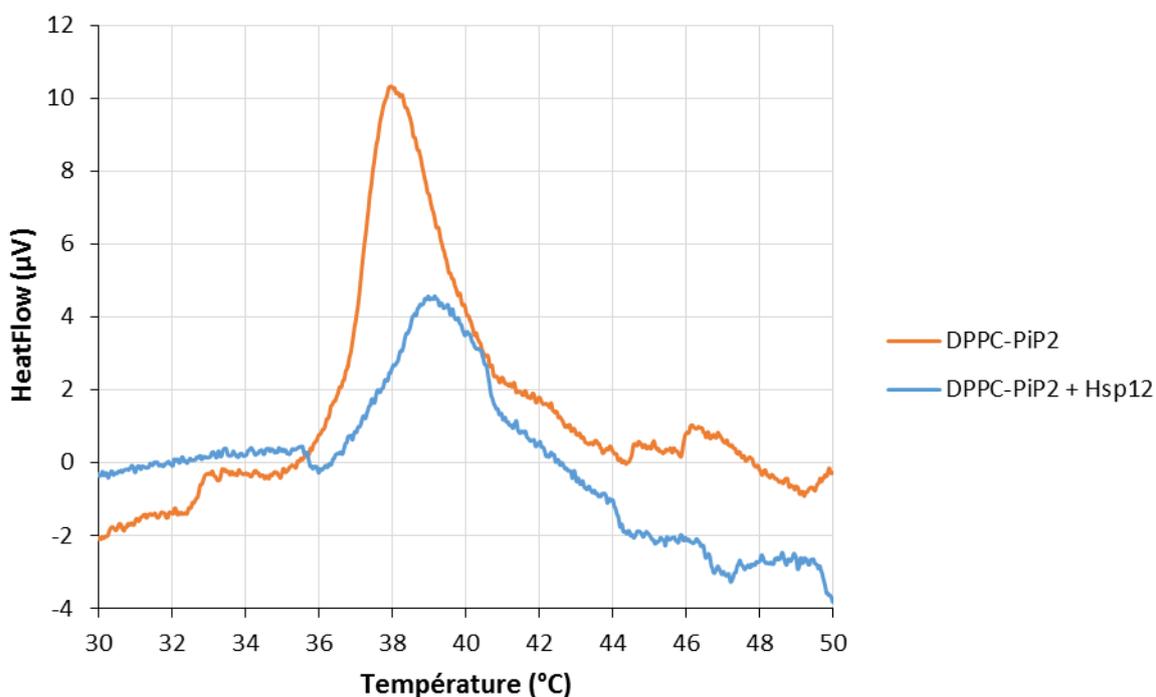


Figure 63 : Thermogramme d'analyse de liposomes de DPPC-PiP₂ avec et sans la protéine Hsp12.

La température de transition de phase du mélange DPPC-PiP₂ est de 38°C et l'aire du pic est de 1441 μ V/s. La température de transition du DPPC seul est de 41°C donc le PiP₂ influence légèrement la température de transition. Lorsque la protéine Hsp12 est ajoutée, la température de transition est augmentée d'1°C à 39°C. Ce qui signifie qu'il faut une

température plus importante (plus d'énergie) pour faire passer les lipides de la phase gel à la phase fluide. Il apparaît donc que la protéine Hsp12 rigidifie les liposomes de DPPC-PIP₂. De plus, l'aire du pic est fortement diminuée à 920 μV/s. L'aire du pic étant corrélée à l'enthalpie de la transition, la diminution de l'aire du pic signifie que le changement d'état libère moins d'énergie. Par conséquent, la protéine perturbe les chaînes d'acide gras en diminuant leurs interactions de van der Waals. Il semblerait donc que la protéine Hsp12 s'intercale entre les chaînes d'acide gras des lipides.

La DSC a permis de démontrer que l'interaction de la protéine Hsp12 avec des liposomes de DPPC-PIP₂ entraîne une rigidification de la bicouche lipidique. Ce phénomène avait également été observé avec des liposomes de DPPG (Welker *et al.*, 2010). De plus, il semblerait que la protéine s'enchâsse dans la bicouche lipidique. Cette observation corrobore les prédictions réalisées à partir de la structure de la protéine Hsp12 dans la littérature (Herbert *et al.*, 2012) (cf. Chapitre 1 - 1.2.2 Structure). Les hélices pourraient alors être en partie enchâssées dans la bicouche lipidique grâce aux résidus hydrophobes et les charges positives pourraient être liées par des interactions électrostatiques aux têtes des phospholipides chargées négativement (PIP₂).

9 Conclusion

Les différentes techniques utilisées ont permis de confirmer que la protéine Hsp12 native est une protéine intrinsèquement non ordonnée (IDP). En effet, la protéine Hsp12 présente une stabilité thermique jusqu'à 100°C et une mobilité électrophorétique particulière. De plus, un comportement particulier de la protéine Hsp12 a été observé en chromatographie d'exclusion stérique suggérant que la protéine Hsp12 pouvait être sous forme oligomérique. Des études de réticulation chimique ont permis de montrer l'absence d'oligomères. Le comportement de la protéine Hsp12 s'explique donc par sa forme linéaire, caractéristique des protéines IDP. Ceci a été confirmé par le dichroïsme circulaire, qui a montré que la protéine Hsp12 n'est pas structurée en solution aqueuse mais peut former des hélices α en présence de SDS ainsi qu'en présence de certains phospholipides présents dans la membrane plasmique des levures, comme le PIP_2 . Afin de caractériser cette interaction, des expériences d'ITC ont été réalisées. Elles ont permis de démontrer une forte affinité entre la protéine Hsp12 et le PIP_2 avec une constante d'affinité de 2,6 μM . Enfin, l'impact de la protéine Hsp12 sur l'organisation des lipides a été évalué grâce à la DSC. Il a ainsi été montré que la protéine Hsp12 rigidifie la bicouche lipidique de DPPC- PIP_2 et qu'elle pourrait s'enchâsser dans cette bicouche.

Ces observations peuvent être extrapolées à la levure. En effet, chez la levure les esters de phosphatidylinositol (PI) sont présents majoritairement dans le feuillet interne de la membrane plasmique mais également dans les membranes de l'appareil de Golgi, des endosomes et des vacuoles (Strahl and Thorner, 2007). Une fois la protéine Hsp12 traduite dans le cytosol, elle pourrait alors interagir avec les PI et s'enchâsser en partie dans les membranes. Sa présence dans les membranes permettrait alors de les rigidifier. Cette rigidification pourrait ainsi permettre aux levures de mieux résister aux conditions stressantes en conservant l'intégrité de leurs membranes. La protéine Hsp12 aurait donc un véritable rôle de chaperonne de membrane.

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine Hsp12 sur les membranes, il est envisagé de localiser la protéine Hsp12 *in vivo* par immunofluorescence. Grâce aux anticorps anti-Hsp12 obtenus pour le développement du dosage ELISA, il est possible de cibler la protéine Hsp12 directement sur des coupes de levures. Cette étude permettrait ainsi de voir

la localisation de la protéine Hsp12. De plus, la détection de la protéine Hsp12 pourrait être réalisée suite aux différentes conditions de stress explorées précédemment afin de voir s'il y a une localisation préférentielle de la protéine lors de stress.

Partie II. Caractérisation organoleptique

1 Introduction

Plusieurs études ont mis en évidence la possible implication de la protéine Hsp12 dans la sucrosité du vin. Il a été montré que la sucrosité des vins augmentait avec la quantité de levures présentes pendant l'autolyse (Marchal *et al.*, 2011a), suggérant la libération d'une ou plusieurs molécules « sucrées » lors de l'autolyse des levures. Puis, des travaux sur le fractionnement d'extraits de levures autolysées ont permis d'isoler une fraction sapide de nature peptidique, dont la masse moléculaire des constituants était estimée entre 0,5 et 3 kDa. L'analyse par spectrométrie de masse de cette fraction a permis d'identifier des peptides issus de la protéine Hsp12. L'analyse organoleptique a montré que l'ajout de cette fraction sapide dans le vin augmentait la sensation de sucrosité (Moine, 2005). Enfin, une analyse sensorielle de vins obtenus à partir de souches de levures exprimant ou n'exprimant pas la protéine Hsp12 a été réalisée. Cette étude a montré une sensation de sucrosité plus importante pour le vin obtenu à partir des levures exprimant la protéine Hsp12 (Marchal *et al.*, 2011a). Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence le rôle de la protéine Hsp12 dans la sucrosité du vin. Cependant, il n'a pas été démontré si le goût sucré provient de la protéine Hsp12 entière, ou, d'un ou plusieurs peptides issus de la protéine Hsp12. L'objectif est donc de démontrer si la protéine Hsp12 entière ou lysée est responsable de la sucrosité du vin.

2 Seuil de détection

Le terme de seuil a été introduit au XIX^{ème} siècle par des psycho-physiciens. Il est défini comme l'intensité d'un stimulus au-dessus de laquelle ce stimulus peut être détecté, et en dessous de laquelle il ne peut l'être (Figure 64A). Dans notre cas, l'intensité du stimulus correspond à la concentration de la protéine Hsp12.

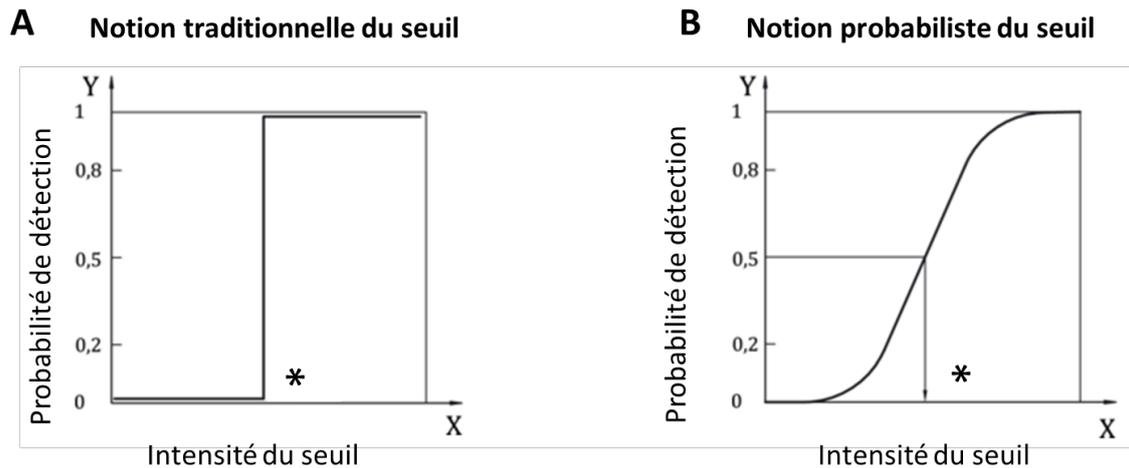


Figure 64 : La notion de seuil. L'astérisque correspond au seuil.
A. Notion traditionnelle du seuil.
B. Notion probabiliste du seuil.

Cependant, en pratique, la probabilité de détection exprimée en fonction de la concentration de la substance correspond à une sigmoïde (Figure 64B). Cette forme traduit la variabilité de la perception d'un stimulus. Ainsi le seuil correspond à la concentration pour laquelle la probabilité de détection est de 0,5. Le seuil de détection correspond donc à la moyenne géométrique entre la concentration la plus basse identifiée et la plus haute non identifiée.

La protéine Hsp12 a été dégustée dans le cadre d'un test triangulaire. Pour cela, trois échantillons, dont deux identiques, sont présentés simultanément aux juges qui doivent désigner l'échantillon différent. Les deux échantillons identiques correspondent à de l'eau minérale et l'échantillon différent correspond à la protéine Hsp12 dissoute dans la même eau à une concentration donnée (Figure 65).

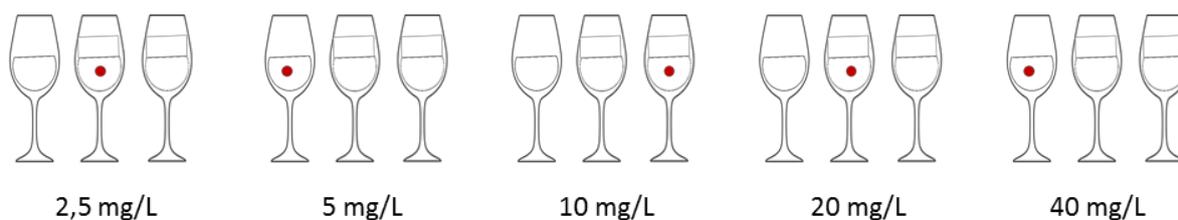


Figure 65 : Représentation des modalités dégustées pour déterminer le seuil de détection de la protéine Hsp12.

Le seuil de détection correspond à la moyenne géométrique entre la concentration la plus basse identifiée et la plus haute non identifiée. Ainsi pour les juges n'ayant pas identifié la plus grande concentration de la protéine Hsp12 (40 mg/L), leur seuil individuel correspond à la moyenne géométrique entre 40 mg/L et la concentration suivante qui aurait été testée si la série avait été étendue (80 mg/L). Le seuil collectif correspond à la moyenne géométrique des seuils individuels.

Le seuil de détection gustative est établi à 21,3 mg/L pour le panel, avec des seuils individuels compris entre 3,5 et 56,6 mg/L. Ce seuil correspond à une concentration référence pour caractériser sensoriellement la protéine Hsp12. Le seuil de détection permet d'obtenir la concentration pour laquelle une différence sensorielle est observée en présence de la protéine Hsp12. Toutefois, ce test ne permet pas de relier la différence sensorielle à la sucrosité car il n'est pas demandé aux juges de caractériser le profil sensoriel mais uniquement la perception d'une différence. Afin de vérifier si la protéine Hsp12 participe au goût sucré, un test *in vitro* d'activation du récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 a été réalisé.

3 Test d'activation du récepteur T1R2/T1R3

Le test d'activation du récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr Loïc Briand (CSGA – Dijon). Cette équipe a développé un test permettant de mesurer l'activation du récepteur humain T1R2/T1R3 exprimé en cellules HEK293 (Poirier *et al.*, 2012). L'activation du récepteur est mesurée par de la fluorescence, qui est directement reliée la libération de calcium intracellulaire. La capacité de la protéine Hsp12 à activer le récepteur a été évaluée sur des cellules exprimant ou pas ce récepteur (Figure 66).

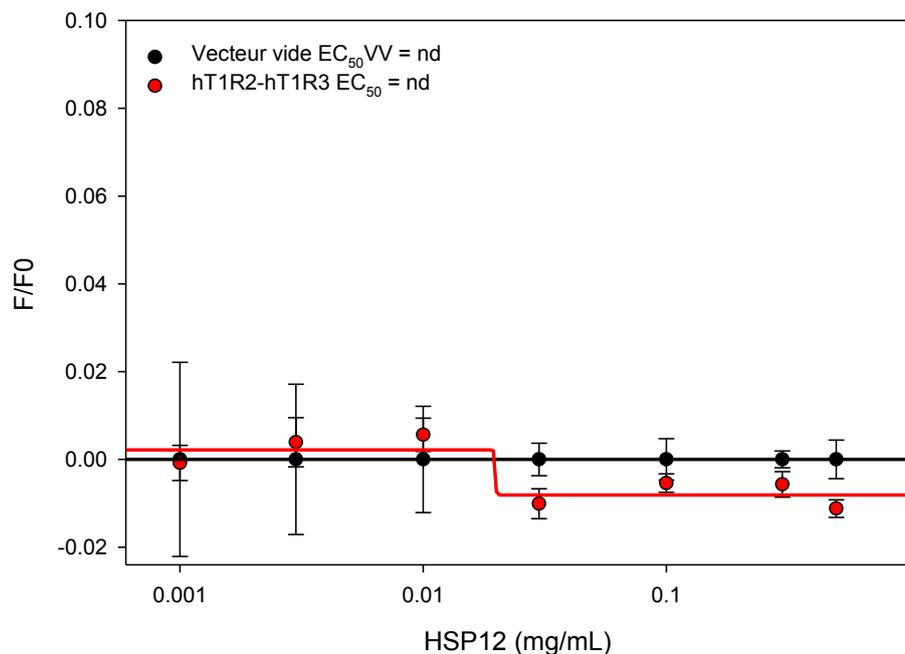


Figure 66 : Graphique représentant l'activation du récepteur T1R2/T1R3 au travers de la fluorescence en fonction de la concentration en protéine Hsp12. La courbe noire représente l'activation de cellules n'exprimant pas le récepteur T1R2/T1R3. La courbe rouge représente l'activation des cellules exprimant le récepteur T1R2/T1R3.

Avec les cellules n'exprimant pas le récepteur T1R2/T1R3 (courbe noire), le signal de fluorescence est nul. C'est un contrôle négatif qui permet de vérifier que la protéine Hsp12 n'induit ni de fluorescence, ni de flux calcique, lorsqu'elle est appliquée sur les cellules. Avec les cellules exprimant le récepteur (courbe rouge), le signal de fluorescence est également nul. Il n'y a donc pas de flux calcique et donc pas d'activation du récepteur T1R2/T1R3. Ces

données montrent que la protéine Hsp12 n'active pas le récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 à des concentrations inférieures à 0,5 mg/mL (42 µM). Un nouvel essai a été réalisé avec une concentration maximale de 3,3 mg/mL (250 µM) de protéine Hsp12, sans montrer d'activation du récepteur (données non présentées). Ces résultats montrent donc que la protéine Hsp12 n'active pas le récepteur T1R2/T1R3 dans les conditions testées.

Les différentes connaissances acquises sur la protéine Hsp12 dans le vin sont les suivantes :

1. La contribution de la protéine Hsp12 au goût sucré du vin a été identifiée suite à la dégustation de peptides issus de la protéine.
2. Le dosage ELISA de la protéine Hsp12 dans plusieurs vins a montré l'absence de la protéine Hsp12 entière.
3. La protéine Hsp12 entière ne semble pas activer le récepteur du goût sucré.

Il est donc imaginable que ce soient les peptides issus de la protéine Hsp12 qui soient responsables du goût sucré. Toutefois, un seuil de détection a été obtenu pour la protéine entière à 21,3 mg/L. Lors de l'épreuve du seuil de détection, les dégustateurs doivent identifier une différence de goût. C'est donc une différence globale de la perception gustative. La protéine Hsp12 entière pourrait par exemple être responsable de plusieurs saveurs (amer, salé, sucré, acide, umami) ou de la modification de la viscosité.

Un profil sensoriel est réalisé pour évaluer la sucrosité de la protéine Hsp12. Lors de cette dégustation, le profil sera évalué pour la protéine Hsp12 entière et la protéine Hsp12 lysée dans du vin pour voir s'il y a une différence entre les deux.

4 Profil sensoriel

Afin d'évaluer l'impact de la protéine Hsp12 entière et lysée sur le goût du vin, un profil sensoriel est réalisé. Selon l'organisation internationale de normalisation, l'établissement d'un profil sensoriel (ISO 13299 : 2016) est une méthode d'analyse descriptive. Elle permet de caractériser les propriétés sensorielles d'un échantillon avec l'attribution d'une valeur d'intensité pour des descripteurs sensoriels choisis au préalable (sucrosité, acidité, amertume, astringence, ...). Le profil sensoriel consiste à présenter consécutivement les échantillons à évaluer à un panel de dégustateurs. Celui-ci doit alors évaluer sur une échelle l'intensité de chaque descripteur, pour tous les échantillons. Les notes d'intensité attribuées par le panel sont alors centrées-réduites afin de s'affranchir du facteur de notation des juges puis les résultats sont traités statistiquement par une analyse de variance ANOVA.

4.1 Etude préliminaire

La libération de la protéine Hsp12 native lors de la fermentation et de l'autolyse induite de la souche Fx10 est évaluée au préalable. L'objectif est de pouvoir mimer au mieux les conditions de vinification lors la préparation des échantillons destinés à l'établissement du profil sensoriel.

Deux cultures de la souche Fx10 sont réalisées avec du moût blanc de raisin. La fermentation est menée pendant 11 jours jusqu'à épuisement des sucres. Puis, l'autolyse des levures est induite par augmentation de la température. Des prélèvements de culture sont réalisés tous les jours. La protéine Hsp12 est ainsi quantifiée dans le moût (Figure 67).

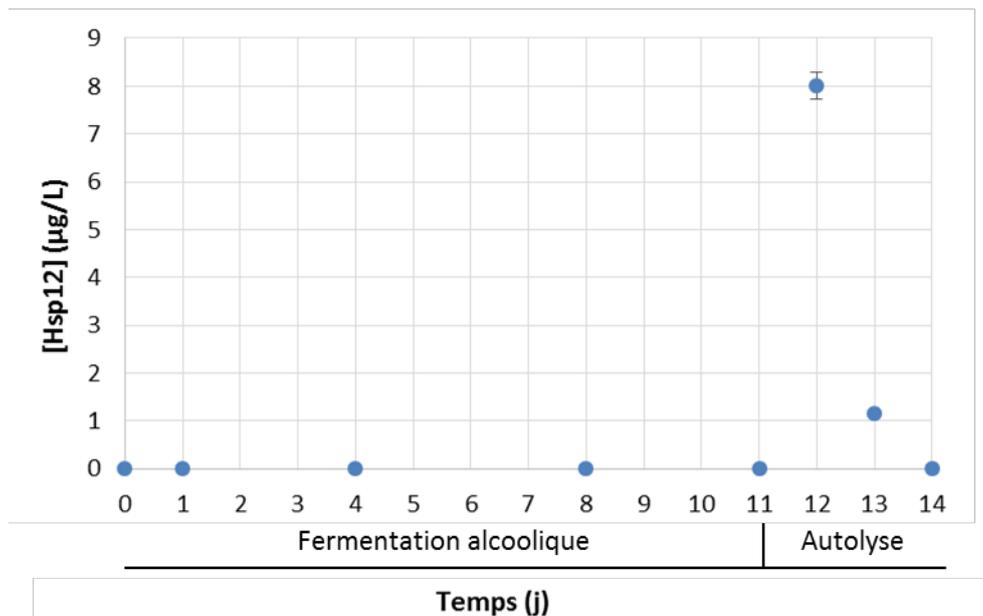


Figure 67 : Suivi de la concentration de la protéine Hsp12 au cours de la fermentation alcoolique et de l'autolyse des levures.

Pendant les 11 premiers jours, la protéine Hsp12 n'est pas détectée dans le moût. Elle n'est donc pas libérée dans le moût lors de la fermentation alcoolique. Le 12^{ème} jour, la quantité de protéine Hsp12 a augmenté de façon importante à 8 µg/L. Il y a donc eu libération de la protéine Hsp12 dans le moût suite à l'autolyse des levures. Puis, la concentration en protéine Hsp12 diminue le 13^{ème} jour (1,2 µg/L) et elle n'est plus détectée le 14^{ème} jour, soit après 3 jours d'autolyse. Il est possible que la protéine Hsp12 soit dégradée dans le milieu par des protéases. En effet le dosage ELISA ne permet pas de quantifier les peptides issus de la protéine entière. Les protéases peuvent être déjà présentes dans le moût de raisin ou bien libérées par les levures suite à l'autolyse. Pour rappel, lors de la validation de la méthode de dosage ELISA, la protéine Hsp12 n'avait pas été détectée dans plusieurs vins commercialisés, probablement suite à sa protéolyse rapide dès sa libération dans le moût. Il semblerait donc que la protéine Hsp12 sous sa forme entière n'est présente que transitoirement au cours de la vinification.

En conclusion, afin d'évaluer l'impact gustatif des peptides de la protéine Hsp12, cette dernière devra être ajoutée au moment de l'autolyse des levures afin de représenter au mieux les conditions de vinification.

4.2 Préparation des échantillons

4.2.1 Fermentation

Trois cultures d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dont le gène *HSP12* est inactivé (souche Δ HSP12) sont réalisées avec 450 mL de moût blanc de raisin. L'utilisation de cette souche Δ HSP12 permet de s'affranchir de la protéine Hsp12 libérée naturellement par les levures dans la culture et ainsi d'évaluer l'impact gustatif d'une quantité connue de protéine Hsp12. La fermentation est réalisée à 24°C. Le suivi de la croissance des levures est réalisé par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) (Figure 68).

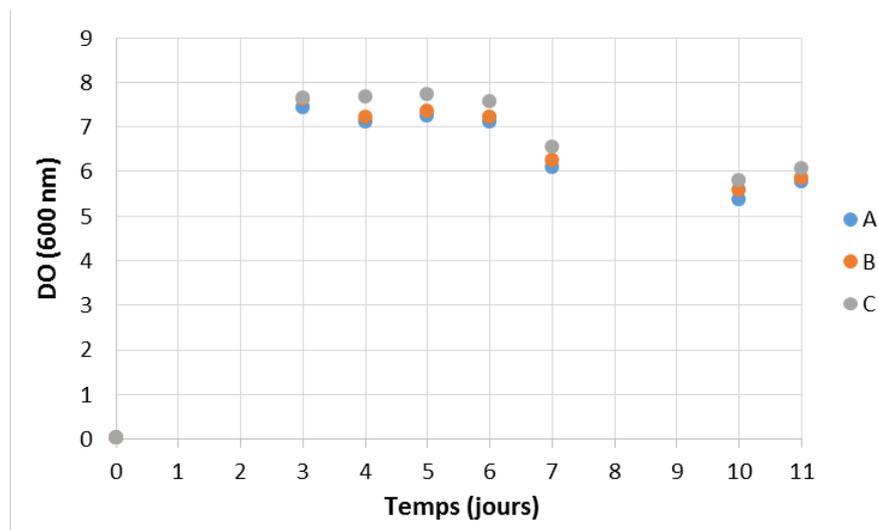


Figure 68 : Suivi de la croissance des levures lors de la fermentation.

Les trois cultures présentent un profil de croissance similaire. Une forte augmentation de la biomasse est observée lors des premiers jours. Puis la quantité de biomasse reste stable jusqu'au 6^{ème} jour, avant de diminuer légèrement jusqu'au 11^{ème} jour.

Le suivi de la fermentation est réalisé grâce à la pesée des cultures. En effet, la consommation des sucres fermentescibles conduit à la libération de CO₂, qui va entraîner une perte de masse. Pour 450 mL de moût, la consommation de 86 g de glucose et de fructose conduit à une libération de 42 g de CO₂. La perte de masse est associée directement à la libération de CO₂, ce qui permet de calculer la quantité de sucres dans le moût (Figure 69).

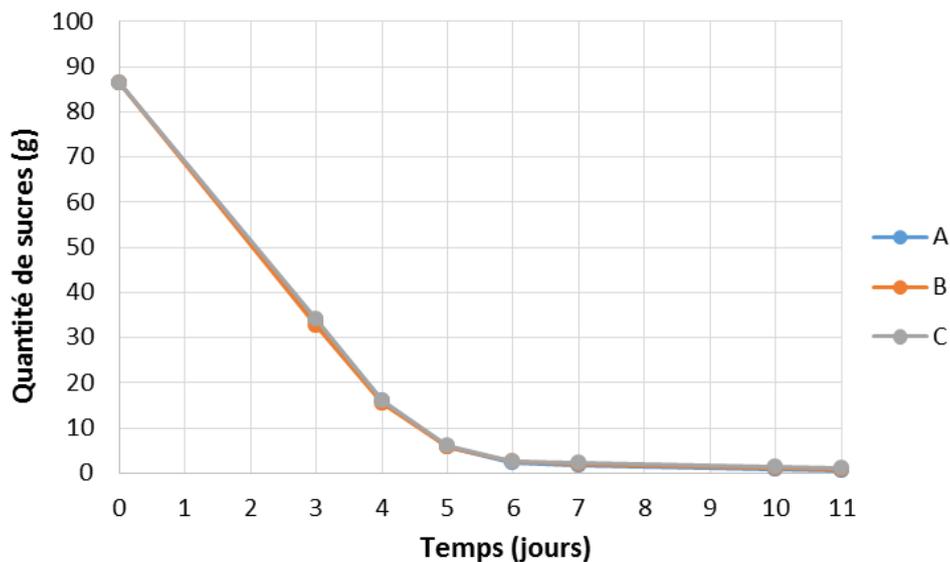


Figure 69 : Suivi de la quantité de sucres dans le moût lors de la fermentation.

Les trois cultures montrent un profil similaire pour le suivi de la quantité de sucres dans le moût. Il y a une consommation rapide des sucres les premiers jours, puis une stabilisation à partir du 7^{ème} jour à environ 84 g. La fermentation est arrêtée le 11^{ème} jour car la totalité des sucres est consommée (86 g). Cela est vérifié par un dosage enzymatique montrant qu'il reste 0,023 g de glucose dans chaque culture. L'autolyse est donc induite dans les cultures, afin de mimer au mieux les conditions de vinification.

4.2.2 Autolyse

Le moût fermenté est séparé en 2 modalités. Dans la modalité 1, il n'y a pas d'ajout et dans la modalité 2, la protéine Hsp12 purifiée est ajoutée à une concentration de 30 mg/L. L'ajout de protéine Hsp12 correspond ici au moment où elle est libérée dans le vin lors de la vinification (cf. 4.1 Etude préliminaire). Les cultures sont ainsi placées en condition anaérobie à 32°C. Ces conditions favorisent l'autolyse des levures, qui vont ainsi libérer leur contenu intracellulaire. La protéine Hsp12 est quantifiée au cours du temps dans les milieux de culture par dosage ELISA (Tableau XIV).

Tableau XIV : Quantification de la protéine Hsp12 par dosage ELISA dans les milieux de culture des modalités 1 et 2.

	Modalité 1	Modalité 2
Quantité ajoutée	0	30 mg/L
Autolyse J0	0	1,5 mg/L
Autolyse J1	0	0,008 mg/L
Autolyse J2	0	0

La modalité 1 permet de confirmer qu'il n'y a pas de protéine Hsp12 libérée dans le milieu avec la souche Δ HSP12. Pour la modalité 2, la quantité de protéine Hsp12 diminue rapidement suite à son ajout et jusqu'à ne plus être détectable à J2. La protéine Hsp12 est probablement dégradée par des protéases présentes dans le milieu. Le vin est alors centrifugé et filtré pour éliminer les levures.

Juste avant la dégustation, la modalité 1 est divisée en 2 modalités afin d'étudier la protéine Hsp12 entière, non digérée. Dans la modalité 1A, rien n'a été ajouté et dans la modalité 1B, la protéine Hsp12 pure a été ajoutée à une concentration de 30 mg/L. Les 3 modalités sont représentées ci-après (Figure 70).

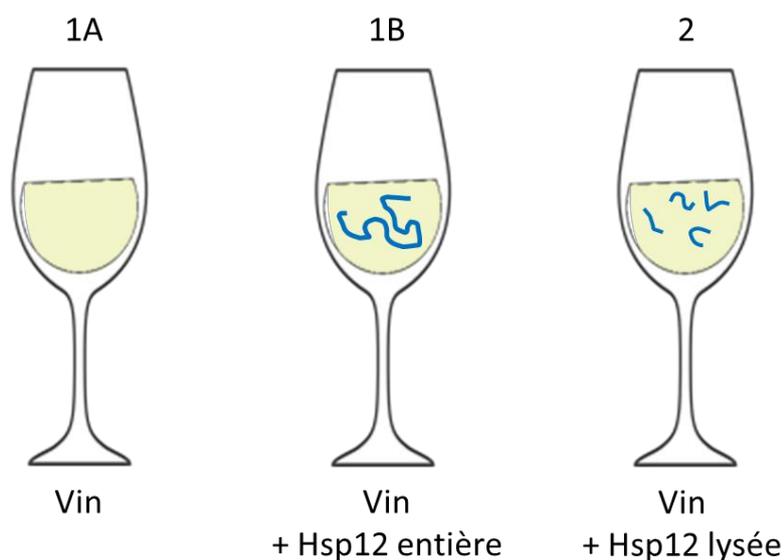


Figure 70 : Représentation des 3 modalités dégustées lors de l'établissement du profil sensoriel.

4.3 Profil sensoriel

Le profil sensoriel est réalisé sur les 3 modalités décrites précédemment. Pour chaque modalité, les dégustateurs ont évalué l'intensité de 3 descripteurs : sucrosité, acidité et amertume. Trois analyses statistiques ANOVA sont donc nécessaires pour analyser chaque descripteur.

4.3.1 Analyse de la sucrosité

Avant de faire l'analyse de variance ANOVA, l'homogénéité des variances et la normalité des données ont été validées au risque 5% grâce aux tests respectifs de Levene (p -value = 0,217) et Shapiro-Wilk (p -value = 0,281). L'analyse ANOVA montre que la sucrosité d'au moins une modalité est significativement différente des autres à un risque de 2% (p -value = 0,019). Le test de comparaison multiple de moyenne de Tukey permet de classer les 3 modalités selon les différences de sucrosité (Figure 71).

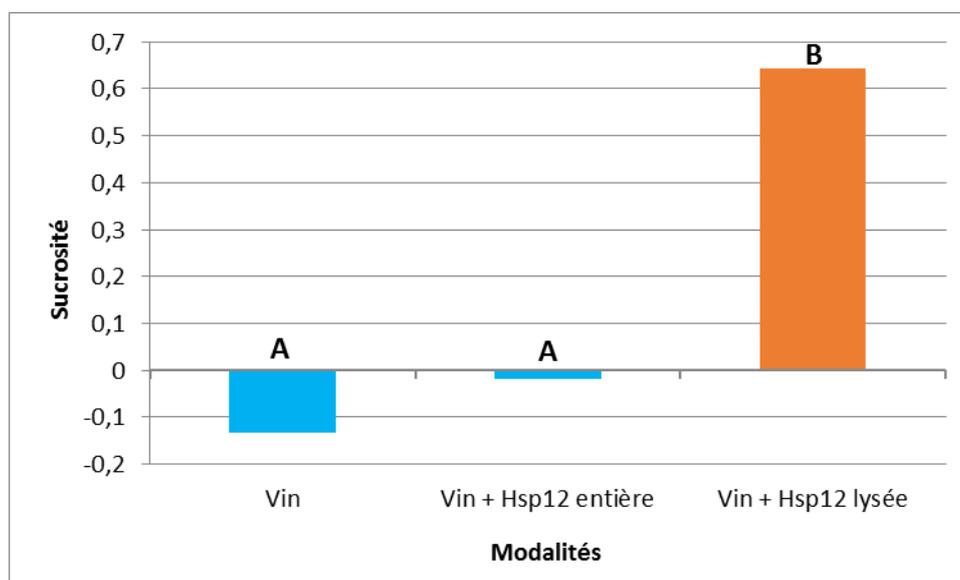


Figure 71 : Histogramme représentant les résultats de la comparaison multiple de moyennes de Tukey analysant la sucrosité des 3 modalités.

Les valeurs de sucrosité correspondent aux notes centrées-réduites, permettant de s'affranchir du classement de chaque dégustateur.

La comparaison multiple de moyennes a permis de classer la modalité « Vin » avec la modalité « Vin + Hsp12 entière » dans le groupe A, ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence

significative entre les moyennes de ces 2 modalités. La sucrosité n'est donc pas différente entre ces deux groupes. Par conséquent, la protéine Hsp12 entière à une concentration de 30 mg/L n'augmente pas la sucrosité du vin. Cette analyse a permis également de mettre en évidence que la modalité « Vin + Hsp12 lysée » est significativement différente des deux autres. La valeur centrée-réduite moyenne de sucrosité est de 0,64, montrant donc que la modalité « Vin + Hsp12 lysée » augmente la sucrosité du vin. Par conséquent, les peptides issus de la lyse de la protéine Hsp12 entière à une concentration de 30 mg/L augmentent la sucrosité du vin.

Cette dégustation montre que ce n'est pas la protéine Hsp12 entière mais les peptides qui en sont issus, qui sont responsables de la sensation de sucrosité du vin.

4.3.2 Analyse de l'acidité

Avant de faire l'analyse de variance ANOVA, l'homogénéité des variances et la normalité des données recueillies sur l'acidité ont été validées au risque 5% grâce aux tests respectifs de Levene (p-value = 0,842) et Shapiro-Wilk (p-value = 0,368). L'analyse ANOVA n'a pas montré de différence significative entre les 3 modalités. L'acidité n'est donc pas différente entre les 3 modalités. Par conséquent, la protéine Hsp12 ne semble pas avoir d'impact sur l'acidité du vin.

4.3.3 Analyse de l'amertume

L'homogénéité des variances et la normalité des données recueillies sur l'amertume ont été validées au risque 5% grâce aux tests respectifs de Levene (p-value = 0,607) et Shapiro-Wilk (p-value = 0,103). L'analyse ANOVA n'a pas montré de différence significative entre les 3 modalités. L'amertume n'est donc pas différente entre les 3 modalités. Par conséquent, la protéine Hsp12 ne semble pas avoir d'impact sur l'amertume du vin.

5 Conclusion

Plusieurs expériences ont été réalisées afin de préciser la contribution de la protéine Hsp12 à la sucrosité du vin.

Dans un premier temps, le seuil de détection de la protéine Hsp12 a été évalué dans de l'eau. Ce test repose sur la détection d'une différence de perception. Il ne permet donc pas de caractériser la sucrosité de la protéine Hsp12. Un seuil de 21,3 mg/L a été obtenu.

Puis, des tests cellulaires ont été réalisés pour mesurer l'activation du récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 par la protéine Hsp12. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'activation du récepteur par la protéine Hsp12. Cet élément vient s'ajouter à plusieurs observations s'orientant vers une possible implication des peptides issus de la protéine Hsp12 dans le goût sucré (cf. 3 Test d'activation du récepteur T1R2/T1R3 ; cf. 4.1 Etude préliminaire).

Afin d'évaluer s'il y a une différence sensorielle entre la protéine Hsp12 entière et les peptides issus de la protéine Hsp12, un profil sensoriel a été réalisé. Pour se rapprocher des conditions de vinification, du moût de raisin a subi une étape de fermentation alcoolique puis une étape d'autolyse des levures avec ajout de protéine Hsp12 selon différentes modalités. Le profil sensoriel n'a pas mis en évidence de différence sensorielle significative en termes d'acidité et d'amertume entre les modalités. Il n'y a donc a priori pas d'impact de la protéine Hsp12 sur ces deux descripteurs. Le profil sensoriel a également permis de montrer que l'ajout de protéine Hsp12 entière à une concentration de 30 mg/L n'a pas d'impact sur la sucrosité. Pourtant, le seuil de détection de la protéine Hsp12 entière dans de l'eau est de 21,3 mg/L. Ce résultat peut s'expliquer par trois raisons principales. Tout d'abord, la matrice de dégustation n'est pas la même, le seuil de détection a été réalisé dans de l'eau contrairement au profil sensoriel qui a été réalisé dans du vin. Ensuite, le profil sensoriel fait appel au seuil de reconnaissance de la sucrosité. Le seuil de reconnaissance est toujours plus élevé, c'est-à-dire qu'il nécessite une plus grande quantité de substance, par rapport au seuil de détection. Ce dernier se caractérise par la perception d'une différence globale, qui peut ne pas être liée à la perception de sucrosité mais par exemple à un mélange de saveurs ou à la texture en bouche. Enfin, la salive contenant de nombreuses protéases pourrait entraîner la protéolyse de la protéine Hsp12 dans la bouche. Lors de la

dégustation, si les dégustateurs gardent longtemps en bouche la protéine Hsp12, elle est peut être partiellement dégradée en peptides qui pourraient alors être responsables d'un goût sucré. L'absence d'impact sur la sucrosité de la protéine Hsp12 entière est à rapprocher du fait que la protéine Hsp12 n'active pas le récepteur au goût sucré.

Le profil sensoriel a également mis en évidence que les peptides issus de la protéine Hsp12 à 30 mg/L augmentent la sucrosité perçue dans le vin. Ce résultat confirme les observations réalisées lors de la découverte de la sucrosité de la protéine Hsp12. Cette dégustation a ainsi montré que ce n'est pas la protéine Hsp12 entière mais les peptides qui en sont issus, qui sont responsables de la sensation de sucrosité du vin.

Il serait intéressant de mesurer l'activation du récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 par les peptides. Ce test a été envisagé en analysant la modalité « Vin + Hsp12 lysée » mais l'échantillon est trop complexe pour être analysé par cette technique. Il faudrait alors utiliser une protéase de levure afin de digérer la protéine Hsp12 dans un tampon afin d'avoir un échantillon contenant uniquement les peptides issus de la protéine Hsp12. La protéase majeure de *Saccharomyces cerevisiae* est la protéinase A (ou saccharopepsine), qui n'est plus commercialisée. Elle a toutefois été produite sur demande chez la levure par l'entreprise MyBioSource, qui n'assurait pas son activité protéolytique. Après plusieurs essais, il s'est avéré que la protéinase A reçue n'était pas active.

Au laboratoire, les équipements ainsi que les compétences permettent la production de la protéinase A. Il est donc envisagé de la produire sous forme recombinante chez la levure. Son activité enzymatique sera évaluée afin de s'assurer de l'efficacité de la protéase. Elle sera ainsi utilisée pour protéolyser la protéine Hsp12 et étudier les peptides qui en seront issus.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Le rôle de la protéine Hsp12 a été étudié au cours de ce travail. En effet, les transcrits du gène *HSP12* ont fait l'objet de plusieurs études pour leur implication dans la réponse au stress mais la protéine Hsp12 n'a jamais été quantifiée. Il paraissait donc pertinent de la quantifier afin de comprendre son rôle dans la réponse aux stress. Par ailleurs, des études ont mis en évidence la contribution de la protéine Hsp12 dans la sucrosité du vin. Cependant, il n'a pas été démontré si cette contribution provient de la protéine Hsp12 entière ou de peptides qui en sont issus. L'objectif de cette étude était ainsi d'obtenir la protéine Hsp12 native pure à partir de culture de *Saccharomyces cerevisiae* afin de comprendre son rôle, d'une part dans la réponse au stress chez la levure et, d'autre part dans la sucrosité du vin.

- **Dosage ELISA de la protéine Hsp12**

Le dosage ELISA de la protéine Hsp12 développé lors de ce travail est un outil central de cette étude. En effet, il permet la quantification de la protéine Hsp12 avec une très bonne sensibilité dans différentes matrices, que ce soit directement dans du milieu de culture, après lyse des levures ou dans du vin. Cet outil peut donc s'avérer très utile pour l'étude des stress chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, puisque la protéine Hsp12 semble être un marqueur de stress pertinent. Ce dosage sera également très utile en œnologie, notamment pour la société Laffort. En effet, la quantification de la protéine Hsp12 permet de sélectionner la souche de levure la plus productrice de protéine Hsp12. L'utilisation d'une telle souche permettrait ainsi d'améliorer l'équilibre gustatif du vin. De plus, ce dosage permet de mesurer l'impact des conditions de vinification (température, durée de fermentation, ...) sur la production de la protéine Hsp12. Les conditions de vinification pourraient ainsi être adaptées pour favoriser la production de la protéine Hsp12 et ainsi améliorer l'équilibre gustatif du vin.

- **Impact des stress sur la production de la protéine Hsp12**

L'impact de différents stress sur la quantité de protéine Hsp12 produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* a ainsi été étudié grâce au développement d'un protocole de dosage ELISA.

D'une part, des stress de courte durée (1h) ont été étudiés. Il a ainsi été démontré pour la première fois, que la quantité de protéine Hsp12 native augmente significativement suite à un stress thermique à 40°C et à 20°C et suite à un stress osmotique avec 400 mM de NaCl. Ces résultats confirment les observations précédentes sur les taux de transcrits du gène *HSP12*. L'impact du stress éthanolique a également été étudié et a montré une diminution significative de la quantité de protéine Hsp12. Ce résultat ne corrobore pas l'augmentation des transcrits du gène *HSP12* décrite dans la littérature. Des mécanismes de régulation de l'expression des ARNm pourraient être responsables de la faible quantité de protéine Hsp12 traduite alors que la quantité de transcrits est importante. Il serait toutefois pertinent de quantifier, par RT-qPCR, les transcrits du gène *HSP12* dans notre modèle d'étude.

D'autre part, le suivi de la production de la protéine Hsp12 a permis de confirmer que la protéine est exprimée en absence de glucose. Les résultats suggèrent également qu'elle serait exprimée à un niveau basal et participerait au développement des levures. En outre, la protéine Hsp12 est exprimée en réponse aux stress, suggérant son implication dans l'adaptation et/ou la résistance aux stress. Afin d'étudier son expression basale, l'impact des stress osmotique et éthanolique pourrait également être évalué plusieurs heures après leur application afin de voir comment la quantité de protéine Hsp12 évolue.

- **Purification**

Un procédé de purification a été développé afin d'obtenir la protéine Hsp12 pure. L'objectif était d'obtenir un haut niveau de pureté afin de pouvoir caractériser la protéine Hsp12. L'étude de la protéine native (non recombinante) permet de s'affranchir de potentiels biais liés à une manipulation génétique de la levure. Sa purification était donc un défi car elle n'est pas surexprimée par rapport aux autres protéines de levure et ne possède

pas de caractéristiques permettant de la purifier spécifiquement par chromatographie d'affinité.

Pour la première étape, la résine en mode mixte PPA HyperCel a été sélectionnée et a permis l'élimination de nombreux contaminants. Pour la deuxième étape, le choix de la résine a été fait de manière rationnelle. Les 2 contaminants majoritaires observés à la fin de la première étape ont été analysés par spectrométrie de masse. Leurs caractéristiques ont orienté le choix vers la résine PPA HyperCel du fait de son importante hydrophobicité. Ainsi, la résine PPA HyperCel a été utilisée pour les 2 étapes. Traditionnellement, une stratégie dite orthogonale est privilégiée. En effet, différentes résines correspondant à différentes techniques de séparation sont utilisées à chaque étape. Dans le cas d'une résine en mode mixte, il est possible de conserver cette orthogonalité puisqu'elle présente 2 types d'interactions, électrostatiques et hydrophobes. Lors de l'étape 1, la séparation est principalement basée sur les interactions électrostatiques alors que lors de l'étape 2, la séparation est basée sur la combinaison des 2 types d'interactions. Puis, lors du changement d'échelle, un contaminant est apparu : la protéine Hsp12 tronquée. La modification du tampon d'équilibration lors de l'étape 2 ainsi que de la durée de la culture ont permis d'éliminer la protéine tronquée. Pour la troisième étape, une chromatographie d'exclusion stérique a permis d'éliminer les derniers contaminants présents.

Une pureté de 99% est obtenue pour la protéine Hsp12 native, suite à 3 étapes de purification. La purification de la protéine native était un défi qui a été relevé à l'aide de seulement 3 étapes. Ce haut niveau de pureté a permis d'envisager la caractérisation physico-chimique et organoleptique de la protéine Hsp12.

- **Caractérisation physico-chimique**

La caractérisation physico-chimique a permis de confirmer que la protéine Hsp12 native est une protéine intrinsèquement non ordonnée (IDP). En effet, la protéine Hsp12 présente une stabilité thermique jusqu'à 100°C et une mobilité électrophorétique particulière. De plus, un comportement particulier de la protéine Hsp12 a été observé en chromatographie d'exclusion stérique suggérant que la protéine Hsp12 pouvait être sous forme oligomérique. Des études de réticulation chimique ont permis de montrer l'absence

d'oligomères. Le comportement de la protéine Hsp12 s'explique donc par sa forme linéaire, caractéristique des protéines IDP. Ceci a été confirmé par le dichroïsme circulaire, qui a montré que la protéine Hsp12 n'est pas structurée en solution aqueuse mais peut former des hélices α en présence de SDS ainsi qu'en présence de certains phospholipides présents dans la membrane plasmique des levures, comme le PIP_2 . Afin de caractériser l'interaction avec le PIP_2 , des expériences d'ITC ont été réalisées. Elles ont permis de démontrer une forte affinité entre la protéine Hsp12 et le PIP_2 avec une constante d'affinité de 2,6 μM . Enfin, l'impact de la protéine Hsp12 sur l'organisation des lipides a été évalué grâce à des expériences de DSC. Il a ainsi été montré que la protéine Hsp12 rigidifie une bicouche lipidique de DPPC- PIP_2 et qu'elle pourrait s'enchâsser dans cette bicouche.

Ces observations peuvent être extrapolées à la levure. En effet, chez la levure les esters de phosphatidylinositol (PI) sont présents majoritairement dans le feuillet interne de la membrane plasmique mais également dans les membranes de l'appareil de Golgi, des endosomes et des vacuoles (Strahl). Une fois la protéine Hsp12 traduite dans le cytosol, elle pourrait alors interagir avec les PI et s'enchâsser en partie dans les membranes. Sa présence dans les membranes permettrait alors de les rigidifier. Cette rigidification pourrait ainsi permettre aux levures de mieux résister aux conditions stressantes en conservant l'intégrité de leurs membranes. La protéine Hsp12 aurait donc un véritable rôle de chaperonne de membrane.

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine Hsp12 sur les membranes, il est envisagé de localiser la protéine Hsp12 *in vivo* par immunofluorescence. Grâce aux anticorps anti-Hsp12 obtenus pour le développement du dosage ELISA, il est possible de cibler la protéine Hsp12 directement sur des coupes de levures. Cette étude permettrait ainsi de voir la localisation de la protéine Hsp12. De plus, la détection de la protéine Hsp12 pourrait être réalisée suite aux différentes conditions de stress explorées précédemment afin de voir s'il y a une localisation préférentielle de la protéine lors de stress.

- **Caractérisation organoleptique**

Plusieurs expériences ont été réalisées afin de comprendre la contribution de la protéine Hsp12 à la sucrosité du vin.

Dans un premier temps, le seuil de détection de la protéine Hsp12 a été évalué dans de l'eau. Un seuil de 21,3 mg/L a été obtenu. Ce test repose sur la détection d'une différence de perception et permet donc d'obtenir une valeur de référence.

Puis, des tests cellulaires ont été réalisés pour mesurer l'activation du récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 par la protéine Hsp12. Les résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'activation du récepteur par la protéine Hsp12. Cet élément vient s'ajouter à plusieurs observations orientant vers une possible implication des peptides issus de la protéine Hsp12 dans le goût sucré :

- i. contribution de la protéine Hsp12 au goût sucré du vin identifiée suite à la dégustation de peptides issus de la protéine Hsp12
- ii. protéolyse rapide de la protéine Hsp12 suite à l'autolyse des levures
- iii. absence de la protéine Hsp12 entière dans du vin

Afin d'évaluer s'il y a une différence sensorielle entre la protéine Hsp12 entière et les peptides issus de la protéine Hsp12, un profil sensoriel a été réalisé. Pour se rapprocher des conditions de vinification, du moût de raisin a subi une étape de fermentation alcoolique puis une étape d'autolyse des levures avec ajout de protéine Hsp12 selon différentes modalités. Le profil sensoriel a révélé qu'il n'y a pas d'impact de la protéine Hsp12 entière sur l'acidité, l'amertume et la sucrosité. L'absence d'impact sur la sucrosité de la protéine Hsp12 entière est à rapprocher du fait que la protéine Hsp12 n'active pas le récepteur au goût sucré. Enfin, le profil sensoriel a mis en évidence que les peptides issus de la protéine Hsp12 augmentent la sucrosité perçue dans le vin. Ce résultat confirme les observations réalisées lors de la découverte de la sucrosité de la protéine Hsp12.

Il serait intéressant de mesurer l'activation du récepteur au goût sucré T1R2/T1R3 par les peptides. Pour cela, il faudrait utiliser une protéase de levure afin de digérer la protéine Hsp12 dans un tampon afin d'avoir un échantillon contenant uniquement les peptides issus de la protéine Hsp12. La protéase majeure de *Saccharomyces cerevisiae* est la

protéinase A (ou saccharopepsine), qui n'est plus commercialisée. Au laboratoire, les équipements ainsi que les compétences permettent la production de la protéinase A. Il est donc envisagé de la produire sous forme recombinante chez la levure. L'activité enzymatique de la protéase sera évaluée afin de s'assurer de son efficacité. Elle pourra ainsi être utilisée pour protéolyser la protéine Hsp12 et étudier les peptides qui en seront issus.

Ce travail a ainsi permis de mieux comprendre le rôle de la protéine Hsp12 dans la réponse au stress chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et sa contribution dans la sucrosité du vin.

Annexe

ZYMAFLORE® FX10

Levure *Saccharomyces cerevisiae* pour grands vins rouges de garde, élégants et structurés.

Levure Sèche Active Sélectionnée (L.SAS) non OGM, pour usage œnologique. Apte à l'élaboration de produits destinés à la consommation humaine directe, dans le cadre de l'emploi réglementé en œnologie.

Conforme au Règlement CE n° 606/2009.

SPÉCIFICITÉS ET PROPRIÉTÉS ŒNOLOGIQUES

ZYMAFLORE FX10® est la souche des grands vins rouges définis par leur **élégance**, combinant **structure**, **volume en bouche** et **intensité colorante**. La technique du *breeding dirigé* (croisement non OGM) a amélioré sa résistance aux températures élevées, lui assurant ainsi une grande sécurité fermentaire même dans des conditions difficiles.

Particulièrement recommandée pour l'élaboration de vins de garde, notamment de Cabernet Sauvignon ou de Merlot.

CARACTÉRISTIQUES FERMENTAIRES :

- Excellente capacité à assimiler le fructose.
- Tolérance à l'alcool : jusqu'à 16 % vol.
- Tolérance aux températures : 20- 35°C.
- Besoins en azote faibles.

CARACTÉRISTIQUES AROMATIQUES ET ORGANOLEPTIQUES :

- Libération importante de polysaccharides (volume).
- Préservation du potentiel polyphénolique (structure).
- Les polysaccharides pariétaux se combinent avec les tanins du vin, ce qui les rend soyeux, même en concentration importante.
- Très bonne aptitude à l'élevage sur lies.
- Respect du terroir (très faible production d'arômes fermentaires).

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

- Cabernet Sauvignon, Bordeaux 2007.

Température de fermentation 28-32°C, levurage à l'encuvage, cuvaison de 13 jours. TAP 13,5%vol., pH 3,74, AT 4,65 g/L H₂SO₄. Contrôles d'implantation des levures positifs.

Modalité	FX 10	Témoin
Polysaccharides (mg/L)	440	416
Indice de gélatine (réactivité des tanins)	51	62
Indice d'astringence (appréciation de l'astringence à la dégustation)	5,2	6,2

A la dégustation, le vin fermenté par ZYMAFLORE FX10® est plus élégant, présentant plus de volume en bouche (polysaccharides) et des tanins soyeux, alors que le vin témoin apparaît plus «rugueux» et moins souple.

CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES

Levures déshydratées et emballées sous vide. Aspect granulats

ANALYSES CHIMIQUES

Humidité (%) < 8 %	Staphylocoques UFC/g absence
Cellules vivantes LSAS UFC/g $\geq 2.10^{10}$	Salmonelles UFC/25g absence
Bactéries lactiques UFC/g < 10^6	Moisissures UFC/g < 10^3
Bactéries acétiques UFC/g < 10^4	Plomb < 2 ppm
Levures sauvages / LSAS UFC/g < 10^6	Arsenic < 3 ppm
Coliformes UFC/g < 10^2	Mercuré < 1 ppm
E. coli UFC/g absence	Cadmium < 1 ppm

PROTOCOLE D'UTILISATION

CONDITIONS ŒNOLOGIQUES

- Levurer le plus tôt possible après l'encuvage.
- Un facteur 100 dans le rapport levures sélectionnées / levures indigènes porte les chances d'implantation à 98% (contre 60 à 90% avec un facteur 10).
- La température, la souche de levure, la réhydratation et l'hygiène de la cave sont également primordiales pour une bonne implantation.

DOSE D'EMPLOI

- 15 - 30 g/hL.
- Dans le cas de macération préfermentaire à froid, il est conseillé de levurer à 5 g/hL à l'encuvage, pour dominer la flore indigène, puis de compléter avec 15 à 25 g/hL à la fin de la macération à froid, avant de remonter la température.

MISE EN ŒUVRE

- Bien suivre le protocole de réhydratation de la levure.
- Éviter les différences de température supérieures à 10°C entre le moût et le levain lors de l'inoculation. Le temps total de préparation du levain ne doit pas excéder 45 minutes.
- Dans le cas de vendange à fort degré potentiel et pour minimiser la formation d'acidité volatile, utiliser SUPERSTART® ROUGE dans l'eau de réhydratation.

CONSERVATION

- Conserver, au frais hors sol dans l'emballage d'origine, dans des locaux secs non susceptibles de communiquer des odeurs.
- DLUO : 4 ans.

CONDITIONNEMENT

Sachet sous vide de 500g. Carton de 10kg.



CS 61 611 – 33072 BORDEAUX CEDEX – Tél: +33 (0)5 56 86 53 04 – www.laffort.com

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Amorós, M. and Estruch, F. (2001) 'Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner', *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 39(6), pp. 1523–1532. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02339.x.
- Andjelković, U., Giacometti, J. and Josić, D. (2017) 'Protein and peptide separations', in *Liquid Chromatography: Applications: Second Edition*, pp. 107–157. doi: 10.1016/B978-0-12-805392-8.00005-0.
- Bartels, D. (2005) 'Desiccation tolerance studied in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*', *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), pp. 696–701. doi: 10.1093/icb/45.5.696.
- Battaglia, M. *et al.* (2008) 'The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins', *Plant Physiology*, 148(1), pp. 6–24. doi: 10.1104/pp.108.120725.
- Bellini, S. *et al.* (2017) 'Heat Shock Proteins in Vascular Diabetic Complications: Review and Future Perspective', *International journal of molecular sciences*, 18(12). doi: 10.3390/ijms18122709.
- Blondin, B. (2008) 'Hybridation et OGM : le point sur les stratégies d'amélioration des levures'.
- Bonner, J. J., Ballou, C. and Fackenthal, D. L. (1994) 'Interactions between DNA-bound trimers of the yeast heat shock factor.', *Molecular and Cellular Biology*, 14(1), pp. 501–508. doi: 10.1128/mcb.14.1.501.
- Boy-Marcotte, E. *et al.* (1999) 'The heat shock response in yeast: Differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons', *Molecular Microbiology*, 33(2), pp. 274–283. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01467.x.
- Brgles, M. *et al.* (2011) 'Selectivity of monolithic supports under overloading conditions and their use for separation of human plasma and isolation of low abundance proteins', *Journal of Chromatography A*, 1218(17), pp. 2389–2395. doi: 10.1016/j.chroma.2010.11.059.
- Briand, L. (2017) 'Le goût : de la molécule à la saveur', *La Chimie et les Sens*. (hal-01528068).
- Carrasco, P., Querol, A. and Del Olmo, M. (2001) 'Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains', *Archives of Microbiology*, 175(6), pp. 450–457. doi: 10.1007/s002030100289.
- Chang, Z. *et al.* (1996) 'Mycobacterium tuberculosis 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure in vitro to suppress thermal aggregation', *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), pp. 7218–7223. doi: 10.1074/jbc.271.12.7218.
- Charpentier, C. *et al.* (2005) 'Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: Kinetics and potential impact on flavor', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), pp. 3000–3007. doi: 10.1021/jf040334y.
- Chu, D. and Barnes, D. J. (2016) 'The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep25191.

- Cretin, B. N. *et al.* (2019) 'Taste-guided isolation of sweet-tasting compounds from grape seeds, structural elucidation and identification in wines', *Food Chemistry*, 272, pp. 388–395. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.070.
- DuBois, G. E. (2016) 'Molecular mechanism of sweetness sensation', *Physiology and Behavior*, 164, pp. 453–463. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.03.015.
- Dure, L. and Galau, G. A. (1981) 'Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination', *Plant Physiology*, 68(1), pp. 187–194. doi: 10.1104/pp.68.1.187.
- Erkina, T. Y. and Erkin, A. M. (2006) 'Displacement of Histones at Promoters of *Saccharomyces cerevisiae* Heat Shock Genes Is Differentially Associated with Histone H3 Acetylation', *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), pp. 7587–7600. doi: 10.1128/mcb.00666-06.
- Estruch, F. (2000) 'Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast', *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), pp. 469–486. doi: 10.1016/S0168-6445(00)00035-8.
- Faurion, A. (2000) *Physiologie de la gustation, Encyclopédie Médico-Chirurgicale*.
- Faus, I. (2000) 'Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins', *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 145–151. doi: 10.1007/s002530050001.
- Ferguson, S. B. *et al.* (2005) 'Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 169(3), pp. 1203–1214. doi: 10.1534/genetics.104.034256.
- Fornairon-Bonnefond, C. *et al.* (1999) 'Observations on the oxygen consumption during maturation of wines on lees', *OENO One*, 33(2), p. 79. doi: 10.20870/oenone.1999.33.2.1030.
- Fornairon-Bonnefond, C. *et al.* (2002) 'New Trends on Yeast Autolysis and Wine Ageing on Lees: a Bibliographic Review État Des Connaissances Scientifiques Actuelles Sur Le Phénomène D'Autolyse Des Levures Et L'Élevage Des Vins Sur Lies', 36(2), pp. 49–69.
- Fu, M. S., de Sordi, L. and Mühlischlegel, F. A. (2012) 'Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from *Candida albicans*', *PLoS ONE*, 7(8), p. 42894. doi: 10.1371/journal.pone.0042894.
- Garay-Arroyo, A. *et al.* (2000) 'Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit', *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), pp. 5668–5674. doi: 10.1074/jbc.275.8.5668.
- García-Almeida, J. M. *et al.* (2018) 'Sweeteners: Regulatory Aspects', *Reference Series in Phytochemistry*. Springer International Publishing AG, pp. 613–642. doi: 10.1007/978-3-319-27027-2_12.
- GE Healthcare Life Science (2013) *Multimodal Chromatography Handbook*.

- Görner, W. *et al.* (1998) 'Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity', *Genes and Development*, 12(4), pp. 586–597. doi: 10.1101/gad.12.4.586.
- Goyal, K. *et al.* (2003) 'Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein', *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), pp. 12977–12984. doi: 10.1074/jbc.M212007200.
- De Groot, E. *et al.* (2000) 'Very low amounts of glucose cause repression of the stress-responsive gene HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae*', *Microbiology*, 146(2), pp. 367–375. doi: 10.1099/00221287-146-2-367.
- Gutin, J. *et al.* (2015) 'Condition-specific genetic interaction maps reveal crosstalk between the cAMP / PKA and the HOG MAPK pathways in the activation of the general stress response', *Molecular Systems Biology*, 11(10), p. 829. doi: 10.15252/msb.20156451.
- Hand, S. C. *et al.* (2011) 'LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore', *Annual Review of Physiology*, 73(1), pp. 115–134. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142203.
- Harada, S. *et al.* (1994) 'Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of curculin: A new type of sweet protein having taste-modifying action', *Journal of Molecular Biology*, 238(2), pp. 286–287. doi: 10.1006/jmbi.1994.1289.
- Haslbeck, M. *et al.* (1999) 'Hsp26: a temperature-regulated chaperone', *The EMBO Journal*, 18(23), pp. 6744–6751.
- Haslbeck, M. *et al.* (2005) 'Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(10), pp. 842–846. doi: 10.1038/nsmb993.
- Hennicke, J. *et al.* (2019) 'Impact of temperature and pH on recombinant human IgM quality attributes and productivity', *New Biotechnology*, 50, pp. 20–26. doi: 10.1016/j.nbt.2019.01.001.
- Herbert, A. P. *et al.* (2012) 'NMR structure of Hsp12, a protein induced by and required for dietary restriction-induced lifespan extension in yeast', *PLoS ONE*, 7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0041975.
- Hodges, R. S., Lorne Burke, T. W. and Mant, C. T. (1988) 'Preparative purification of peptides by reversed-phase chromatography. Sample displacement mode versus gradient elution mode', *Journal of Chromatography A*, 444(C), pp. 349–362. doi: 10.1016/S0021-9673(01)94036-1.
- Hofstee, B. H. J. (1973) 'Hydrophobic affinity chromatography of proteins', *Analytical Biochemistry*. Academic Press, 52(2), pp. 430–448. doi: 10.1016/0003-2697(73)90046-8.
- Holmberg, C. I. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1', *EMBO Journal*, 20(14), pp. 3800–3810. doi: 10.1093/emboj/20.14.3800.
- Horváth, I. *et al.* (2008) 'Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier, 1778(7–8), pp. 1653–1664. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.02.012.

- Hufnagel, J. C. and Hofmann, T. (2008) 'Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), pp. 1376–1386. doi: 10.1021/jf073031n.
- Inglett, G. E. and May, J. F. (1969) 'Serendipity Berries—Source of a New Intense Sweetener', *Journal of Food Science*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 34(5), pp. 408–411. doi: 10.1111/j.1365-2621.1969.tb12791.x.
- ISO 13301:2018 - *Analyse sensorielle -- Méthodologie -- Recommandations générales pour le mesurage des seuils de détection d'odeur, de flaveur et de goût par une technique à choix forcé de 1 parmi 3 (3-AFC)* (2018).
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. E. and Del Olmo, M. lí (1999) 'An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study', *Biotechnology and Bioengineering*, 64(6), pp. 698–708. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990920)64:6<698::AID-BIT9>3.0.CO;2-Z.
- Izawa, S. *et al.* (2008) 'Heat shock and ethanol stress provoke distinctly different responses in 3'-processing and nuclear export of HSP mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochemical Journal*, 414(1), pp. 111–119. doi: 10.1042/BJ20071567.
- Jakobsen, B. K. and Pelham, H. R. (1988) 'Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo.', *Molecular and Cellular Biology*, 8(11), pp. 5040–5042. doi: 10.1128/mcb.8.11.5040.
- Jones, P. R. *et al.* (2008) 'The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine', *Food Quality and Preference*, 19(6), pp. 596–607. doi: 10.1016/j.foodqual.2008.03.005.
- Joseph, J. A. *et al.* (2019) 'Bioproduction of the recombinant SWEET protein thaumatin: Current state of the art and perspectives', *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 10(APR), p. 695. doi: 10.3389/fmicb.2019.00695.
- Karreman, R. J. and Lindsey, G. G. (2005) 'A rapid method to determine the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12:green fluorescent protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter', *Journal of Biomolecular Screening*, 10(3), pp. 253–259. doi: 10.1177/1087057104273485.
- Kennedy, L. A., Kopaciewicz, W. and Regnier, F. E. (1986) 'Multimodal liquid chromatography columns for the separation of proteins in either the anion-exchange or hydrophobic-interaction mode', *Journal of Chromatography A*, 359(C), pp. 73–84. doi: 10.1016/0021-9673(86)80063-2.
- Kim, S. X. *et al.* (2018) 'Synergy between the small intrinsically disordered protein Hsp12 and trehalose sustain viability after severe desiccation', *eLife*, 7. doi: 10.7554/eLife.38337.
- Kleinsmidt, L. S. (2010) *The effect of osmotic stress and Hsp12 on passive and active transport in the yeast Saccharomyces cerevisiae*.
- Koag, M. C. *et al.* (2003) 'The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity', *Plant Physiology*, 131(1), pp. 309–316. doi: 10.1104/pp.011171.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) 'A simple method for displaying the hydropathic character of a protein', *Journal of Molecular Biology*, 157(1), pp. 105–132. doi: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.

- Lavigne, V. and Dubourdieu, D. (1996) 'Mise En Évidence Et Interprétation De L ' Aptitude Des Lies À Éliminer Demonstration and Interpretation of the Yeast Lee Ability To Adsorb', *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 30(4), pp. 201–206.
- Ledoux, V., Dulau, L. and Dubourdieu, D. (1992) 'Interprétation de l'amélioration de la stabilité protéique des vins au cours de l'élevage sur lies', *OENO One*, 26(4), p. 239. doi: 10.20870/oenone.1992.26.4.1188.
- Léger, A. *et al.* (2017) 'Production and Purification of the Native *Saccharomyces cerevisiae* Hsp12 in *Escherichia coli*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), pp. 8154–8161. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02477.
- Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988) 'The heat-shock proteins', *Annu. Rev. Genei*, 12, pp. 6–7.
- Liu, X. *et al.* (1993) 'Purification, complete amino acid sequence and structural characterization of the heat-stable sweet protein, mabinlin II', *European Journal of Biochemistry*, 211(1–2), pp. 281–287. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb19896.x.
- Locke, D. C. (1973) 'Chemically bonded stationary phases for liquid chromatography', *Journal of Chromatographic Science*, 11(3), pp. 120–128. doi: 10.1093/chromsci/11.3.120.
- Lorin, A. *et al.* (2004) 'Les liposomes: Description, fabrication et applications', *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 8(3), pp. 163–176.
- Maehashi, K. and Udaka, S. (1998) 'Sweetness of lysozymes', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 62(3), pp. 605–606. doi: 10.1271/bbb.62.605.
- Maier, T., Güell, M. and Serrano, L. (2009) 'Correlation of mRNA and protein in complex biological samples', *FEBS Letters*, 583(24), pp. 3966–3973. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.036.
- Marchal, A. *et al.* (2011b) 'Identification of new natural sweet compounds in wine using centrifugal partition chromatography-gustatometry and Fourier transform mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, 83(24), pp. 9629–9637. doi: 10.1021/ac202499a.
- Marchal, A. *et al.* (2011a) 'Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: Role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), pp. 2004–2010. doi: 10.1021/jf103710x.
- Marchal, A. *et al.* (2015) 'Fermentative conditions modulating sweetness in dry wines: Genetics and environmental factors influencing the expression level of the *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), pp. 304–311. doi: 10.1021/jf504408t.
- Martínez-Pastor, M. T. *et al.* (1996) 'The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE).', *The EMBO journal*, 15(9), pp. 2227–35.
- De Miguel, N., Echeverria, P. C. and Angel, S. O. (2005) 'Differential subcellular localization of members of the *Toxoplasma gondii* small heat shock protein family', *Eukaryotic Cell*, 4(12), pp. 1990–1997. doi: 10.1128/EC.4.12.1990-1997.2005.

- Ming, D. and Hellekant, G. (1994) 'Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B.', *FEBS Letters*, 355(1), pp. 106–108. doi: 10.1016/0014-5793(94)01184-2.
- Moine-Ledoux, V. *et al.* (1997) 'Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées (Mannostab™)', *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31(1), pp. 23–31.
- Moine, V. (2005) 'Procédé de traitement d'une boisson en vue d'augmenter sa sucrosité et compose destiné à être ajouté à une boisson en vue d'augmenter sa sucrosité'.
- Van Montfort, R., Slingsby, C. and Vierling, E. (2002) 'Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones', *Advances in protein chemistry*, 59.
- Morimoto, R. I. and Westerheide, S. D. (2010) 'The heat shock response and the stress of misfolded proteins', in Ralph A. Bradshaw, E. A. D. (ed.) *Handbook of Cell Signaling*, 2/e. Academic Press, pp. 2231–2239. doi: 10.1016/B978-0-12-374145-5.00268-0.
- Morris, G. J., Winters, L. and Coulson A N, G. E. (2019) 'Effect of Osmotic Stress on the Ultrastructure and Viability of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of General Microbiology*, 129, pp. 2023–2034.
- Mtwisha, L. *et al.* (1998) 'HSP 12 is a LEA-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*', *Plant Molecular Biology*, 37(3), pp. 513–521. doi: 10.1023/A:1005904219201.
- Nakagawa, M. *et al.* (2001) 'Association of HSPB2, a member of the small heat shock protein family, with mitochondria', *Experimental Cell Research*, 271(1), pp. 161–168. doi: 10.1006/excr.2001.5362.
- Nguyen, K. T. *et al.* (2019) 'N-terminal methionine excision of proteins creates tertiary destabilizing N-degrons of the Arg/N-end rule pathway', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 294(12), pp. 4464–4476. doi: 10.1074/jbc.RA118.006913.
- Nitta, K. *et al.* (2005) 'Ultrastructural stability under high temperature or intensive light stress conferred by a small heat shock protein in cyanobacteria', *FEBS Letters*, 579(5), pp. 1235–1242. doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.095.
- Otterstedt, K. *et al.* (2004) 'Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *EMBO Reports*, 5(5), pp. 532–537. doi: 10.1038/sj.embor.7400132.
- Pacheco, A. *et al.* (2009) 'Small heat-shock protein Hsp12 contributes to yeast tolerance to freezing stress', *Microbiology*, 155(6), pp. 2021–2028. doi: 10.1099/mic.0.025981-0.
- Pezzini, J. *et al.* (2015) 'A comprehensive evaluation of mixed mode interactions of HEA and PPA HyperCel™ chromatographic media', *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 976–977, pp. 68–77. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.11.020.
- Pfeiffer, T. and Morley, A. (2014) 'An evolutionary perspective on the Crabtree effect', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1. doi: 10.3389/fmolb.2014.00017.

- Poirier, N. *et al.* (2012) 'Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *pichia pastoris*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), pp. 9807–9814. doi: 10.1021/jf301600m.
- Praekelt, U. M. and Meacock, P. A. (1990) 'HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function', *MGG Molecular & General Genetics*, 223(1), pp. 97–106. doi: 10.1007/BF00315801.
- Receveur-Bréhot, V. *et al.* (2006) 'Assessing protein disorder and induced folding', *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 62(1), pp. 24–45. doi: 10.1002/prot.20750.
- Réglement (UE) n°1129/2011 du 11 novembre 2011 (2011) *modifiant l'annexe II du règlement (CE) n°1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en vue d'y inclure une liste de l'Union des additifs alimentaires*. doi: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:FR:PDF>.
- Ribéreau-Gayon, P. *et al.* (2017) *Traité d'oenologie*. Edited by Dunod.
- Richter, K., Haslbeck, M. and Buchner, J. (2010) 'Molecular Cell Review The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death', *Molecular Cell*, 40, pp. 253–266. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.006.
- Ritossa, F. (1962) 'A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*', *Experientia*, 18(12), pp. 571–573. doi: 10.1007/BF02172188.
- Russouw, P. S. *et al.* (1997) 'The most prevalent protein in a heat-treated extract of pea (*Pisum sativum*) embryos is an LEA group I protein; its conformation is not affected by exposure to high temperature', *Seed Science Research*, 7(2), pp. 117–124. doi: 10.1017/s0960258500003457.
- Sales, K. *et al.* (2000) 'The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1463(2), pp. 267–278. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00215-1.
- Salvadó, Z. *et al.* (2011) 'Temperature adaptation Markedly Determines evolution within the genus *Saccharomyces*', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 77(7), pp. 2292–2302. doi: 10.1128/AEM.01861-10.
- Santarelli, X. and Cabanne, C. (2018) 'Mixed Mode Chromatography: A Novel Way Toward New Selectivity', *Current Protein & Peptide Science*, 20(1), pp. 14–21. doi: 10.2174/1389203718666171024121137.
- Schwanhüusser, B. *et al.* (2011) 'Global quantification of mammalian gene expression control', *Nature*, 473(7347), pp. 337–342. doi: 10.1038/nature10098.
- Singarapu, K. K. *et al.* (2011) 'Structural characterization of Hsp12, the heat shock protein from *Saccharomyces cerevisiae*, in aqueous solution where it is intrinsically disordered and in detergent micelles where it is locally α -helical', *Journal of Biological Chemistry*. JBC Papers in Press, 286(50), pp. 43447–43453. doi: 10.1074/jbc.M111.306464.
- Solomon, A. *et al.* (2000) 'Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein', *Parasitology*. Cambridge University Press, 121(4), pp. 409–416. doi: 10.1017/S0031182099006563.

- Sorger, P. K. and Pelham, H. R. (1987) 'Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast.', *The EMBO journal*, 6(10), pp. 3035–41.
- De Sousa Abreu, R. *et al.* (2009) 'Global signatures of protein and mRNA expression levels', *Molecular BioSystems*, 5(12), pp. 1512–1526. doi: 10.1039/b908315d.
- Stacy, R. A. P. and Aalen, R. B. (1998) 'Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of Group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*', *Planta*. Springer-Verlag, 206(3), pp. 476–478. doi: 10.1007/s004250050424.
- Stanley, D. *et al.* (2010) 'The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 109(1), pp. 13–24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x.
- Strahl, T. and Thorner, J. (2007) 'Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(3), pp. 353–404. doi: 10.1016/j.bbali.2007.01.015.
- Susek, R. E. and Lindquist, S. (1990) 'Transcriptional derepression of the *Saccharomyces cerevisiae* HSP26 gene during heat shock.', *Molecular and Cellular Biology*, 10(12), pp. 6362–6373. doi: 10.1128/mcb.10.12.6362.
- Szollosi, E. *et al.* (2008) 'Intrinsic structural disorder of DF31, a drosophila protein of chromatin decondensation and remodeling activities', *Journal of Proteome Research*, 7(6), pp. 2291–2299. doi: 10.1021/pr700720c.
- Takahashi, N. *et al.* (1990) 'Structural study of asparagine-linked oligosaccharide moiety of taste-modifying protein, miraculin.', *The Journal of biological chemistry*, 265(14), pp. 7793–8.
- Tang, X. and Bruce, J. E. (2009) 'Chemical cross-linking for protein-protein interaction studies.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Humana Press, 492, pp. 283–293. doi: 10.1007/978-1-59745-493-3_17.
- Tolteer, D. (2007) *Analyse structurale et fonctionnelle d'une protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant) mitochondriale exprimée dans les graines de pois*. Université d'Angers.
- Tompa, P. *et al.* (2015) 'Intrinsically disordered proteins: Emerging interaction specialists', *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd, 35, pp. 49–59. doi: 10.1016/j.sbi.2015.08.009.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), pp. 4350–4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Tsvetkova, N. M. *et al.* (2002) 'Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), pp. 13504–13509. doi: 10.1073/pnas.192468399.
- Tunnacliffe, A. and Wise, M. J. (2007) 'The continuing conundrum of the LEA proteins', *Naturwissenschaften*, 94(10), pp. 791–812. doi: 10.1007/s00114-007-0254-y.

- Uzawa, S. *et al.* (2004) 'Spindle Pole Body Duplication in Fission Yeast Occurs at the G1/S Boundary but Maturation Is Blocked until Exit', *Molecular Biology of the Cell*, 15(December), pp. 5219–5230. doi: 10.1091/mbc.E04.
- Varela, J. C. *et al.* (1995) 'The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A.', *Molecular and cellular biology*, 15(11), pp. 6232–45.
- Vergheze, J. *et al.* (2012) 'Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), pp. 115–158. doi: 10.1128/mmb.05018-11.
- Vignes, S., Dotson, C. D. and Munger, S. D. (2009) 'The receptor basis of sweet taste in mammals', *Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer, Berlin, Heidelberg, 47, pp. 187–202. doi: 10.1007/400_2008_2.
- Voellmy, R. and Boellmann, F. (2007) 'Chaperone regulation of the heat shock protein response', *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer New York, 594, pp. 89–99. doi: 10.1007/978-0-387-39975-1_9.
- Weinreb, P. H. *et al.* (1996) 'NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded', *Biochemistry*, 35(43), pp. 13709–13715. doi: 10.1021/bi961799n.
- van der Wel, H. and Loeve, K. (1972) 'Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth', *European Journal of Biochemistry*, 31(2), pp. 221–225. doi: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x.
- Welker, S. *et al.* (2010) 'Hsp12 Is an Intrinsically Unstructured Stress Protein that Folds upon Membrane Association and Modulates Membrane Function', *MOLCEL*, 39, pp. 507–520. doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.001.
- Wise, M. J. (2003) 'LEAping to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles', *BMC Bioinformatics*, 4. doi: 10.1186/1471-2105-4-52.
- Zhang, K. *et al.* (2015) 'A novel mechanism for small heat shock proteins to function as molecular chaperones', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(1), p. 8811. doi: 10.1038/srep08811.