Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2011

Thèse n° 1840

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement

Le 10 novembre 2011

Par

Rémi ZALLOT

Né le 25 septembre 1985 à Moyeuvre-grande (Moselle)

Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*

Étude d'AtTAGL

Membres du Jury

Pr Michel Hernould	Président du jury
Dr Frédéric Carrière	Rapporteur
Pr Yves Poirier	Rapporteur
Dr Frédéric Beisson	Examinateur
Dr René Lessire	Directeur du laboratoire
Dr Vincent Arondel	Directeur de thèse

Université Victor Ségalen Bordeaux 2

Année : 2011

Thèse n°1840

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Végétale

Présentée et soutenue publiquement

Le : 10 novembre 2011

Par : Rémi ZALLOT

Né le 25 septembre 1985 à Moyeuvre-Grande, Moselle

Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*

Étude d'AtTAGL

Membres du jury :

Pr Michel Hernould	Président
D ^r Frédéric Carrière	Rapporteur
Pr YVES POIRIER	Rapporteur
D ^r Frédéric Beisson	Examinateur
D ^r René Lessire	Directeur du laboratoire
D ^r Vincent Arondel	Directeur de thèse

À Sophie, Catherine et Jean-François

Remerciements

E voudrais tout d'abord exprimer mes plus profonds remerciements aux membres du jury à qui la tâche revient d'évaluer mon travail. Je tiens donc à remercier Yves Poirier qui a accepté de venir depuis Lausanne, Frédéric Carrière de Marseille et Frédéric Beisson de Cadarache. Je tiens à remercier tout spécialement Michel Hernould, non seulement pour avoir accepté d'être Président du jury, mais aussi et surtout pour sa participation à ma formation durant ma Licence puis mon Master. Je remercie très chaleureusement le Directeur du laboratoire René Lessire de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je veux à nouveau exprimer mes plus profonds respects à Vincent Arondel, mon directeur de thèse avec qui j'ai beaucoup appris et passé de bons moments.

Je remercie tous les membres du laboratoire, qu'ils aient été présents de bout en bout, seulement de passage ou qu'ils soient partis avant moi. Par ordre alphabétique des noms : Emmanuelle, Jean-Jacques, Claire, Jean-Luc, Denis, Franziska, Frédéric, Laetitia, Véronique, Jérome, Auriane, René, Lilly, Sébastien, Patrick, Stéphanie, Magali, Eric, Myriam et Valérie et je n'oublie surtout pas Françoise.

Je n'oublie pas non plus qu'avant d'avoir comme sujet d'étude les lipases, j'ai travaillé sur les radeaux membranaires, et je tiens donc à remercier une nouvelle fois les membres de l'équipe "Raft", et plus largement, les membres de l'équipe "Homéostasie membranaire".

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai été en contact durant ma thèse, que ce soit pour réaliser un clonage, faire de la microscopie ou simplement pour rire à table quelques minutes.

J'ajoute un remerciement particulier à tous les membres du Bureau des étudiants. Merci Brice, Lionel, Marina, Su de nous avoir laissé conquérir, avec Amélie, un espace de cette pièce, même si plus tard vous êtes partis pour laisser place à Artémis puis Claireline. Je remercie très spécialement bien sûr Amélie avec qui j'ai été ravi de travailler depuis le Master. Je remercie aussi les Masters qui sont passés brièvement, comme je l'avais fait avant eux.

Je remercie du plus profond de mon cœur ma soeur, mes parents et ma famille pour leur soutien quotidien.

Je conclurai en remerciant de tout mon cœur Maud.



Laboratoire de Biogenèse Membranaire CNRS UMR 5200 Université Bordeaux Segalen 146, rue Léo Saignat - Case 92 33076 Bordeaux Cédex

> Tél : 00 33 5 57 57 12 74 Fax : 00 33 5 56 51 83 61





Titre Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*

Résumé Les réserves d'huile de la graine d'Arabidopsis thaliana sont hydrolysées par des lipases au cours de la croissance post-germinative de la plantule. Une protéine capable de fixer un inhibiteur de lipase a été identifiée à partir d'un extrait de plantules de colza. La séquence de cette protéine ressemble à celles de lipases connues. L'expression transitoire du gène orthologue d'Arabidopsis chez Nicotiana benthamiana induit l'apparition d'une activité lipase. Ces données suggèrent que cette protéine est une lipase. Une étude de la localisation in vivo de cette enzyme chez Nicotiana benthamiana indique qu'elle est localisée au niveau des peroxysomes. Chez Arabidopsis, le gène codant pour cette lipase est exprimé essentiellement lors de la croissance des plantules, quand l'hydrolyse de l'huile est maximale. L'analyse d'un mutant montre que ce gène est responsable de l'essentiel de l'activité lipase mesurée pendant la mobilisation de l'huile de réserve. Ces données suggèrent que cette lipase pourrait être impliquée dans la mobilisation des réserves lipidiques pendant la croissance postgerminative. Néanmoins, l'hydrolyse des réserves n'est pas diminuée chez le mutant. Cela pourrait être lié à une compensation par d'autres lipases.

Mots-clés lipase; TAG; triacylglycérol; germination; plantule

Title Identification and characterization of a lipase expressed during *Arabidopsis thaliana* reserves hydrolysis

Abstract In germinating seedlings of Arabidopsis thaliana, fat storage breakdown is initiated by lipases. A protein capable to bind to a lipase inhibitor was identified from an extract of rape seedlings and its amino acid sequence found to resemble that of known lipases. Transient expression of the Arabidopsis orthologous gene led to a 100-fold increase in lipase activity in Nicotiana bethamiana leaves. Taken together, these data strongly suggest that this protein is indeed a lipase. In vivo localization studies using a GFP fusion protein in Nicotiana benthamiana as a transcient expression host showed a peroxisomal localization. In Arabidopsis, the gene coding for this lipase was found to be mainly expressed in seedlings during fat storage breakdown. Most lipase activity was abolished in germinating seedlings of an Arabidopsis mutant for this gene. These data suggest that this lipase is likely involved in the breakdown of fat storage in germinating seedlings of Arabidopsis. However, oil mobilization was not affected in Arabidopsis mutant plants. This might suggest that the effect of the mutation could be compensated for by other lipases.

Keywords lipase; TAG; triacylglycerol; germination; seedling

Table des matières

Ta	BLE	DES MA	ATIÈRES	IX
Lı	STE I	DES FIG	SURES	XIII
Lı	STE I	DES TAI	BLEAUX	XVI
Le	XIQU	Έ		XVII
Pr	ŔÉFAC	CE .		1
1	Inti	RODUC	TION BIBLIOGRAPHIQUE	3
	1.1	Généi	RALITÉS	5
		1.1.1	Le cycle de vie des plantes à fleurs	5
		1.1.2	Arabidopsis thaliana	6
	1.2	L'acc	UMULATION DES RÉSERVES DANS LA GRAINE D'ARABI-	
		DOPSI	S	7
		1.2.1	Composition de la graine sèche	9
		1.2.2	Les lipides	9
		1.2.3	Structure des triacylglycérols	11
		1.2.4	Acides gras de la graine d'Arabidopsis	11
		1.2.5	Localisation des réserves dans la graine d'Arabidopsis	12
	1.3	Dorm	IANCE, GERMINATION ET CROISSANCE POST-GERMINATIVE	15
		1.3.1	La dormance	15
		1.3.2	Le passage de la germination à la croissance post-	
			germinative	15
	1.4	L′hyd	ROLYSE DES RÉSERVES POUR LA CROISSANCE POST-	
		GERM	INATIVE CHEZ ARABIDOPSIS	18
		1.4.1	Le catabolisme des réserves lipidiques chez Arabidopsis .	18
		1.4.2	Organisation spatiale de la β -oxydation et de l'hydrolyse	
			des réserves	23
		1.4.3	Organisation temporelle de l'hydrolyse des réserves	25
		1.4.4	Régulation de l'hydrolyse des réserves	26
	1.5	Les li	IPASES	29
		1.5.1	Lipases et estérases : définitions	29
		1.5.2	Propriétés biochimiques	30
		1.5.3	Mode d'action des lipases : paramètres cinétiques	31
		1.5.4	Structure	32
		1.5.5	Mécanisme enzymatique	35
		1.5.6	L'émergence d'une nouvelle classe de lipases : les lipases	
			à domaine patatine	35
		1.5.7	Le dosage de l'activité des lipases	37

		1.5.8	Inhibiteurs de lipases	38
	1.6	Lipol	YSE CHEZ LES PLANTES	41
		1.6.1	Caractérisation des activités lipase détectées chez les	
			plantes supérieures	45
		1.6.2	Tentatives d'identification de lipases par homologie de sé-	
			quence	50
		1.6.3	Identification et caractérisation de SDP1	51
		1.6.4	Organisation de l'activité lipase au cours du temps	57
	Con	CLUSIC	DN	58
2	Тъл	VATE D	ÉALICÉ AVANT MON ADDIVÉE EN TUÈCE	-0
2		EDACT	EALISE AVANT MON ARRIVEE EN THESE	59 60
	2.1	FRACI	TIONNEMENT DE L'ACTIVITÉ LIPASE	60
	2.2		L'HISSEMENT DE L'ACTIVITE LIPASE	61
	2.3	IVIAKÇ	QUAGE PAR LA TETRAHYDROLIPSTATINE	61
	2.4	TATE T	IFFICATION DE PROTEINES CANDIDATES	61
	2.5	IAILL	E DE LA LIPASE PUTATIVE	64
	CON	CLUSIC	JN	64
3	Rés	ULTATS	s et Discussion	67
0	3.1	Étudi	ES PRÉLIMINAIRES	69
	5	3.1.1	Étude génomique	69
		3.1.2	Étude de l'expression d'AtTAGL	73
		3.1.3	Étude de la protéine	75
		3.1.4	Profil de la mobilisation des réserves lipidiques	83
	3.2	Expre	ESSION HÉTÉROLOGUE	85
	5	3.2.1	Clonages pour l'expression hétérologue de l'enzyme At-	5
		5	TAGL	86
		3.2.2	Expression hétérologue chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	89
		3.2.3	Test de la présence de la protéine par western blot	90
	3.3	Profi	L D'EXPRESSION DES GÈNES DE LA FAMILLE D'ATTAGL .	91
	55	3.3.1	AtTAGL est le seul gène de la famille multigénique à être	-
		55	exprimé pendant la croissance post-germinative	92
		3.3.2	Étude <i>in vivo</i> du promoteur d'AtTAGL	94
	3.4	Loca	LISATION SUB-CELLULAIRE	102
	51	3.4.1	Constructions	102
		3.4.2	L'agroinfiltration avec les constructions contenant At-	
		5.	TAGL entraîne de la mort cellulaire chez <i>Nicotiana tabacum</i>	102
		3.4.3	AtTAGL est co-localisée avec un marqueur du peroxy-	
		5.5	some chez Nicotiana benthamiana	104
		3.4.4	Localisation in vivo chez des plantules d'Arabidopsis thaliana	106
	3.5	Fonc	TION PHYSIOLOGIQUE ET RÔLE <i>in vivo</i>	108
	55	3.5.1	Mutant attagl d'Arabidopsis	108
		3.5.2	Contrôle quant-à la lignée SALK_145591	109
		3.5.3	Nécessité d'autres lignées mutantes <i>attagl</i>	110
		3.5.4	L'activité lipase est affectée dans le mutant d'insertion	112
		3.5.5	L'activité lipase soluble d'Arabidopsis est sensible à la	
			THL, tout comme celle du colza	114
		3.5.6	Les mutants attagl présentent un léger retard de germi-	ſ
		55-	nation mais ne présentent pas de différence avec le type	
			sauvage pour la croissance post-germinative	115
)

		3.5.7	Le profil d'hydrolyse de l'huile est similaire chez les	
			plantes sauvages et mutantes <i>attagl</i>	116
		3.5.8	Compensation possible à l'absence d'AtTAGL par une	
			modification du profil d'expression d'autres lipases	117
4	Cor	NCLUSI	ons et Perspectives	121
	4.1	Conc	LUSIONS	122
		4.1.1	AtTAGL est-elle une TAG lipase?	122
		4.1.2	AtTAGL intervient-elle dans l'hydrolyse de l'huile de ré-	
			serve?	122
		4.1.3	Comment AtTAGL pourrait-elle intervenir dans l'hydro-	
			lyse de l'huile de réserve?	123
		4.1.4	Si AtTAGL ne joue aucun rôle dans l'hydrolyse des li-	
			pides de réserve, à quoi pourrait-elle servir?	124
	4.2	Persp	PECTIVES	124
		4.2.1	Perspectives évidentes immédiates	124
		4.2.2	Perspectives à plus long terme	125
	4.3	Нуро	THÈSE	126
5	Ma	TÉRIEL	et Méthodes	120
)	5.1	Étudi	E BIOINFORMATIOUE	131
	5.2	Mate	RIELS BIOLOGIOUE	132
	5	5.2.1	Matériel végétal et conditions de culture	132
		5.2.2	Souches bactériennes et milieux de culture	134
		5.2.3	Souche de levure et milieu de culture	135
	5.3	Ме́тн	IODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	136
	5 5	5.3.1	Extraction des acide nucléiques	136
		5.3.2	Amplification d'acides nucléiques	137
		5.3.3	RT-PCR quantitative	137
		5.3.4	Clonages	139
		5.3.5	Constructions moléculaires réalisées	142
	5.4	Méth	IODES D'ANALYSE DES LIPIDES	146
		5.4.1	Matériel utilisé pour les extractions et analyses de lipides	146
		5.4.2	Extraction de lipides de plantules d'Arabidopsis	146
		5.4.3	Analyse globale de la quantité en acides gras	147
		5.4.4	Séparation en chromatographie sur couche mince des es-	
			pèces moléculaires de lipides neutres	147
	5.5	Méth	ODES D'ANALYSE DES PROTÉINES	148
		5.5.1	Quantification	148
		5.5.2	Électrophorèse en conditions dénaturantes	148
		5.5.3	Western Blot	149
	5.6	Mesu	RE DE L'ACTIVITÉ LIPASE	149
		5.6.1	Principe	149
		5.6.2	Purification de la trioléine radiomarquée	150
		5.6.3	Préparation de l'extrait pour la mesure de l'activité lipase	150
		5.6.4	Mesure de l'activité lipase	150
	5.7	Ме́тн	ODE DE TRANSFORMATION DES PLANTES	151
		5.7.1	Transformation stable d'Arabidopsis thaliana par Agrobacte-	
			rium tumefaciens	151

		5.7.2	Transformation pour l'expression transitoire chez Arabi-	
			dopsis thaliana	152
		5.7.3	Transformation pour l'expression transitoire chez Nico-	
			tiana tabacum et Nicotiana benthamiana	152
	5.8	Obsef	RVATIONS	152
		5.8.1	Microscopie confocale	152
		5.8.2	Loupe binoculaire	153
Bī	BLIO	GRAPH	IE	155
А	Ani	NEXES		167
	A.1	Anne	xes du chapitre 2 : Travail réalisé avant mon ar-	-
		RIVÉE		i
	A.2	Anne	xes du chapitre 3 : Résultat et Discussion	iii
	A.3	Anne	xes du chapitre 4 : Matériels et méthodesRésultat	
		et Dis	SCUSSION	xi

LISTE DES FIGURES

1.1	Le cycle de vie des plantes à fleur (source : eduMedia)	5
1.2	Morphogenèse embryonnaire et maturation de la graine	
	d'Arabidopsis (d'après Baud et al. 2008)	8
1.3	Composition d'une graine sèche mature d'Arabidopsis (éco-	
	type Wassilewskija d'après Li-Beisson et al. 2010)	9
1.4	Structure chimique d'un triacylglycérol : le tripalmitoylgly-	
	cérol	11
1.5	Schéma des étapes permettant la synthèse des triacylglycé-	
	rols (d'après Baud et Lepiniec 2010)	12
1.6	Schéma représentant la formation et la structure d'un corps	
	lipidique (d'après Shimada et Hara-Nishimura 2010)	13
1.7	Dissection d'une graine sèche d'Arabidopsis (d'après Li	
	et al. 2006)	14
1.8	Représentation de la complexe régulation de la germination	
	(Bentsink et Koornneef 2008)	16
1.9	Les étapes de la graine mature à la croissance post-	
	germinative (Bentsink et Koornneef 2008)	17
1.10	Diagramme schématique des étapes du catabolisme des	
	TAGs (d'après Rylott et al. 2001)	19
1.11	Voie du catabolisme des TAGs mis en évidence par géné-	
	tique inverse (Graham 2008).	21
1.12	Accolements corps lipidiques - glyoxysomes visibles en mi-	
	croscopie électronique (Graham 2008)	23
1.13	Fusions corps lipidiques - vacuole visibles en microscopie	
	électronique (Poxleitner et al. 2006)	24
1.14	Profils des processus impliqués dans l'hydrolyse des ré-	
	serves au cours du temps (Hooks et al. 2010)	25
1.15	Vague de mobilisation des réserves dans la graine d'Arabi-	
	dopsis (Penfield et al. 2004)	26
1.16	Activités coordonnées temporellement de différentes en-	
	zymes du catabolisme des TAGs (Rylott et al. 2001)	27
1.17	Les lipases catalysent l'hydrolyse des liaisons ester des TAGs.	29
1.18	Schéma d'hydrolyse complète d'un TAG	31
1.19	Hydrolyse comparée de la triacétine par l'estérase hépa-	
	tique de cheval et la lipase pancréatique de porc illustrant le	
	phénomène d'activation interfaciale (d'après Sarda et Des-	
	nuelle 1958)	33
1.20	Modèle cinétique interfacial de Verger et De Haas 1973(tiré	
	de Carrière 2008)	33

1.21	Représentation de la structure secondaire du repliement	
	α/β caractéristique des estérases, et retrouvé chez les lipases	
	(Dijkstra et Nardini 1999)	34
1.22	Mode d'action de l'hydrolyse d'une liaison ester (Beer et al.	
	1996)	36
1.23	Inhibition covalente d'une lipase par la THL (d'après Luthi-	5
5	Peng et al. 1992).	40
1.24	Succession des activités lipases chez le ricin (Muto et Bee-	•
	vers 1974).	47
1.25	Illustration du phénotype Sugar Dependent de plantes mu-	17
	tantes sdn1 (Eastmond 2006)	52
1 26	Activité linase chez les mutants <i>sdn</i> (Eastmond 2006)	52
1.20	Évolution de la quantité de TAG chez des plantes sauvages	55
1.2/	(WT) et mutantes sdn1-1 au cours du temps (Fastmond 2006)	E 4
1 28	Profil d'expression du gène schri (Eastmond 2006)	54 56
1.20	1 Ioni d'expression du gene supi (Lastinond 2000)	50
2.1	Révélation d'une bande unique par la tétrahydrolipstatine	
	radiomarquée	62
2.2	Profil chromatographique obtenu après Filtration sur gel .	63
2.3	Alignement de BnTAGL généré à partir du contig créé et	-)
,	d'AtTAGL, et peptides obtenus par MS MS	65
2.4	Alignement des protéines candidates BnTAGL (recons-	J
4	truite) AtTAGL avec la lipase caractérisée de Ricin RcOBL1	66
	trate,, minol avec la lipude caracteridee de lacin reobbi	00
3.1	Modèles informatiques de l'épissage d'At1g45201 et ESTs	
-	chez les genres Arabidopsis et Brassica	70
3.2	Environnement des 3 résidus de la triade catalytique	72
3.3	Phylogénie moléculaire de la famille élargie d'AtTAGL	73
3.4	Structure secondaire AtTAGL	77
3.5	Modèles proposé pour le positionnement de l'enzyme At-	
5.5	TAGL par rapport à la membrane	79
3.6	Localisation des acides aminés de la triade catalytique dans	. /
5	la structure 3D modélisée par le logiciel Phyre 2	81
3.7	Localisation des acides aminés de la triade catalytique dans	
51	la structure 3D modélisée par le logiciel Phyre 2	82
3.8	Évolution des lipides au cours de la croissance post-	
5.0	germinative pour une plante de type sauvage	83
3.0	Évolution de la vitesse de dégradation des acides gras au	J
5.9	cours du temps	85
2 10	Représentation des constructions réalisées	88
2.10 2.11	Expression relative d'AtTACL chez des plantes de types	00
3.11	sauvages et chez des plantes surevprimant AtTACI	80
2 1 2	Activité lipaso dans dos fouillos do Nicotiana hanthamiana	09
3.12	agroinfiltrées avec des constructions surevoriment rAtTACI	00
0.10	Expression d'AtTACL et d'Atagt 1260 dans la plante au	90
3.13	cours do la maturation de la graine et de la graine au	
	cours de la maturation de la graine et de la croissance post-	6 -
	A stimultá CHC nonnéognament l'a discussion de l'Alt	93
3.14	Activite GUS representant l'activite du promoteur d'At-	a -
	IAGL durant la croissance post-germinative (la lignée Gusi)	95

3.15	Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-	
	TAGL dans divers organes de la plante	96
3.16	Coloration au Fat red B illustrant la distribution des réserves	
	au sein d'une plantule 4 jours après l'imbibition	99
3.17	Modèle comparatif entre une hydrolyse complète des TAGs,	
	et une hydrolyse régulée de proche en proche	101
3.18	Mort cellulaire liée à l'expression de formes recombinantes	
	d'AtTAGL chez Nicotiana tabacum	103
3.19	Microscopie confocale permettant de mettre en évidence la	
	colocalisation entre AtTAGL-ECGFP et PEX2-ECGFP dans	
	les cellules épidermiques de Nicotiana benthamiana	105
3.20	Microscopie confocale permettant de mettre en évidence la	
	fluorescence des constructions contenant ECGFP	107
3.21	Identification d'une plante homozygote porteuse d'un	
	transgène dans le promoteur d'AtTAGL	110
3.22	Site exact de l'insertion du transgène dans le promoteur	
	d'AtTAGL	111
3.23	Mesure de l'expression d'AtTAGL chez des plantes sau-	
5 5	vages et mutantes <i>attagl</i>	111
3.24	Activité lipase de la fraction soluble au cours du temps chez	
51	des plantes de type sauvage et mutantes pour AtTAGL	112
3.25	Sensibilité de l'activité lipase mesurée à la THL	114
3.26	Germination des plantes sauvages et mutantes <i>attagl</i>	115
3.27	Évolution comparée des lipides neutres	117
3.28	Évolution comparée des acides gras totaux et de l'acide éï-	/
J.=\$	cosanoïque au cours de la croissance post-germinative	118
3.20	Évolution comparée des niveaux d'expression de différents	110
J. <u>_</u> y	gènes codant pour des lipases au cours de la croissance	
	post-germinative	119
	1 0	
A.1	Schéma représentant le contig créé à partir des EST obtenues.	. ii
A.2	ORF prédits par Vector NTI à partir du contig généré	ii
A.3	Sequence génomique complète du locus At1g45201	iii
A.4	Mort cellulaire liée à l'expression de formes recombinantes	
	d'AtTAGL chez Nicotiana tabacum	iv
A.5	Expression des formes longue At1g45201.1 et courte	
	At1g45201.2 d'AtTAGL	v
A.6	Séquence complète de l'enzyme AtTAGL	vi
A.7	Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-	
	TAGL durant la croissance post-germinative (la lignée Gus2)	vii
A.8	Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-	
	TAGL au jour 4 après imbibition chez une plantule étiolée .	vii
A.9	Site exact de l'insertion du transgène dans le promoteur	
-	d'AtTAGL (partie 2)	viii
A.10	Absence de phénotype à l'issue de la croissance post-	
	germinative	ix
A.11	Coloration des corps lipidiques au rouge de nile chez des	
	plantules sauvages à 5 jours après l'imbibition	x

LISTE DES TABLEAUX

1.1	Acides gras des TAGs d'une graine d'Arabidopsis (d'après Li-Beisson et al. 2010).	12
1.2	Importance des différents tissus de la graine d'Arabidopsis, en poids et quantité d'huile correspondante (d'après Li et al.	15
1.3	Gènes identifiés par génétique inverse et impliqués dans le catabolisme des TAGs pour la croissance post-germinative (d'après Graham 2008)	22
2.1	Étapes de centrifugation, rendement et enrichissement de	6
2.2	Protéines détectées dans la bande de 42 kDa	61 63
2.3	RcOBL1, et CpLIP1	64
3.1	Requête WUBlastP réalisée avec AtTAGL contre l'ensemble des protéines du TAIR démontrant la présence d'une famille	
3.2	Identité et similarité entre AtTAGL et les membres de la famille multigénique chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	71 71
5.1	Amorces utilisées pour identifier les plantes homozygotes mutantes <i>attagl</i>	132
5.2	Amorces utilisées pour les quantifications de l'expression	120
5.3	Amorces utilisées pour la réalisation des constructions dans	139
5.4	Amorces utilisées pour la création du aMiRNA contre At-	141
5.5 5.6	Principe des PCR successives pour la réalisation du aMiRNA Amorces utilisées pour la création des fusions ECGFP At-	144 144
	TAGL	144
A.1	EST qui permettent la formation d'un contig correspondant à BnTAGL	i

Lexique

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center
AG(s)	Acide(s) gras
aMiRNA	Micro RNA artificiel
BET	Bromure d'éthidium
Col:o	Columbia:o
Cter	Carboxy terminal
DNA / ADN	Deoxyribonucleic acid / acide désoxyribonucléique
DO	Densité optique
ECGFP	Enhanced cyan green fluorescent protein
	(Protéine fluorescente améliorée Cyan vert)
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EST	Expressed sequence tag (marqueur de séquence exprimée)
For	Forward (sens)
GUS	β -glucuronidase
KD	Knock down
КО	Knock out
LB	Left border (bord gauche)
LB	Luria-Bertani
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MS	Murashige et Skoog
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
Nter	Amino terminal
OB	Oil body (corps lipidique)
pb	paire(s) de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PEG	Poly ethylène glycol
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
R+H	radicule + hypocotyle
RB	Right border (bord droit)
RE ou ER	réticulum endoplasmique
Rev	Reverse (antisens)
RNA / ARN	Ribonucleic acid / acide ribonucléique
RT PCRq	Real time PCR quantitative (PCR quantitative en temps réel)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TAG(s)	Triacylglycérol(s)
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
T-DNA	Transfer DNA (ADN de transfert)
THL	Tétrahydrolipstatine
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultraviolet
YFP	Yellow fluorescent protein (Protéine fluorescente jaune)

Avant-propos

DURANT la croissance post-germinative, les réserves de la graine sont mobilisées pour entretenir la croissance de l'embryon jusqu'à l'apparition des premières vraies feuilles. Chez *Arabidopsis thaliana*, la forme principale de mise en réserve dans la graine est l'huile, formée de triacylglycérols (TAGs), qui représentent jusqu'à 45 % du poids d'une graine mature. Le catabolisme des TAGs est initié par l'action de TAG-lipases, qui les clivent en acides gras et glycérol. Les acides gras ainsi libérés entrent dans la voie de la β -oxydation qui produit de l'acétyl-CoA, entrant à son tour dans le cycle glyoxylique. Les produits du cycle glyoxylique permettent la gluconéogenèse pour la formation des sucres qui sont utilisés pour le développement de l'embryon. Les TAG-lipases sont les premières enzymes impliquées dans le catabolisme des TAGs, et en ce sens, elles sont essentielles à la croissance de la plantule. Les mécanismes qui contrôlent leurs actions ne sont pas connus.

L'objectif de cette thèse était de caractériser un gène codant pour une possible TAG lipase, identifiée avant mon arrivée en thèse, et d'en définir la fonction.

Le *premier chapitre* présente les éléments importants de la littérature en rapport avec mon sujet de recherche. Ce chapitre a pour but de bien appréhender les données qui sont présentées dans les chapitres suivants.

Le *deuxième chapitre* est un résumé du travail qui a été réalisé avant mon arrivée en thèse par R. Dhouib et H. Manzoor. Ces résultats, non publiés, sont indispensables à la compréhension du travail que j'ai réalisé. C'est pour cette raison que j'ai jugé utile de les présenter brièvement.

Le *troisième chapitre* présente les résultats et expériences que j'ai réalisées. Les résultats sont accompagnés d'une courte discussion à propos des éléments importants, et des éléments de la bibliographie présentée dans le premier chapitre.

Le *quatrième chapitre* constitue la discussion générale à laquelle sont ajoutées les perspectives envisageables pour la suite du travail, en complément de ce qui a été réalisé.

Le *cinquième et dernier chapitre* présente le matériel et les méthodes que j'ai utilisé pour mener à bien le travail de recherche qui m'a été confié.

Durant ma thèse, j'ai eu l'opportunité de pouvoir participer à la rédaction d'une revue :

Acyl-Lipid Metabolism

Yonghua Li-Beisson, Basil Shorrosh, Fred Beisson, Mats X. Andersson, Vincent Arondel, Philip D. Bates, Sébastien Baud, David Bird, Allan DeBono, Timothy P. Durrett, Rochus B. Franke, Ian A. Graham, Kenta Katayama, Amélie A. Kelly, Tony Larson, Jonathan E. Markham, Martine Miquel, Isabel Molina, Ikuo Nishida, Owen Rowland, Lacey Samuels, Katherine M. Schmid, Hajime Wada, Ruth Welti, Changcheng Xu, Rémi Zallot and John Ohlrogge

The Arabidopsis Book 2010 8 (1), 1-65

Cette thèse a fait l'objet de divers posters, présentés à des congrès : ARALIP, The Arabidopsis Lipid Metabolism Database

a web-based community resource dedicated to Arabidopsis acyl-lipid metabolism

http://aralip.plantbiology.msu.edu/

Yonghua Li-Beisson, Basil Shorrosh, Fred Beisson, Mats Andersson, Vincent Arondel, Philip Bates, Sébastien Baud, David Bird, Allan De-Bono, Timothy Durrett, Rochus Franke, Ian Graham, Kenta Katayama, Amélie Kelly, Tony Larson, Jonathan Markham, Martine Miquel, Isabel Molina, Ikuo Nishida, Owen Rowland, Lacey Samuels, Katherine Schmid, Hajime Wada, Ruth Welti, Changcheng Xu, Rémi Zallot and John Ohlrogge

Presented at 19th International Symposium on Plant Lipids, 2010, Cairns, Australia

Identification and characterization of a Triacylglycerol lipase expressed during

post-germination of Arabidopsis thaliana Zallot Rémi, Dhouib Rabeb, Moretto Fabien, Arondel Vincent Journée scientifique de l'Ecole Doctorale 2010, Arcachon, France

Identification of a triacylglycerol-lipase from Brassica napus by functional proteomics

Rémi Zallot, Rabeb Dhouib and Vincent Arondel

5th European Symposium on Plant Lipids, 2011, Gdansk, Poland Ce poster a été sélectionné pour une communication orale.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

1.1	Généralités		5
	1.1.1	Le cycle de vie des plantes à fleurs	5
	1.1.2	Arabidopsis thaliana	6
1.2	L'acc	CUMULATION DES RÉSERVES DANS LA GRAINE D'ARABI-	
	DOPSI	S	7
	1.2.1	Composition de la graine sèche	9
	1.2.2	Les lipides	9
	1.2.3	Structure des triacylglycérols	11
	1.2.4	Acides gras de la graine d'Arabidopsis	11
	1.2.5	Localisation des réserves dans la graine d'Arabidopsis	12
1.3	Dorm	IANCE, GERMINATION ET CROISSANCE POST-GERMINATIVE	15
	1.3.1	La dormance	15
	1.3.2	Le passage de la germination à la croissance post-	
		germinative	15
1.4	L'hyd	PROLYSE DES RÉSERVES POUR LA CROISSANCE POST-	
	GERM	INATIVE CHEZ ARABIDOPSIS	18
	1.4.1	Le catabolisme des réserves lipidiques chez Arabidopsis .	18
	1.4.2	Organisation spatiale de la β -oxydation et de l'hydrolyse	
		des réserves	23
	1.4.3	Organisation temporelle de l'hydrolyse des réserves	25
	1.4.4	Régulation de l'hydrolyse des réserves	26
1.5	Les li	IPASES	29
	1.5.1	Lipases et estérases : définitions	29
	1.5.2	Propriétés biochimiques	30
	1.5.3	Mode d'action des lipases : paramètres cinétiques	31
	1.5.4	Structure	32
	1.5.5	Mécanisme enzymatique	35
	1.5.6	L'émergence d'une nouvelle classe de lipases : les lipases	
		à domaine patatine	35
	1.5.7	Le dosage de l'activité des lipases	37
	1.5.8	Inhibiteurs de lipases	38
1.6	Lipol	YSE CHEZ LES PLANTES	41

1.6.1	Caractérisation des activités lipase détectées chez les			
	plantes supérieures	45		
1.6.2	Tentatives d'identification de lipases par homologie de sé-			
	quence	50		
1.6.3	Identification et caractérisation de SDP1	51		
1.6.4	Organisation de l'activité lipase au cours du temps	57		
Conclusion				

E chapitre introductif a pour but de décrire toutes les informations que l'on trouve dans la littérature et qui permettront de bien comprendre et analyser les résultats en rapport avec le sujet d'étude.

1.1 Généralités

1.1.1 Le cycle de vie des plantes à fleurs

Dans le cycle de vie d'une plante à fleur, la graine fait le lien entre deux générations successives. C'est le point de départ pour la formation d'un individu : dans de bonnes conditions, la graine germe. À ce stade, la future plantule ne peut compter que sur ses réserves pour s'établir. Il y a donc hydrolyse de ses réserves, afin de générer l'énergie et les composés nécessaires au développement de l'embryon et à la formation des premières feuilles : c'est la croissance post-germinative. Avec la formation des feuilles, la photosyntèse peut commencer. Elle permet la production de l'énergie et des substances nutritives nécessaires au métabolisme et à la croissance de la plante. Plus tard, lorsque la plante est établie, elle produit des fleurs qui vont assurer la reproduction sexuée. La pollinisation permet la fécondation des ovules par le pollen. A l'abri dans le fruit, les ovules fécondés se transforment en graines. Les graines passent par une étape de maturation : l'embryon est formé et il y a accumulation de réserves. La dessiccation des graines est la dernière étape de la maturation et on considère alors les graines comme matures. On assiste alors à une étape de pause dans le cycle de vie de la plante : c'est la dormance. Cette pause permet la dissémination des graines sèches puis, lorsque les conditions sont optimales, la dormance est levée, et le cycle peut recommencer : la graine germe (voir Figure 1.1).



Figure 1.1 – Le cycle de vie des plantes à fleur (source : eduMedia).Schéma représentant les différentes étapes du cycle de vie d'une plante à fleur.

1.1.2 Arabidopsis thaliana

Historique

Les premières démarches expérimentales utilisant Arabidopsis en tant que sujet d'étude remontent au début du XXème siècle et son attribuées à Friedrich Laibach (Koornneef et Meinke 2010). À la mi-XXème siècle, l'intérêt envers Arabidopis commence à croître, notamment en utilisant sa variabilité naturelle afin d'étudier des traits physiologiques tels que la dormance des graines (Kugler 1951) et le moment de floraison (Laibach 1951). C'est une étudiante de Laibach, Erna Reinholz, qui la première isolera un mutant d'Arabidopsis induit aux rayons X. Durant les années 1970, plusieurs revues (Redei 1975, Meinke et Sussex 1979) et les travaux de Somerville, incitent à définir Arabidopsis en tant que plante modèle. La possibilité de culture cellulaire, son utilisation pour la biologie moléculaire, son génome de petite taille et le clonage d'un de ses gènes, vont définitivement assoir cette plante en tant que modèle pour la recherche (Meyerowitz 1987).

La première transformation d'Arabidopsis est réalisée en 1986, grâce à *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie permet l'insertion au hasard dans le génome de la plante d'un ADN-T dans lequel est cloné un gène d'intérêt, entraînant parfois une interruption d'un gène au locus de l'insertion (Lloyd et al. 1986). Un grand nombre de lignées d'insertion ont été générées sur ce principe et ont permis d'établir de larges collections de mutants (Alonso et al. 2003). La première caractérisation d'une lignée d'insertion a été réalisée en 1989 (Feldmann et al. 1989). Ce n'est que bien plus tard que l'on parlera de génétique inverse.

Un modèle de choix

Arabidopsis possède un des plus petits génomes parmi les plantes. Il est constitué d'environ 157 millions de paires de bases, et organisé en 5 chromosomes (Arabidopsis 2000). On estime son nombre de gènes à 27 000, codant pour la synthèse de 35 000 protéines. La petite taille de son génome fait d'Arabidopsis un outil génétique facile et utile. Elle a été la première plante à avoir son génome séquencé.

Arabidopsis thaliana est une plante de petite taille ce qui permet une culture aisée et dans des environnements limités en place. Son cycle de vie est rapide : on peut avoir une génération, de graine à graine en environ 6 semaines. Arabidopsis est auto-fécondable et produit un grand nombre de graines. On peut la transformer de façon stable par la méthode du "floral dipping" qui est simple à mettre en œuvre, rapide et très efficace (Clough et Bent 1998). Cette technique de transformation a permis de créer des collections de mutants disponibles pour la recherche. On peut considérer que le génome d'Arabidopsis est saturé en mutants d'insertion : on peut pratiquement commander des lignées ayant chacune une mutation dans un de tous les gènes d'Arabidopsis. Tous ces critères présentent un avantage non négligeable dans le cadre d'une plante modèle pour l'expérimentation en laboratoire.

Bien qu'Arabidopsis thaliana présente des avantages non négligeables pour la recherche et est maintenant établie en tant que plante modèle, elle n'a que peu de signification en ce qui concerne l'agronomie. Elle est utilisée pour l'étude générale des plantes au niveaux de la génétique, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la génétique des populations, de l'évolution et du développement. Elle est une plante modèle mais on ne peut généraliser ce que l'on apprend grâce à elle à toutes les plantes. Elle fait cependant partie de la classe informelle des oléagineuses et est très proche du colza, ce qui en fait un outil de choix pour l'étude du métabolisme des lipides chez les plantes (Wallis et al. 2010).

L'introduction bibliographique présente des données qui concernent la plante modèle Arabidopsis, sauf dans certains cas ou le sujet d'étude est explicitement précisé.

1.2 L'ACCUMULATION DES RÉSERVES DANS LA GRAINE D'ARA-BIDOPSIS

Chez Arabidopsis, le développement de la graine peut être divisé en 2 étapes distinctes. La double fécondation entraîne dans un premier temps la morphogenèse de l'embryon et de l'endosperme, puis dans un second temps, il y a mise en place de réserves qui lui serviront pour sa croissance post-germinative. C'est la phase de maturation de la graine.

Morphogenèse de l'embryon

La morphogenèse de l'embryon est initiée par la double fertilisation du sac embryonnaire qui donne naissance au zygote (diploïde) et à l'endosperme (triploïde). L'embryon suit une série de divisions qui permet son organisation selon un plan apico-basal, puis une symétrie radiale et latérale définissant l'ébauche d'une plante : on trouve déjà le méristème apical, les cotylédons puis l'hypocotyle et le méristème racinaire (pour revue Jenik et al. 2007). L'endosperme passe par une étape coenocytique puis se cellularise et se différencie, afin de former une couche monocellulaire autour de l'embryon. Cette première étape dure 10 jours après l'anthèse (Baud et al. 2008).

Maturation de la graine

L'étape de maturation de la graine est caractérisée par l'accumulation de composés de réserves, l'acquisition de la dormance et la capacité à la dessiccation. Elle démarre au 7ème jour après l'anthèse, coïncidant avec le début de la cellularisation de l'endosperme, et se termine à l'état de graine sèche et prête à la dissémination.

Au 7ème jour après l'anthèse, la taille de l'embryon augmente par division cellulaire et expansion des cellules qui le composent alors que l'endosperme qui l'entoure va finir par ne représenter qu'une couche monocellulaire. Il y a synthèse transitoire d'amidon et c'est à ce moment qu'il y a initiation de la synthèse des composés de réserves que sont l'huile et les protéines de réserve. Au 10 ème jour, l'amidon est dégradé et la part de l'huile et des protéines augmente fortement jusqu'au 17 ème jour. À ce stade, on assiste à la fin de l'accumulation des réserves, un ralentissement du métabolisme et la synthèse de composés qui vont permettre la dessiccation de la graine puis un arrêt du métabolisme. La teneur en eau atteint alors 10 % du poids frais. Il est intéressant de noter qu'à la toute fin de la maturation il y a une légère diminution de la quantité d'huile dans la graine. Bien qu'on le retrouve aussi bien chez le colza que chez Arabidopsis, la signification biologique et/ou physiologique de ce phénomène connu n'est cependant pas expliquée (voir Figure 1.2).

Le contrôle du partitionnement des réserves dans la graine (que ce soit d'Arabidopsis ou d'autres espèces de plantes) est particulièrement étudié. Sa compréhension reste un sujet d'intérêt majeur de par les perspectives possibles au niveau agronomique : on souhaite toujours augmenter la quantité d'huile dans les graines des plantes oléagineuses. Les voies de biosynthèse des triacylglycérols (TAGs), composés largement majoritaires de l'huile, sont connues. On comprend de mieux en mieux les facteurs qui limitent leur synthèse (quantité d'oxygène, lumière et température) et les nouvelles techniques de transcriptomique permettent l'identification de facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation de leur synthèse (comme les gènes leafy cotyledons, LEC1, LEC1-like, LEC2 et FUS3; Le et al. 2010 et pour revue, voir Baud et Lepiniec 2010).

Les étapes les plus importantes de la morphogenèse de l'embryon puis de la maturation de la graine, depuis l'anthèse jusqu'à la dessiccation sont représentées dans la figure 1.2.



Figure 1.2 – Morphogenèse embryonnaire et maturation de la graine d'Arabidopsis (d'après Baud et al. 2008).

Les volumes relatifs de l'endosperme et de l'embryon dans la graine sont présentés au cours de son développement. Les embryons sont représentés aux stades globulaire, torpille, cotylédonnaire précoce, cotylédonnaire mature. Une évolution des sucres et des composés de stockage (les TAGs et les protéines de stockage) est présentée en parallèle. Il est à noter qu'il y a une faible diminution de la quantité d'huile pendant la maturation tardive. E.M. : morphogenèse de l'embryon.

1.2.1 Composition de la graine sèche

Dans la composition d'une graine sèche mature d'*Arabidopsis thaliana*, les lipides représentent le composé majoritaire de réserve avec près de 40 % du poids sec. Les protéines sous forme soluble et insoluble représentent quant à elle environ 30 % du poids sec, puis viennent les sucres et d'autres composés qui ne sont pas des composés de réserve (ADN, ARN, composés de la paroi pectocellulosique, etc). Si l'on regarde plus en détail la composition en lipides d'une graine, ce sont les lipides de réserves, c'est à dire les TAGs, qui constituent l'élément principal à hauteur de 94 % (voir Figure 1.3).



Figure 1.3 – Composition d'une graine sèche mature d'Arabidopsis (écotype Wassilewskija d'après Li-Beisson et al. 2010).

Les lipides et les protéines (stockés dans des structures de réserve) représentent près de 70 % du poids sec d'une graine d'Arabidopsis. Les TAGs constituent l'espèce lipidique majoritaire de mise en réserve chez l'immense majorité des plantes supérieures dont *Arabidopsis thaliana*. Si la plupart des graines stockent des TAGs, ceux ci ne constituent pas toujours la forme majoritaire de stockage du carbone (qui peut se faire sous forme d'amidon par exemple).

1.2.2 Les lipides

Définitions et propriétés

Les lipides sont normalement définis comme étant des composés insolubles dans l'eau, mais solubles dans des solvants organiques (Small 1968). Cette définition, basée exclusivement sur les propriétés physiques, diffère des définitions chimiques des autres composés majeurs du vivant. Elle n'est pas facile à manier car les lipides forment donc un ensemble de molécules aux structures extrêmement variées. Assez souvent, on considère plus ou moins explicitement que les lipides sont des molécules contenant des acides gras (AGs). Les AGs sont des molécules formées d'une chaîne aliphatique plus ou moins longue, qui peut contenir des doubles liaisons, avec à son extrémité Δ , un groupement acide. On désigne les AGs par deux chiffres : le premier correspond au nombre de carbones (qui est responsable de la longueur de chaîne) et le second au nombre de double liaison. Par exemple, l'acide palmitique 16:0 contient 16 carbones et aucune double liaison. La position de l'insaturation est décrite à partir de son extrémité ω , opposée au groupe acide. Les AGs contenant ou non des doubles liaisons sont souvent qualifiés d'insaturés (mono-, di-, tri-) ou de saturés, respectivement. Les AGs les plus fréquents dans les lipides membranaires contiennent 16 ou 18 carbones et entre o et 3 doubles liaisons. Les AGs sont souvent estérifiés à d'autres molécules contenant des groupements alcools (glycérol, stérol . . .) et il existe ainsi des milliers de lipides différents qui présentent un spectre de propriétés biophysiques très variées. Nous ne parlerons dans ce travail que de lipides contenant des AGs.

Cette introduction porte essentiellement sur les acylglycérols (également appelés glycérides) qui sont des esters d'acides gras (AG) et de glycérol. Il existe 3 sous-classes d'acylglycérols : les mono-, di- et triacylglycérols (respectivement MAGs, DAGs et TAGs). Les préfixes mono, di, et tri sont utilisés selon le nombre d'estérifications portées sur les groupes hydroxyles du glycérol. Les TAGs (voir Figure 1.4 page ci-contre) sont les constituants majoritaires de mise en réserve dans la graine d'Arabidopsis.

Il existe aussi d'autres classes de lipides comme les phosphoacylglycérols (également appelés phosphoglycérides ou glycérophospholipides). Ils s'organisent généralement spontanément en bicouche et sont les composants majeurs des membranes biologiques. Leur structure de base est formée d'un ester de diacylglycérol et de phosphate, qui peut lier un composé polaire hydroxylé (par exemple, la choline, la sérine, l'éthanolamine). Une autre classe est constituée par les sphingolipides. Ce sont des dérivés de sphingosines qui sont formés par la condensation d'un acide gras et de la sérine. Il faut ajouter à cette liste les stérols, qui sont des lipides dérivant du noyau cyclopentanophénanthrénique.

Auto-organisation des lipides et émulsion

Les lipides étant des composés insolubles dans l'eau, ils auront tendance à s'agréger spontanément à la surface de l'eau, en formant, en fonction de leur polarité, des structures plus ou moins organisées et plus ou moins stables (Small 1968). Les lipides les plus polaires peuvent former, en fonction de leur concentration, des structures micellaires solubles dans l'eau.

Les TAGs, molécules de polarité faible, ne forment pas de micelles mais des films monomoléculaires stables à la surface de l'eau. Si on agite un mélange eau/TAG, une émulsion se forme. Une émulsion est définie comme étant un mélange, macroscopiquement homogène mais microscopiquement hétérogène, de deux substances liquides non miscibles, comme l'eau et l'huile. Les deux substances liquides en présence sont appelées des phases. Une phase est continue et l'autre phase, dispersée dans la première sous forme de gouttelettes, est discontinue. C'est le cas de l'huile dans l'eau. On défini une interface comme étant la couche limite entre les deux phases, par laquelle ont lieu des échanges et des interactions. Dans le cas du mélange Eau/TAGs agité, l'eau contient des gouttelettes d'huile. La taille de ces gouttelettes est dépendante de l'agitation. Cette émulsion est instable et les deux phases se séparent rapidement dès que l'agitation cesse. Il est possible de stabiliser des émulsions en ajoutant des agents émulsifiants comme de la phosphatidylcholine, des protéines amphipathiques ou des polymères comme ceux contenus dans la gomme arabique. Les corps lipidiques (voir le paragraphe 1.2.5 page suivante) sont une émulsion stable de TAGs.

1.2.3 Structure des triacylglycérols

Les TAGs sont formés par l'estérification de trois acides gras sur les groupes hydroxyles du squelette glycérol. La Figure 1.4 présente la structure chimique d'un triacylglycérol type, l'acide tri-palmitique.



Figure 1.4 – Structure chimique d'un triacylglycérol : le tripalmitoylglycérol.

Le tripalmitoylglycérol est un TAG. Il est composé de trois acides palmitiques (16:0) estérifiés sur le glycérol.

Les TAGs sont des molécules neutres et peu polaires. Les acides gras (AGs) des TAGs sont fréquemment similaires à ceux des membranes (16 et 18 carbones), bien qu'ils présentent parfois plus de variations. Certaines plantes contiennent des TAGs avec des acides gras inhabituels (groupements hydroxy, epoxy, chaînes plus longues ou plus courtes, ...). Par exemple (voir la sous-section suivante), les TAGs de réserve d'Arabidopsis contiennent des quantités significatives d'acides gras à plus longues chaînes (supérieures à 18 carbones). Les acides gras sont formés par une machinerie protéique spécialisée dans le plaste à partir d'acétyl-CoA, luimême généré par le métabolisme primaire (tout comme le glycérol). Ils peuvent être édités, dans leur longueur de chaîne, et dans leur degrés de saturation, au niveau du réticulum endoplasmique (RE). C'est aussi à cet endroit que leur assemblage en TAGs est réalisé, et que leur structure spécialisée de mise en réserve, le corps lipidique se constitue (voir Figure 1.5 page suivante). Les TAGs ont un rôle fondamental : ils sont une réserve d'énergie très importante. C'est la meilleure forme de stockage d'énergie, avec le meilleur rapport calorie/masse du monde vivant. Ils seront hydrolysés dans la plantule sous l'action de lipases durant la croissance post-germinative. Les AGs libérés seront oxydés par la β -oxydation et conduiront à la production d'unités carbonées et d'énergie nécessaire à la croissance de la plantule (voir 1.4 page 18).

1.2.4 Acides gras de la graine d'Arabidopsis

Chez Arabidopsis, l'acide gras appelé acide éicosenoïque (20:1) n'est pas retrouvé ailleurs que dans les TAGs des graines (voir Lemieux et al. 1990 et pour une composition détaillée en acide gras des différents organes d'Arabidopsis, Li-Beisson et al. 2010). Ce n'est pas l'acide gras majoritaire ni de la graine, ni des TAGs (voir Tableau 1.1 page suivante), mais il est cependant assez abondant pour être utilisé comme marqueur des TAGs de graine.



Figure 1.5 – Schéma des étapes permettant la synthèse des triacylglycérols (d'après Baud et Lepiniec 2010).

C'est l'acétyl-CoA généré par le métabolisme primaire qui sert d'unité de base à la synthèse des acides gras (AGs), qui peuvent être edités. Le glycérol sur lequel sont estérifiés les AGs provient lui aussi du métabolisme primaire. L'assemblage des TAGs est réalisé dans le réticulum endoplasmique (RE) et ils sont finalement stockés dans des structures spécialisées, les corps lipidiques. ER, Réticulum endoplasmique ; OB, Oil bodies, corps lipidiques.

AG en mol%	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	20:2	22:0	22:1
Totaux	8,5	3,5	14,6	28,7	19,0	2,1	20,1	1,9	-	1,6
TAG	8,3	3,4	14,6	28,6	18,5	2,1	21,8	1,2	0,3	1,6

Tableau 1.1 – Acides gras des TAGs d'une graine d'Arabidopsis (d'après Li-Beisson et al. 2010).

Ce tableau présente la composition en AG d'une graine, et de TAGs isolés d'une graine d'Arabidopsis en mol%. L'acide gras majoritaire est l'acide linoleique (18:2). La différence que l'on note entre les compositions en acides gras de la graine et des TAGs est dûe aux autres espèces de lipides.

1.2.5 Localisation des réserves dans la graine d'Arabidopsis

Au niveau cellulaire

Au niveau cellulaire, les réserves de la graines sont contenues dans des structures spécialisées. Alors que les protéines de réserves sont contenue dans des vacuoles spécialisées appelées vacuoles de stockage de protéines, les TAGs sont stockés dans des structures appelées corps lipidiques, ou oléosomes.

La formation des corps lipidiques Le mécanisme de formation des corps lipidiques n'est pas strictement établi. On sait que l'assemblage des TAGs s'effectue dans le RE (voir la sous-section page précédente). L'enzyme qui réalise la dernière étape de l'assemblage est localisée dans des sous domaines du RE (Shockey et al. 2006). Les TAGs s'accumuleraient donc au niveau de ces micro-domaines et c'est cette accumulation, entre les deux feuillets de la membrane du RE qui serait à l'origine des corps lipidiques (voir Figure 1.6 page suivante).

Structure des corps lipidiques Les corps lipidiques sont des structures sphériques. Ils sont formés d'une hémi-membrane de phospholipides dont les têtes polaires sont orientées vers l'extérieur, formant une lumière contenant les TAGs (voir Figure 1.6 page ci-contre). Associées à cette membrane, on retrouve divers types de protéines. Les protéines enchassées dans l'hémi-membrane la recouvrent complètement. Il est possible de pu-

rifier des corps lipidiques à partir de graines ou de plantules. Le diamètre de corps lipidiques purifiés d'Arabidopsis est de 2,6 µm, et le rapport AG sur protéines s'approche de 20 (Jolivet et al. 2004). On a été capable d'établir le protéome de corps lipidiques (pour Arabidopsis voir Jolivet et al. 2004). Ils contiennent en majorité des oléosines, ainsi que des caléosines, des stéroléosines, et d'autres protéines moins représentées. Ces protéines possèdent un rôle structurant; elles participent à la stabilité de ces organites et empêchent leur coalescence (ou aggrégation) qui amènerait à la formation de simple gouttes d'huile (Leprince et al. 1997). Des mutants d'oléosines possèdent des corps lipidiques de taille anormale, et pour lesquels l'hydrolyse des réserves est impacté (Shimada et Hara-Nishimura 2010). À côté des fonctions structurantes, différentes protéines enchassées dans l'hémi-membrane des corps lipidiques participeraient à l'hydrolyse des réserves. Certaines de ces hypothèses sont présentées dans la soussection 1.6.1 page 49. Les caléosines joueraient un rôle dans l'hydrolyse des réserves (voir Poxleitner et al. 2006 et la sous-section 1.4.3 page 25).



Figure 1.6 – Schéma représentant la formation et la structure d'un corps lipidique (d'après Shimada et Hara-Nishimura 2010).

Les corps lipidiques sont produits dans les graines en maturation à partir de la membrane du RE. Ils sont constitués d'une hémi-membrane dans laquelle sont enchassées divers types de protéines, notamment les oléosines, caléosines et stéroléosines. Les phospholipides qui constituent cette hémi-membrane sont orientés tête polaire vers l'extérieur, et chaînes acyles apolaires vers l'intérieur.

Au niveau tissulaire

Arabidopsis est une dicotylédone vraie. On retrouve donc une certaine organisation tissulaire : depuis l'extérieur vers l'intérieur, on a le manteau de la graine, l'endosperme (constitué d'une unique couche cellulaire), et au centre l'embryon. De part son orientation apico-basale (voir page 7), l'embryon peut être séparé en 3 éléments : les cotylédons, l'hypocotyle et la radicule. Sa germination est de type épigée : la graine est soulevée par l'hypocotyle qui croit, puis les cotylédons sont alors amenés au dessus du sol. Les structures correspondantes sont présentées dans la Figure 1.7. Les différents tissus de la graine d'Arabidopsis ne contiennent pas tous la même quantité d'huile.



Figure 1.7 – Dissection d'une graine sèche d'Arabidopsis (d'après Li et al. 2006).

A, Le manteau de la graine (à gauche) a été séparé de l'embryon (à droite). B, coupe de graine montrant la radicule (R), l'hypocotyle (H) et les deux cotylédons (C), le tout entouré par le manteau. C, détail de la limite entre l'embryon (E) et le manteau de la graine (SC pour seed coat). L'endosperme, constitué d'une unique couche cellulaire n'est visible dans aucune de ces illustrations.

Les réserves dans les différents tissus L'embryon à lui seul représente les deux tiers du poids de la graine sèche. Le reste est constitué par le manteau de la graine et l'endosperme. L'huile contenue dans l'embryon représente 93,3 % de toute l'huile de la graine. Bien que les cotylédons représentent la majorité de la masse (45 % du poids de la graine sèche), l'huile est répartie de manière similaire entre les cotylédons, d'une part et, l'hypocotyle et la radicule, d'autre part, avec respectivement 47,2 et 46,1 % de la totalité de l'huile de la graine (Li et al. 2006). Le tableau 1.2 présente le contenu en huile des différents tissus de la graine. La distribution non uniforme de l'huile dans la graine reflète la distribution non uniforme des corps lipidiques : il n'y a pas de corps lipidiques dans le manteau (Beeckman et al. 2000). En plus d'une distribution non uniforme, les compositions en AGs de l'embryon, de l'endosperme et du manteau ne sont pas identiques : cela reflète des voies de biosynthèses différentes, et des fonctions différentes de ces tissus (Li et al. 2006, Penfield et al. 2004).

	Cotylédons	Radicule et Hypocotyle	Endosperme et manteau
Poids (% de la graine)	45,0	21,0	34,0
Huile totale (% de la graine)	59,2	27	13,8
Huile (% du tissu considéré)	47,2	46,1	14

Tableau 1.2 – **Importance des différents tissus de la graine d'Arabidopsis, en poids et quantité d'huile correspondante (d'après Li et al. 2006).** Ce tableau présente la quantité d'huile dans les différents tissus d'Arabidopsis. La majorité de l'huile est contenue dans l'embryon avec l'hypocotyle et la radicule, alors que l'endosperme et le manteau n'en contiennent qu'une faible part.

1.3 DORMANCE, GERMINATION ET CROISSANCE POST-GERMINATIVE

La graine mature est dispersée dans son environnement (voir Figure 1.1 page 5). La graine sèche est protégée pour résister aux conditions non favorables que peuvent être celles de sa dispersion. Durant cette étape, la graine est en sommeil, dans l'attente des conditions optimales qui permettront son développement pour former un nouvel individu : elle est en dormance. Le métabolisme est arrêté. Une fois les conditions favorables atteintes, la graine peut se développer. Lorsqu'une plante passe de l'état de graine à celui de plantule, on dit qu'elle a germé. C'est un abus de langage : il y a en réalité différents stades entre la graine prête à germer et la plantule. Dans un premier temps, il y a la germination *sensu stricto* puis la croissance post-germinative.

1.3.1 La dormance

La dormance est définie comme étant l'incapacité d'une graine viable de se développer dans les conditions optimales (Bewley 1997). Différents signaux doivent être perçus par la graine afin de lever sa dormance, pour éviter qu'elle ne germe dans des conditions non appropriées. Les signaux qui interviennent dans la levée de la dormance peuvent être liés à la lumière, la température et l'humidité. Les signaux sont ensuite transduits à travers des chaînes impliquant, entre autres, des messages hormonaux (pour revue Bentsink et Koornneef 2008).

1.3.2 Le passage de la germination à la croissance post-germinative

Tout comme la levée de dormance, différents signaux interviennent pour la germination. La Figure 1.8 page suivante extraite de la revue écrite



Figure 1.8 – Représentation de la complexe régulation de la germination (Bentsink et Koornneef 2008).

Différents facteurs interviennent dans la régulation de la germination, aussi bien environnementaux qu'hormonaux. Les facteurs qui activent la germination sont indiqués par des flêches vertes alors que ceux qui l'inhibent le sont avec des flêches rouges. Ces facteurs engendrent des signaux qui interfèrent et forment des boucles complexes qui contrôlent la germination.

par Bentsink et Koornneef (2008) illustre la complexité et les interconnections qui interviennent dans la graine pour la germination.

La première étape de la germination est une absorption d'eau entraînant la reprise du métabolisme, avec en premier lieu, l'activation de la respiration et du métabolisme des acides aminés. Il y a traduction des ARNs messagers présents, et reprise de la transcription à partir de l'ADN. Le métabolisme primaire se remet en route et l'hydrolyse des réserves peut commencer. On arrive à la croissance post-germinative, qui permet le développement de la racine, le verdissement des cotylédons et qui se termine par la formation des premières vraies feuilles. La photosynthèse peut alors commencer et entraîne l'autotrophie de la plantule. L'autotrophie doit être acquise avant que toutes les réserves de la graine ne soient consommées. La Figure 1.9 page suivante résume les différentes étapes, depuis la graine mature jusqu'à la croissance post-germinative.



Figure 1.9 – Les étapes de la graine mature à la croissance postgerminative (Bentsink et Koornneef 2008).

La graine mature passe par un état de dormance qui va être levée à la suite de différents signaux. Dans des conditions favorables, il y a absorption d'eau, entraînant la rupture du manteau de la graine, puis celle de l'endosperme et apparition de la radicule. C'est la germination *sensu stricto*. La croissance post-germinative débute alors avec l'hydrolyse des réserves qui permettra la formation des premières vraies feuilles. La photosynthèse peut commencer et rendre la plantule autotrophe.
1.4 L'hydrolyse des réserves pour la croissance postgerminative chez Arabidopsis

Les étapes conduisant des TAGs aux hexoses sont dans l'ensemble bien connues, aussi bien en ce qui concerne les enzymes impliquées que leur localisation sub-cellulaire. Par ailleurs, une collection de mutants est disponible. Les mutations qui bloquent la voie catabolique des TAGs entraînent un retard de la croissance post-germinative, voire son arrêt complet, ce qui démontre bien l'importance de cette voie dans le développement de la jeune plantule.

1.4.1 Le catabolisme des réserves lipidiques chez Arabidopsis

Le catabolisme des TAGs requiert l'action de voies métaboliques différentes et localisées dans différents compartiments sub-cellulaires (voir Figure 1.10 page ci-contre). Ainsi, les TAGs sont hydrolysés en acides gras et glycérol au niveau des corps lipidiques. Les acides gras sont transportés dans les glyoxysomes où ils sont oxydés pour donner de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA entre dans le cycle glyoxylique, qui exportera vers les mitochondries du succinate. Celui-ci sera converti en malate par le cycle de Krebs. Le malate sera alors converti en oxaloacétate qui entrera dans la voie cytoplasmique de néoglucogenèse.

Hydrolyse des TAGs et importation des acides gras dans les glyoxysomes

La première étape du catabolisme des TAGs est réalisée par des lipases qui vont hydrolyser les liaisons ester afin de libérer les AGs du glycérol. L'étude des lipases et de leurs propriétés est présentée plus loin, dans les Section 1.5 page 29 et 1.6 page 41.

On sait que les acides gras sont transportés dans le glyoxysome par un transporteur appelé Comatose (CTS). Il s'agit d'un transporteur à cassette fixatrice d'ATP (transporteur ABC). La mutation cts entraîne la nonhydrolyse des réserves lipidiques chez Arabidopsis (Footitt et al. 2002), ce qui confirme son rôle physiologique. La forme sous laquelle les AGs sont transportés dans le glyoxysome par Comatose reste inconnue. En effet, des études biochimiques suggèrent que ce transporteur utiliserait des AGs activés sous forme d'acyl-CoA et non des acides gras libres. Il existe des acyl-CoA synthétases dans le cytoplasme (Shockey et Fulda), qui pourraient activer les AGs libérés par la lipase en acyl-CoA, ces derniers étant alors transportés ainsi par CTS dans le glyoxysome où ils seraient directement substrats de la β -oxydation. Malheureusement, cette hypothèse est en contradiction avec le phénotype du double mutant lacs6 lacs7, qui est totalement dépourvu d'acyl-CoA synthétase peroxysomales et qui est incapable d'oxyder les acides gras (Fulda et al. 2004). Ce phénotype ne peut pas s'expliquer si Comatose peut transporter des acyl-CoA dans le glyoxysome.

Il est intéressant de noter que le glycérol libéré par la lipase entre également dans la voie de néoglucogenèse après action de la glycérolkinase et apporte une contribution certes faible mais significative à la croissance



Figure 1.10 – Diagramme schématique des étapes du catabolisme des TAGs (d'après Rylott et al. 2001).

Le catabolisme des TAGs débute par l'action d'une lipase qui va hydrolyser les liaisons ester, libérant les AGs et le glycérol. Celui ci entre directement dans la néoglucogenèse après avoir été phosphorylé en glycérol-3-phosphate. Le devenir des AGs n'est pas aussi direct : ils sont transportés dans les glyoxysomes, puis activés sous forme d'acyl-CoA. Ils entrent alors dans la β -oxydation où leur longueur de chaîne est réduite successivement de 2 unités, générant à chaque cycle de l'acétyl-CoA. Celui-ci entre dans le cycle glyoxylique qui produit du succinate. Le succinate est exporté vers la mitochondrie où il entre dans le cycle de Krebs (TCA) pour générer de l'oxaloacétate (OAA). L'OAA peut aussi être produit directement par le cycle glyoxylique. L'OAA et le malate produits sont convertis en phosphoénolpyruvate, qui est pris en charge dans la néoglucogenèse pour former les sucres nécessaires à la croissance de la jeune plantule avant la mise en place de son appareil photosynthétique.

de la plantule, qui sera observée dans un double mutant *gli1icl1* affectant, et la glycerol kinase, et l'isocitrate lyase dans le cycle glyoxylique (voir le Tableau 1.3 page 22 et Eastmond 2004b).

β -oxydation

La revue écrite par Graham (2008) détaille les étapes de ces réactions. La β -oxydation est une boucle répétée. À chaque tour de boucle, la longueur de chaîne d'un acyl-CoA est réduite de 2 carbones, en produisant de l'acétyl-CoA (voir Figure 1.11 page 21). Les enzymes qui sont fondamentales dans la boucle de la β -oxydation sont les acyl-CoA oxydases (ACX), les protéines multifonctionnelles (MFP), qui interviennent pour réaliser deux réactions, et la 3-keto-acyl-CoA thiolase (KAT). Toutes sont présentes sous la forme de plusieurs isoformes. Dans certains cas (mfp2, kat2), la mutation d'une seule isoforme montre un phénotype de réduction ou de non-hydrolyse de l'huile. Dans le cas des ACXs, seuls des doubles mutants montrent un phénotype, probablement parce que les isoformes sont partiellement redondantes. La réaction catalysée par l'ACX produit du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ toxique pour la cellule. Il était admis que la catalase peroxysomale (Willekens et al. 1997) soit responsable de la détoxification de ce composé. Cette hypothèse a été remise en cause par l'étude d'un mutant affecté dans la monodéhydroascorbate réductase (MDAR) et qui est incapable d'hydrolyser ses réserves lipidiques (Eastmond 2007). La MDAR recyclant le monodehydroascorbate (MDA) en ascorbate (ASC) nécessaire à l'ascorbate peroxydase (APX), il est probable que ce système soit indispensable à la détoxification de l'H₂O₂ produite par la β -oxydation. Eastmond (2007) explique l'incapacité du mutant *mdar* à hydrolyser ses huiles de réserve par la sensibilité de la lipase SDP1 à l'H₂O₂.

Il a été démontré que la β -oxydation participe à la synthèse du jasmonate (Delker et al. 2007) et de l'auxine (Zolman et al. 2000). Certains phénotypes des mutants peuvent donc ne pas être liés à un défaut d'hydrolyse des réserves. Cela est particulièrement vrai pour les défauts que montrent la plupart de ces mutants (dont CTS Dave et al. 2011) dans la levée de dormance des graines, défauts qu'il faut éviter de confondre avec ceux liés à des défauts dans la croissance post-germinative.

Cycle glyoxylique et néoglucogenèse

La β -oxydation génère des acétyl-CoA, qui sont incorporés dans le cycle glyoxylique. Le cycle glyoxylique est similaire au cycle de l'acide tricarboxylique (ou cycle de Krebs), mais présente un shunt qui évite la perte de carbone sous forme de dioxyde de carbone (CO_2), grâce à la présence de la malate synthase (MLS) et de l'isocitrate lyase (ICL). L'ICL permet en effet de produire du succinate, qui sortira du cycle pour alimenter *in fine* la néoglucogenèse, ainsi que du glyoxylate qui sera condensé avec de l'acetyl-CoA par la malate synthase pour former du malate qui poursuivra le cycle. Le succinate est exporté vers les mitochondries où il est converti en malate. Le malate est alors converti dans le cytoplasme en oxaloacétate qui sera substrat de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK), enzyme d'entrée dans la voie de néoglucogenèse, pour former du phosphoénolpyruvate qui sera donc converti en hexoses.

Le résultat de la β -oxydation suivi par le cycle glyoxylique puis la néoglucogenèse est donc la production de sucre à partir d'acides gras. L'action d'une lipase est nécessaire à la libération des AGs des TAGs et est donc la première étape indispensable de la mobilisation de l'énergie des TAGs.



Figure 1.11 – Voie du catabolisme des TAGs mis en évidence par génétique inverse (Graham 2008).

Les couleurs représentent différentes voies métaboliques : Jaune, hydrolyse des TAGs et devenir des AGs et du glycérol ; vert, β -oxydation dans le glyoxysome ; gris, cycle glyoxylique ; bleu, néoglucogenèse. La production de l'oxaloacétate par le cycle de l'acide tricarboxylique dans la mitochondrie n'est pas représenté. Les gènes pour lesquels les mutations entraînent un phénotype d'arrêt de croissance post-germinative ou un phénotype dans l'hydrolyse de l'huile sont présentés dans le Tableau 1.3 page suivante. FA, fatty acid (acide gras) ; CTS, comatose ; LACS, Long chain acyl-CoA synthetase (acyl-CoA synthétase) ; ACX, acyl-CoA oxydase ; CAT, catalase ; MFP, enzyme multifonctionnelle ; KAT, 3-ketoacyl-CoA thiolase ; MLS, malate synthase ; CSY, citrate synthase ; ICL, isocitrate lyase ; ACO,asconitase ; MDH, malate dehydrogénase ; MDAR, monodehydroascorbate réductase ; APX, ascorbate peroxydase ; SDP1, sugar dependent 1 ; GK, gycérol kinase ; PCK, phosphoénol pyruvate kinase ; PEP, phosphoénol pyruvate ; G-3-P, glycérol-3-phosphate ; OAA, oxaloacétate.

Fonction	Localisation	Mutant	Absence d'hydrolyse d'huile	Arrêt de croissance
Lipase	Corps lipidique	sdp1	oui	oui
Glycérol kinase	Cytosol	gli1	-	-
-		gli1 icl1	-	oui
Transporteur ABC	Membrane	cts/ped3/pxa1	oui	oui
-	glyoxysomale			
acyl-CoA synthetase	Glyoxysome	lacs6	-	-
		lacs7	-	-
		lacs6 lacs7	oui	oui
acyl-CoA Oxydase	Glyoxysome	acx1	-	-
		acx2	-	-
		acx3	-	-
		acx4	-	-
		acx1 acx2	oui	oui
		acx3 acx4	léthal	
Protéine multifonction- nelle	Glyoxysome	aim1	-	-
Protéine multifonction- nelle 2	Glyoxysome	mfp2	oui en partie	oui
3-keto-acyl-CoA thio- lase	Glyoxysome	kat2	oui (sévère)	oui
Malate déhydrogénase	Glyoxysome	pmdh1	-	-
, ,	5	pmdh2	-	-
		, pmdh1 pmdh2	oui	oui
Citrate synthase	Glyoxysome	csy2	-	-
2	5 5	csy3	-	-
		csy2 csy3	oui	oui
Monodehydroascorbate	Membrane	sdp2	oui	oui
réductase	glyoxysomale,	,		
	feuillet matrice			
Malate synthase	Glyoxysome	mls	-	partiel
Isocitrate lyase	Glyoxysome	icl	-	partiel
PEP-carboxykinase	cytosol	pck1	-	partiel

Tableau 1.3 – Gènes identifiés par génétique inverse et impliqués dans le catabolisme des TAGs pour la croissance post-germinative (d'après Graham 2008).

Ce tableau présente les gènes identifiés par génétique inverse qui présentent un phénotype dans l'hydrolyse de l'huile ou dans la croissance post-germinative. Ces gènes codent pour des protéines clé pour la croissance post-germinative. Pour certaines fonctions, il peut y avoir différents isoformes d'une protéine donnée. Il y a donc nécessité d'avoir recours à des doubles mutants afin de mettre en évidence le rôle fondamental de ces gènes. On retrouve ces gènes dans les voies métaboliques de la Figure 1.11 page précédente.

1.4.2 Organisation spatiale de la β -oxydation et de l'hydrolyse des réserves

La description des voies métaboliques conduisant à la synthèse de sucres à partir d'huile montre l'implication de plusieurs compartiments sub-cellulaires. Ceux-ci doivent travailler de concert pour que la plantule puisse se développer normalement.

Organisation sub-cellulaire

Au niveau cytologique, les différents organites qui interviennent de concert pour le catabolisme des réserves lipidiques se retrouvent concentrés à proximité les uns des autres. Ainsi, on visualise de fréquents accolements entre les corps lipidiques et les glyoxysomes (et les glyoxysomes et la mitochondrie) pendant la croissance post-germinative (Wanner et Theimer 1978, Hayashi et al. 2001) et voir Figure 1.12.

Des expériences de fractionnement sub-cellulaire montrent l'existence d'activité lipase dans des fractions glyoxysomales et aussi dans des fractions de corps lipidiques (discutées dans les sections 1.5 page 29 et 1.6 page 41). Des fusions oléosomes-vacuoles ont été décrites également chez le maïs (Huang 1996) et Arabidopsis (Poxleitner et al. 2006 et voir Figure 1.13 page suivante).





Figure 1.12 – Accolements corps lipidiques - glyoxysomes visibles en microscopie électronique (Graham 2008).

On visualise sur cette image des accolements entre les corps lipidiques et le glyoxysome, mais aussi entre le glyoxysome et la mitochondrie. Ces accolements pourraient permettre un passage direct des composés qui doivent transiter entre ces différents compartiments cellulaires.

L'interprétation d'une proximité oléosome-glyoxysome-mitochondrie la plus simple est de faciliter le transfert de métabolites entre ces 3 compartiments interdépendants pour cataboliser les TAGs en acides organiques. Cela est d'autant plus important quand on a affaire à des acides gras qui sont généralement toxiques pour la cellule et qui ne peuvent pas diffuser librement en milieu aqueux. Les acides gras libérés par la lipase au niveau des corps lipidiques pourraient ainsi être directement transférés dans les glyoxysomes grâce au transporteur Comatose (avec la réserve faite dans la



Figure 1.13 – Fusions corps lipidiques - vacuole visibles en microscopie électronique (Poxleitner et al. 2006).

Lors de la croissance post-germinative, on visualise des fusions entre les corps lipidiques et la vacuole. Barre = 5 μm

sous-section 1.4.1 page 18 concernant la nature des molécules transportées par Comatose).

Les fusions oléosomes-vacuoles sont plus difficiles à interpréter. L'analyse d'un mutant de caléosine (*Atclo1*, voir le paragraphe 1.2.5 page 12) montre une diminution significative des événements de fusion entre les corps lipidiques et les vacuoles (Poxleitner et al. 2006). Par ailleurs, il présente un léger retard dans la croissance post-germinative ainsi que dans l'hydrolyse des TAGs. On ne peut donc pas exclure qu'une partie des réserves en huile soit hydrolysée dans la vacuole, puisqu'une lipase homologue à la lipase lysosomale humaine a été décrite chez Arabidopsis (El-Kouhen et al. 2005), bien que rien dans la littérature ne permette d'expliquer le devenir des acides gras ainsi libérés.

Organisation tissulaire

La plupart des données que nous avons présentées jusqu'à présent concernent l'embryon d'Arabidopsis, qui contient l'essentiel des réserves lipidiques de la graine. Il existe d'autres plantes chez qui, au contraire, l'essentiel des réserves est stocké dans l'endosperme; c'est le cas typiquement du ricin. Néanmoins, même s'il est réduit à une couche monocellulaire dans la graine mature d'Arabidopsis, nous avons déjà vu que l'endosperme contient une fraction, certes minime mais significative des réserves en huile de stockage.

L'analyse des TAGs contenus dans l'endosperme et l'embryon montre une composition différente. L'hydrolyse des TAG dans l'endosperme au cours de la germination de la graine semble jouer un rôle dans l'allongement de l'hypocotyle à l'obscurité puisque des embryons dénudés de leur endosperme présentent un phénotype d'hypocotyle court à l'obscurité contrairement aux plantules issues de graines entières (Penfield et al. 2004). ABI4 n'étant pas exprimé dans l'endosperme, il ne peut jouer de rôle dans l'hydrolyse des réserves qui s'y trouvent, ce qui semble différer de la situation décrite dans l'embryon (voir section 1.4.4 page suivante). Ces données suggèrent donc une régulation et une signification physiologique différente de l'hydrolyse des réserves de l'endosperme et de l'embryon d'Arabidopsis.

1.4.3 Organisation temporelle de l'hydrolyse des réserves

La Figure 1.14 tirée de l'article publié par Hooks et al. (2010) illustre très bien l'organisation temporelle de l'hydrolyse des réserves pour l'établissement de la plantule d'Arabidopsis.



Figure 1.14 – Profils des processus impliqués dans l'hydrolyse des réserves au cours du temps (Hooks et al. 2010).

L'activité de différentes enzymes de la voie du catabolisme des TAGs est coordonnée au cours du temps. Alors que les TAGs diminuent, les activité des enzymes de la β -oxydation et du cycle glyoxylique augmentent transitoirement avec un maximum à 2 et 3 jours après l'imbibition. Cette augmentation d'activité entraîne une augmentation des métabolites dans la plantule. Le produit final est les sucres qui vont permettre la formation des premières vraies feuilles.

Les gènes de la β -oxydation, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse possèdent des profils d'expression similaires au cours du temps. L'activité des enzymes correspondantes suit le même profil (voir Figure 1.16 page 27 et Rylott et al. 2001).

La technique du promoteur gène rapporteur GUS montre des résultats similaires. Il en est de même pour l'hydrolyse des TAGs : il y a un maximum d'hydrolyse entre les jours 2 et 4 après l'imbibition de la graine (voir Figure 1.14). Toutes ces enzymes présentent un maximum d'activité entre les jours 2 et 3 après imbibition. Cette plage de temps correspond à l'étape de croissance post-germinative, et on a donc un lien direct au niveau temporel entre activités et changements morphologiques.

Steven Penfield (voir Penfield et al. 2004 et la Figure 1.15 page suivante) a étudié la progression de l'hydrolyse des réserves au cours du temps, au niveau des organes de la plantule de façon élégante. Il a utilisé comme marqueur de la conversion des TAGs en sucres le promoteur du gène de la phosphoénolpyruvatecarboxykinase 1 (PCK1) fusionné au gène rapporteur GUS. L'activité GUS débute au niveau de l'hypocotyle et progresse le long de l'axe apico-basal vers les cotyledons. Ceci laisse supposer l'existence d'un signal diffusif inconnu dont l'origine serait



localisée au niveau de l'hypocotyle.

Figure 1.15 – Vague de mobilisation des réserves dans la graine d'Arabidopsis (Penfield et al. 2004).

Le promoteur de la phosphoénolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) fusionné au gène rapporteur GUS permet de mettre en évidence un signal diffusif d'activation de l'hydrolyse des réserves au cours du temps. A : Graine imbibée, Jour o; B à G : jour 1 à 6 après l'imbibition; H : Modélisation de l'évolution de la coloration GUS qui met en évidence le signal diffusif du catabolisme des TAGs.

Les gènes de la β -oxydation, du cycle glyoxylique et de la néoglucogenèse possèdent des profils d'expression similaires au cours du temps. L'activité des enzymes correspondantes suit le même profil (voir Figure 1.16 page ci-contre et Rylott et al. 2001). La technique du promoteur gène rapporteur GUS montre des résultats similaires (voir sous-section 1.4.2 page 23). Il en est de même pour l'hydrolyse des TAGs : il y a un maximum d'hydrolyse entre les jours 2 et 4 après l'imbibition de la graine. Toutes ces enzymes présentent un maximum d'activité entre les jours 2 et 3 après imbibition. Cette plage de temps correspond à l'étape de croissance post-germinative, et on a donc un lien direct au niveau temporel entre les activité et les changements morphologiques.

1.4.4 Régulation de l'hydrolyse des réserves

L'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative nécessite l'activation coordonnée d'un nombre important d'enzymes au sein de différentes voies métaboliques. Chez Arabidopsis, les gènes de la β oxydation, du cycle glyoxylique et même de la néoglucogenèse partagent un profil d'expression similaire. Les activités enzymatiques correspondantes suivent les profils d'expression, ce qui suggère qu'il n'y a pas de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle importante. Ceci n'est pas vrai pour tous les gènes, puisqu'il semble que le gène codant la lipase SDP1 soit exprimé essentiellement pendant la maturation de la

27



Figure 1.16 – Activités coordonnées temporellement de différentes enzymes du catabolisme des TAGs (Rylott et al. 2001).

L'activité de différentes enzymes de la voie du catabolisme est coordonnée : Les différentes ACX (avec des substrats préférentiels différents), la thiolase qui libére le Co-enzyme A, (CoA), ICL, MS=MLS et PEPcK=PCK1, présentent des profils d'activité similaire. Leur maximum d'activité correspond à leur maximum d'expression et est situé entre les jours 2 et 3 après l'imbibition. A chaque stade correspond un jour d'imbibition : stade o = imbibition, stade 1 = jour 1 après imbibition, ...

graine. Les mécanismes sous-jacents du contrôle transcriptionnel de ces gènes ne sont pas connus (Graham 2008, Rylott et al. 2001). Le mutant abi4 présente une hydrolyse accélérée des TAGs, laissant supposer qu'ABI4 interviendrait en tant que régulateur négatif (directement ou indirectement) de l'hydrolyse de l'huile de l'embryon (Penfield et al. 2006). Néanmoins, il a été montré récemment (Yang et al. 2011) qu'ABI4 stimule la synthèse des TAGs par l'induction du gène codant pour une diacylglycerol acyltransférase. La baisse accélérée du niveau des TAGs pourrait donc être dûe à une absence de synthèse de TAG, comme c'est le cas dans l'influence du rapport sucre/azote sur la teneur en huile des tissus d'Arabidopsis. Il a été montré par Martin et al. (2002) que les niveaux de TAGs restaient élevés quand les plantules en croissance post-germinative étaient cultivées sur un milieu contenant un rapport nitrate/saccharose faible. Les auteurs avaient alors conclu que l'hydrolyse des TAGs était inhibée. Néanmoins, il a été montré récemment (Yang et al. 2011) que ce maintien de la teneur en TAGs était liée à une synthèse de novo, sous le contrôle de ABI4. D'autres études (To et al. 2002, Eastmond et al. 2000) indiquent que l'apport exogène de certains sucres maintient un niveau de TAGs élevé dans les plantules en croissance post germinative mais l'interprétation n'est pas simple.

L'analyse de la plupart des mutants affectés dans la β -oxydation et du cycle glyoxylique montrent que ceux-ci n'hydrolysent pas leur huile (voir Tableau 1.3 page 22 et Graham 2008). Ces constatations permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle il existe une boucle de régulation négative de l'hydrolyse de l'huile depuis l'aval, mais les éléments qui y participent ne sont cependant pas identifiés. Le fait que la lipase SDP1 est probablement mise en place au cours de la maturation de la graine suggère que la régulation principale pourrait être post traductionnelle. En tout cas, il est clair que l'étape de lipolyse joue un rôle important dans le contrôle de l'ensemble de la voie convertissant les TAGs en sucres.

L'étape d'hydrolyse des TAGs est la première étape du catabolisme des lipides de réserve pour la croissance post-germinative. La section suivante présente des données nécessaires à la compréhension du mode d'action des lipases avec les spécificités du fonctionnement des lipases, les modes de mesure de l'activité lipase et l'inhibition de l'activité lipase. Le chapitre suivant présentera le travail qui a eu pour objet d'étude les lipases de plantes en général.

1.5 LES LIPASES

Les lipases ne sont pas des enzymes simples à étudier. D'emblée se pose un problème de définition. Par ailleurs, il s'agit d'enzymes généralement solubles agissant sur un substrat qui ne l'est pas, ce qui en complique l'étude de leurs propriétés cinétiques et biochimiques. Enfin, il existe de nombreuses familles de lipases qui, si elles possèdent une structure commune, présentent des séquences très différentes.

Ce chapitre présente les principales propriétés des lipases qui proviennent essentiellement de l'étude de lipases solubles humaine (lipase pancréatique) et de champignons (*Thermomyces lanuginosus*).

1.5.1 Lipases et estérases : définitions

La nomenclature EC (Enzyme Commission numbers) est une classification numérique des enzymes basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. Une estérase (EC 3.1) est définie par son activité biochimique : c'est une enzyme qui clive une liaison ester en un acide et un alcool grâce à l'utilisation d'eau. Les lipases (EC 3.1.1.3) font partie de la sous-classe des hydrolases spécifiques des esters carboxyliques (EC 3.1.1) et sont définies comme étant des triacylglycérol lipases, donc des enzymes capable d'hydrolyser spécifiquement les liaisons ester carboxyliques des TAGs, qui lient les acides gras au squelette carboné glycérol (voir Figure 1.17). D'un point de vue biochimique, une lipase est obligatoirement une estérase, mais l'inverse n'est pas vrai puisqu'il existe de nombreuses estérases non lipolytiques.

Le principal problème posé par cette définition est que les lipases ne sont fréquemment pas spécifiques des TAG (voir plus bas). Certains chercheurs ont alors essayé de définir une lipase en termes cinétiques. Comme nous le verrons plus loin, l'activité lipase est stimulée en présence de l'interface huile/eau, ce qui n'est pas le cas d'estérases non lipolytiques. Ont alors été opposées, dans les études cinétiques, lipases et estérases (celles-ci étant, implicitement, non lipolytiques), ces deux termes ne correspondant plus aux définitions de la nomenclature EC.





Figure 1.17 – Les lipases catalysent l'hydrolyse des liaisons ester des TAGs.

Les liaisons esters carboxyliques, pointées par les flèches vertes, sont les liaisons qui sont hydrolysables par l'action des lipases. R1, R2 et R3 représentent les chaînes d'acides gras.

1.5.2 Propriétés biochimiques

Nature des substrats hydrolysés

Les TAG lipases sont capables d'hydrolyser les diacylglycérols (DAGs) mais généralement pas les monoacylglycérols (MAGs; portant un acide gras à la position sn-2). Certaines lipases sont aussi capables d'hydrolyser des phospholipides, des galactolipides, des esters de stérol (Dominguez de Maria et al. 2006) ainsi que des esters synthétiques (solubles dans l'eau) à chaîne courte (Fickers et al. 2008). En absence d'eau, les lipases peuvent catalyser la réaction en sens opposé, c'est-à-dire l'estérification. Il est improbable que cette réaction puisse exister *in vivo*. Par contre, cette propriété est largement utilisée dans le domaine de la synthèse organique, où les TAG lipases sont capables d'agir sur des centaines de substrats différents (Schmid et Verger 1998). Il est donc clair que les TAG lipases peuvent aussi hydrolyser de nombreux substrats autres que les TAGS, et ces activités pourraient avoir une signification physiologique.

Spécificité des lipases

Si les lipases ne paraissent pas toujours spécifiques d'un substrat, elles présentent par contre des sélectivités généralement bien définies quant aux acides gras et liaisons ester hydrolysés.

- **Typosélectivité** Hydrolyse préférentielle par rapport à un acide gras donné. En général, les lipases sont plus actives sur des triglycérides à chaînes courte ou moyenne qu'à chaîne longue. Par contre, d'autres types de typosélectivité n'ont été reporté que chez des lipases de plantes. Il semblerait que les lipases des oléagineux manifestent une certaine typosélectivité vis-à-vis de l'acide gras majoritaire de l'huile extraite de la plante. On peut prendre l'exemple de la lipase de ricin qui est très active sur la tri-ricinoléine (Lin et al. 1986). Il faut néanmoins noter que ces résultats ont été obtenus avec des extraits bruts et demandent à être confirmés en utilisant des enzymes pures.
- **Régiosélectivité** Hydrolyse préférentielle des liaisons en position externe du glycérol sn-1 et sn-3 (esters primaires) par rapport à la position centrale sn-2 (ester secondaire). C'est le rapport entre les types de DAGs produits par une hydrolyse *in vitro* qui permet d'établir la régiosélectivité d'une lipase. Si le rapport (1-2,2-3)DAG/(1-3)DAG est de l'ordre de 2, on dit que la lipase est non régiosélective. Si le rapport est supérieur à 2, elle est sélective pour les positions externes, et si le rapport est proche de o, elle est sélective pour la position sn-2. La plupart des lipases sont régiosélectives pour les positions externes.
- **Enantiosélectivité** Hydrolyse spécifique préférentielle d'un énantiomère par rapport à l'autre dans le cas d'un mélange racémique (ex : 1-2 DAG versus 2-3 DAG) et dans le cas d'une molécule chirale (avec trois types d'acides gras différents).

Hydrolyse des TAGs

Les TAGs sont hydrolysés séquentiellement (voir Figure 1.18). Il est clair que la lipase pancréatique humaine peut hydrolyser TAG et DAG. Par contre, elle est incapable d'hydrolyser le MAG portant un acide gras en position sn-2. En ce qui concerne les lipases intracellulaires, elles ne semblent être capables d'hydrolyser efficacement que les TAGs. Une revue récente (Lass et al. 2010) présente l'hypothèse qu'une protéine ayant une activité trans-acylase pourrait convertir les DAGs résultants de l'activité lipase en TAGs et MAGs (Jenkins et al. 2004). Ceux-ci seraient alors hydrolysés par une MAG lipase. En effet, il existe une enzyme capable d'activité MAG lipase chez les mammifères mais ne présentant pas d'activité TAG ou DAG lipase (Karlsson et al. 1997). Il existe des homologues chez Arabidopsis de cette MAG lipase, mais aucune publication à ce jour sur ce sujet.

eau AG eau AG eau AG
$$TAG \xrightarrow{} DAG \xrightarrow{} MAG \xrightarrow{} Glycérol$$

Figure 1.18 – Schéma d'hydrolyse complète d'un TAG.

Les lipases n'hydrolysent pas les trois acides gras d'un TAG à la fois. Il y a donc nécessité d'hydrolyse séquentielle. Est-ce qu'une TAG lipase peut réaliser ces trois hydrolyses séquentiellement?

1.5.3 Mode d'action des lipases : paramètres cinétiques

Les lipases sont des enzymes qui sont solubles dans l'eau, mais catalysent l'hydrolyse de molécules insolubles. On dit que la catalyse se fait en milieu hétérogène, par opposition à une enzyme soluble qui agit sur un substrat lui aussi soluble (catalyse en milieu homogène). Ceci implique que, pour pouvoir hydrolyser son substrat, l'enzyme doit pouvoir d'abord s'adsorber à l'interface huile-eau.

Cinétique interfaciale

Il y a donc une étape précédant la réaction qui est indispensable : l'adsorption de l'enzyme à l'interface. L'importance de l'étape d'adsorption est illustrée par les propriétés de la lipase gastrique, qui n'agit qu'à pH acide. Ceci semble paradoxal car la catalyse requiert une histidine (pKa = 6) catalytique qui doit être ionisée. En fait, c'est l'étape d'adsorption au substrat qui ne peut se faire qu'à pH acide qui détermine donc le pH optimum d'activité de la lipase gastrique. L'optimum de l'activité lipase semble alors être à pH 4, alors que l'optimum d'hydrolyse à proprement parler est à pH 7,5 (Chahinian et al. 2006).

Un autre point important concernant l'accès de l'enzyme au substrat est lié à la surface de l'interface. En effet, on peut intuitivement comprendre que l'accessibilité de l'enzyme au substrat ne dépend pas de la concentration de ce substrat dans l'eau mais de la surface de l'interface eau-huile. D'un point de vue pratique, il faudra utiliser l'émulsion la plus fine possible pour maximiser la surface d'huile accessible à l'enzyme. En utilisant deux émulsions de finesse différente, on s'aperçoit que la vitesse ne dépend pas directement du poids du substrat insoluble. Pour un même poids, la même quantité d'enzyme et des conditions opératoires données, la vitesse est d'autant plus grande que l'émulsion est plus fine : la vitesse dépend de l'aire de l'interface (Benzonana et Desnuelle 1965).

Un modèle cinétique intégrant les particularités mentionnées ci-dessus a été proposé par Verger et De Haas (1973) (voir Figure 1.20 page suivante). Il traduit une cinétique Michaelienne qui se produit, non pas dans un volume mais sur une surface. Ce modèle fait également intervenir un paramètre dénommé « qualité interfaciale » qui regroupe en fait des paramètres physico-chimiques tels que la surface spécifique, la tension interfaciale, la viscosité de surface et le potentiel de surface, ... qui ont des impacts aussi bien sur l'adsorption de l'enzyme à l'interface que sur la catalyse proprement dite.

Activation interfaciale

Sarda et Desnuelle (1958) ont étudié l'activité d'hydrolyse d'un triglycéride à chaîne courte (triacétine), dont la limite de solubilité dans l'eau est assez élevée. Ils ont observé que l'activité lipase était beaucoup plus élevée au dessus de la limite de solubilité de la triacétine qu'en dessous, c'est-àdire que l'enzyme était beaucoup plus active sur un substrat insoluble que sur un substrat soluble (voir Figure 1.19 page ci-contre). Ils ont appelé ce phénomène « activation interfaciale ». Ils ont réalisé la même expérience en utilisant une estérase non lipolytique et ont montré que celle-ci ne présentait pas cette activation. Ce travail a permis de définir une lipase, non sur des critères d'hydrolyse d'un substrat donné mais sur une propriété cinétique particulière.

L'activation interfaciale joue un rôle prépondérant dans les caractéristiques cinétiques des lipases : c'est l'adsorption de l'enzyme à l'interface lipide-eau qui permet à une lipase d'accéder à son substrat, et de catalyser l'hydrolyse des TAGs en glycérol et acides gras. La vitesse de la réaction d'hydrolyse des TAGs par la lipase pancréatique de porc dépend, non pas de la quantité (masse) de substrat, mais de la surface de l'émulsion disponible, et donc du degré d'émulsification du substrat (Benzonana et Desnuelle 1965). Si il n'y a pas d'émulsion, il n'y a pas d'interface lipideeau, l'activité lipase est alors négligeable.

1.5.4 Structure

Les premières structures cristallographiques publiées ont été celles de *Rhizomucor miehei*, et de la lipase pancréatique humaine (respectivement Brady et al. 1990, Winkler et al. 1990). Depuis, un grand nombre de séquences et structures sont accessibles dans des bases de données diverses telle que "The α/β -Hydrolase Fold 3DM Database" (ABHDB) et "The database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins" (ESTHER), respectivement Kourist et al. (2010) et Hotelier et al. (2004). L'analyse de ces données montre que la structure des différentes familles de lipases reste très conservée, même quand celles-ci ne montrent pas d'homologie de séquence (à l'exception de la séquence proche du site catalytique PS00120).



Figure 1.19 – Hydrolyse comparée de la triacétine par l'estérase hépatique de cheval et la lipase pancréatique de porc illustrant le phénomène d'activation interfaciale (d'après Sarda et Desnuelle 1958)

La ligne en pointillée indique la limite de solubilité de la triacétine (triglycéride le plus simple possible, à chaîne à deux carbones et soluble à faible concentration). Les profils de réponse de l'activité vis-à-vis de la quantité de substrats sont différents : l'activité estérase augmente rapidement et atteint sa valeur maximale avant que la limite de solubilité de la triactine ne soit atteinte. L'activité lipase est quant à elle faible avant que son substrat n'atteigne sa limite de solubilité. A partir de ce point, la triacétine s'agrège et forme une émulsion ; une interface lipide-eau apparaît, et la catalyse hétérogène devient possible, l'activité lipase augmente alors.



Figure 1.20 – Modèle cinétique interfacial de Verger et De Haas 1973(tiré de Carrière 2008)

L'hydrolyse des TAGs se déroule en deux étapes. Il y a d'abord adsorption de l'enzyme à l'interface, et ensuite une cinétique plus classique de type michaelienne. Dans le détail, on a dans un premier temps, l'enzyme (E) qui s'adsorbe à l'interface lipide-eau (elle peut être désorbée). L'enzyme adsorbée est dans un état énergétique plus stable (E*) que l'enzyme soluble. La cinétique michaelienne classique intervient ensuite, avec une limite qui est qu'elle se déroule à l'interface, et non pas dans un volume. On a formation d'un complexe enzyme-substrat (E*.S), réaction enzymatique avec formation des produits (P), qui sont relargués. Le cycle peut recommencer.

Repliement α/β

Parmi la large famille des estérases, les structures tridimensionnelles sont conservées. Le repliement α/β est retrouvé chez de nombreuses hy-

drolases telles que les estérases, et donc les lipases. Cependant, les séquences protéiques sont faiblement conservées si bien que l'on ne peut pas prédire une activité lipase d'après une séquence uniquement. Sa structure secondaire est présentée dans la Figure 1.21. Il est formé par huit brins β connectés par six hélices α formant le repliement α/β (Ollis et al. 1992). Il forme une structure de base qui peut être enrichie d'autres brins et hélices qui modifient la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Les interactions protéines-substrat peuvent être modifiées, et entraîner des variations en terme de substrat préférentiel (Dijkstra et Nardini 1999).



Figure 1.21 – Représentation de la structure secondaire du repliement α/β caractéristique des estérases, et retrouvé chez les lipases (Dijkstra et

Cette représentation de la structure secondaire du repliement α/β est limitée à la structure de base. Les hélices α sont représentées par des cylindres blancs alors que les brins β sont représentés par les flèches grises. Les acides aminés intervenant dans la triade catalytique sont pointés en noir. Les lignes pointillées indiquent la localisation des possibles modifications qui viennent enrichir la structure de base.

Triade

Nardini 1999).

Le repliement α/β , permet l'organisation d'une triade catalytique : le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique. La sérine catalytique est généralement incluse dans le pentapeptide GXSXG. Il correspond au domaine prosite PSoo120 ayant la séquence plus étendue : $[LIV]-{KG}-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-{YAG}-G-[GSTAC].$ Au niveau de la structure secondaire des lipases, la sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité Cterminale du 5^{ème} brin β et immédiatement suivie d'une hélice α (voir Figure 1.21). L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxy-terminale du dernier brin du feuillet constituant le repliement α/β tandis que l'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7^{ème} brin (Fickers et al. 2008).

Volet amphiphile

L'idée d'un changement conformationnel des lipases qui contrôlerait leur activité vient de Sarda et al. (1960). Cette hypothèse, en accord avec le phénomène d'activation interfaciale, explique qu'un changement de conformation de l'enzyme lors de son adsorption à l'interface entraîne sa capacité à la catalyse. Ce n'est que bien plus tard qu'a été démontré l'existence d'un volet amphiphile proche du site actif de la lipase de *Rhi-zomucor miehei* grâce à l'utilisation d'un inhibiteur (Brzozowski et al. 1991). Il a été émis l'hypothèse que ce volet est capable de changer de conformation, pour passer d'un état fermé (accès impossible au solvant et donc aux substrats) à un état ouvert, les résidus de la triade catalytique devenant accessibles au solvant. Le passage de l'état fermé à ouvert se ferait lors de l'adsorption de l'enzyme à l'interface, coïncidant avec le phénomène d'activation interfaciale. Il est cependant intéressant de noter que malgré la présence d'un volet, certaines lipases ne présentent pas de phénomène d'activation interfaciale, et inversement : certaines phospholipases A2 ne possèdent pas de volet mais présentent une forte activation interfaciale (Egloff et al. 1995).

Ce modèle faisant intervenir le volet amphiphile dans l'activation interfaciale n'est qu'une hypothèse, basée sur des données cristallographiques et aucun lien n'est établi entre la conformation de l'enzyme et la cinétique de l'activité (Carrière 2008).

1.5.5 Mécanisme enzymatique

Le mécanisme de réaction proposé est extrapolé à partir de celui de la chymotrypsine (Beer et al. 1996). Il est présenté dans la Figure 1.22 page suivante.

Le groupement hydroxyle de la sérine attaque le carbone de la fonction carboxylique du substrat pour former un premier intermédiaire tétraèdrique. Des liaisons hydrogène entre l'oxyanion (oxygène chargé négativement) de l'intermédiaire tétraédrique et des groupes N-H peptidiques stabilisent sa charge et forment le trou de l'oxyanion. Ce trou stabilise la structure tétraèdrique, abaissant l'énergie d'activation de la réaction. La liaison ester carboxylique est rompue et l'alcool (correspondant au glycérol, au DAG ou au MAG) est libéré alors que l'enzyme est acylée. Cette seconde liaison ester carboxylique est alors attaquée par une molécule d'eau, entraînant la formation d'un second intermédiaire tétraédrique. Sa dissociation va permettre de libérer l'acide gras hydrolysé. L'enzyme retrouve sa capacité d'hydrolyse.

1.5.6 L'émergence d'une nouvelle classe de lipases : les lipases à domaine patatine

Il a été mis en évidence, ces dernières années, une famille de lipases dont la ressemblance avec les lipases décrites dans les paragraphes précédents est plus limitée. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine Pfamo1734 : patatin-like, long d'un peu moins de 150 acides aminés, et qui comme son nom l'indique, ressemble à un domaine retrouvé dans les protéines de stockage patatines (Kienesberger et al. 2009). Elle est présente chez différents organismes (Baulande et Langlois 2010), et il semble que les membres de cette famille soient toujours impliqués dans



Figure 1.22 – Mode d'action de l'hydrolyse d'une liaison ester (Beer et al. 1996).

Les étapes qui interviennent dans le mécanisme de la réaction enzymatique sont les suivantes : 1 : complexe de Michaelis non-covalent ; 2 : premier intermédiaire tétraédrique ; 3 : acylenzyme et libération de l'alcool ; 4 : attaque nucléophyle de la molécule d'eau ; 5 : second intermédiaire tétraédrique 2 ; 6 : libération de l'acide gras

l'initiation de l'hydrolyse des TAGs de réserves, quel que soit le règne parmi lequel elles ont été identifiées.

Les membres de cette famille présentent le repliement α/β et le pentapeptide consensus nécessaire à l'activité estérase GXSXG. Ce sont donc des estérases à sérine catalytique ; cependant, la triade catalytique des lipases "classiques" est, chez ces protéines à domaine patatine, remplacée par une diade serine-acide aspartique catalytique (Rydel et al. 2003). La majeur partie des protéines présentant ce type de domaine font partie de la classe des phospholipases A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) et certaines présentent la propriété de l'activation interfaciale, et un volet amphiphile. Une revue présentant la famille des patatines-like chez les plantes est parue récemment (Scherer et al. 2010). Les lipases à domaine patatine sont beaucoup plus proche des phospholipases A2 à domaine patatine que des patatines, les protéines à l'origine de leur nom : il est émis l'hypothèse que ces lipases sont dérivées des phospholipases A2 et se sont spécialisées pour agir en tant que lipase (elles ont d'ailleurs perdu leur activité phospholipase). Les lipases à domaine patatine présentent des différences avec les phospholipases A2 à domaine patatine : les motifs GXGXXG et DX[G/A] typiques de

ces dernières sont absents chez les lipases (Eastmond 2006). On peut dire que ce sont de vraies lipases, au sens où elles sont capables d'hydrolyser les TAG avec acides gras à chaînes longues.

Du fait de leur découverte récente, le mode d'action de ces lipases n'est pas décrit dans la littérature. On peut cependant supposer que les idées présentées dans les paragraphes suivant, bien qu'établies et reconnues pour les lipases que l'on pourrait décrire comme "classique", sont valables pour les lipases à domaine patatine.

1.5.7 Le dosage de l'activité des lipases

De nombreuses méthodes de dosage des lipases ont été publiées. Une bibliographie critique de ces méthodes a été publiée (Beisson et al. 2000). Toutes ces techniques ne sont pas égales et certaines ne peuvent être employées que dans des conditions et des objectifs précis. Je me limiterai ici à préciser les conditions nécessaires pour des tests visant à détecter et quantifier de façon spécifique une activité lipase à partir d'un extrait brut de protéines. La première condition est de s'assurer de la spécificité du test vis-à-vis des lipases. Il est donc impératif d'utiliser comme substrat des TAGs à longue chaîne. Typiquement, on pourra utiliser de l'huile d'olive ou bien un TAG purifié comme la trioléine. Tout substrat artificiel soluble est à bannir car susceptible d'être hydrolysé par des estérases non lipolytiques. Un deuxième point critique est l'utilisation de détergents : ceuxci peuvent nettoyer l'interface de toutes les protéines amphipathiques et ainsi permettre à la lipase d'accéder à son substrat mais leur action ne doit pas être drastique au point d'empêcher l'adsorption de la lipase à l'interface. Le test doit aussi être quantitatif et sensible si l'activité est faible.

Une technique de référence est le titrage des acides gras libérés à l'aide du pH-stat (Desnuelle et al. 1955, Brockman 1981). Elle présente l'intérêt d'être réalisée sous agitation constante. Par ailleurs, l'activité est mesurée en continu et il suffit donc de 3-5 minutes pour mesurer de façon fiable une vitesse initiale. Le principe consiste à titrer par de la soude les acides gras libérés par la lipase. L'activité lipase est donc donnée par le débit de soude. Cette technique présente cependant quelques désavantages : le pH de consigne doit être supérieur au pKa des molécules à titrer (si l'acide n'est pas sous forme ionisée, il n'est pas titrable). La plupart des acides gras à chaîne longue (supérieur à 16 carbones) ont un pKa supérieur à 7 et il est donc impossible de mesurer l'activité lipase en continu en milieu acide par cette technique; Cette technique est également caractérisée par une sensibilité moyenne : on peut mesurer relativement correctement une activité de l'ordre d'1 U (1 micromole d'acide gras libérée par minute) par cette technique, et on peut descendre jusqu'à 0,2 U en prenant certaines précautions.

Dans le cas de faibles activités lipases (inférieures à 0,5 U), l'utilisation de substrat radiomarqué devient nécessaire pour l'obtention de mesures valables. On utilise alors un protocole basé généralement sur la méthode de Belfrage et Vaughan (1969). Une émulsion dans laquelle est incorporée de la trioléine radiomarquée au niveau des acides gras est formée *in vitro*. La lipase y est incubé, et des aliquots sont prélevés à différents temps (la méthode de mesure de l'activité est discontinue). La réaction est stoppée

immédiatement pour chaque aliquot et on réalise une partition de phase avec un système de solvant approprié à pH basique qui permet de garder 80 % des acides gras libérés dans la phase aqueuse tandis que les TAGs passent en totalité dans la phase organique. Il suffit alors de compter la radioactivité présente dans un aliquot de la phase aqueuse afin de déterminer l'activité lipase. Cette méthode est très sensible, et permet une répétabilité relativement correcte. Son inconvénient majeur est lié à la difficulté d'agiter le milieu d'incubation qui limite probablement l'accès de l'enzyme au substrat.

Difficultés liées au dosage de l'activité des lipases végétales

Aucune lipase de plante n'a jamais été purifiée. Cela est probablement lié à la faible abondance de ces enzymes et au fait qu'elles sont probablement membranaires. Les extraits de plantes contiennent des activités estérases dont les niveaux sont plusieurs ordres de magnitude au dessus de l'activité lipase (Huang 1993), ce qui rend obligatoire l'utilisation de substrats naturels. Par ailleurs, les extraits contiennent souvent des protéines amphiphiles (probablement des protéines de réserve) qui se fixent à l'interface lipide-eau et perturbent l'activité lipase (Wang et Huang 1984, Borgstrom et Erlanson 1973). Il est donc essentiel d'apporter un soin particulier aux conditions de test enzymatique de l'activité lipase.

1.5.8 Inhibiteurs de lipases

De nombreuses études ont porté sur les inhibiteurs de lipases et ont apporté des informations sur leurs modes d'action. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de lipases gastro intestinales pour lutter contre l'obésité a généré un ensemble important de données.

Certains de ces inhibiteurs sont capables de se lier de façon covalente avec la sérine catalytique, cette liaison pouvant être réversible dans certains cas. Certains inhibiteurs agissent sur un spectre large d'estérases, lipolytiques ou non. D'autres ont un spectre plus étroit. Par exemple, la tétrahydrolipstatine (THL) semble assez spécifique des lipases, ou au moins d'estérases agissant sur des substrats lipidiques.

Méthode d'inhibition

Différentes méthodes d'inhibition sont possible. On distingue 4 méthodes qui diffèrent dans le mode de présentation de l'inhibiteur vis à vis du substrat et de l'enzyme (Borgstrom 1988, Moulin et al. 1989, Gargouri et al. 1991, Ransac et al. 1997).

La tétrahydolipstatine

La tétrahydrolipstatine (THL), ou orlistat (ou Xenical), a été approuvée en tant qu'agent entraînant la perte de poids, pour le traitement de l'obésité par la "Food and Drug Administration" (FDA) américaine. Elle inhibe les lipases gastrique et pancréatique dans la lumière du tube digestif, et est utilisée dans le but de diminuer l'absorption systémique des graisses contenues dans l'alimentation. Une synthèse des différentes études pharmacothérapeutiques de l'orlistat dans la lutte contre l'obésité a été récemment publiée (McClendon et al. 2009).

La THL, ou (S)-2 formylamino-4 methyl-pentanoic acid (S)-1-[[(2S, 3S)-3-hexyl-4-oxo-2-oxetanyl]methyl]-docdecyl ester est représentée dans la Figure 1.23 page suivante. C'est un dérivé de la lipstatine, un inhibiteur des lipases pancréatiques isolé à partir de la bactérie *Streptomyces toxytricini* (Barbier et Schneider 1987).

La THL a été décrite comme un inhibiteur des lipases gastrique et pancréatique dans de nombreuses publications mais elle agit aussi sur des lipases microbiennes et de plantes (Hadváry et al. 1988, Borgstrom 1988, Gargouri et al. 1991, Ransac et al. 1997, Potthoff et al. 1998, Dhouib et al. 2011, Ngando Ebongue et al. 2006).

Mode d'action de la tétrahydrolipstatine

La THL contient un noyau β -lactone qui est attaqué par la sérine catalytique du site actif de la lipase (Hadváry et al. 1988, Luthi-Peng et al. 1992, Borgstrom 1988) entraînant l'ouverture de ce cycle et la formation d'une liaison covalente avec l'enzyme, avec l'acylation d'un groupe hydroxyle au site actif de la lipase. L'inhibition a été démontrée réversible dans certains cas : dans le cas de la lipase du lait humain, il y a inhibition dans un premier temps, puis elle disparaît progressivement, l'activité étant totalement restaurée au bout de 24 h. L'analyse des produits de cette réaction suggère la possibilité d'hydrolyse de la THL (cycle b β -lactone ouvert Borgstrom 1988).

L'inhibition par la THL est réversible pour d'autres lipases, vraisemblablement selon le même mécanisme (Luthi-Peng et Winkler 1992, Lookene et al. 1994). La Figure 1.23 page suivante présente l'inhibition covalente de la lipase pancréatique humaine (LPH) et le produit possible de l'hydrolyse de la THL (Luthi-Peng et al. 1992).

La THL est-elle spécifique des lipases?

Il a récemment été démontré que l'activité phospholipase de type PLA2 est inhibée par la THL, et qu'elle semble former une liaison covalente avec la GAPDH de *Carica papaya* (Dhouib et al. 2011), et qu'elle inhibe une estérase identifiée chez la même espèce (Abdelkafi et al. 2009). Il a aussi été démontré que la THL est active sur l'acyl-ACP thioestérase humaine (Kridel et al. 2004). Il semble donc qu'augmenter le nombre de substrats à tester, pourrait démontrer un spectre plus large de cibles pour la THL que celui initialement limité aux lipases.



Figure 1.23 – Inhibition covalente d'une lipase par la THL (d'après Luthi-Peng et al. 1992).

La THL est reconnue comme un substrat par lipase pancréatique humaine (LPH). Il y a formation d'une liaison covalente lipase-THL. L'inhibition est réversible : après un temps long, la THL est hydrolysée et la protéine retrouve sa capacité initiale d'hydrolyse.

1.6 LIPOLYSE CHEZ LES PLANTES

Mon sujet de thèse traite de l'implication d'un gène candidat codant pour une lipase dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance postgerminative. La bibliographie présentée dans ce chapitre est orientée sur les activités lipase impliquées dans l'hydrolyse des réserves et qui permettent l'établissement du plantule, après que la graine a germé. Il ne faut néanmoins pas négliger le fait que des lipases interviennent dans d'autres phénomènes.

La première partie de ce chapitre traite donc brièvement des lipases qui n'interviennent pas dans l'établissement de la plantule, afin d'élargir le regard sur les lipases de plantes.

En guise d'introduction à propos de cette section, les trois pages qui suivent constituent le chapitre "Triacylglycerol Lipases" d'une revue générale intitulée "acyl-Lipid Metabolism" (Li-Beisson et al. 2010). J'ai eu l'opportunité de participer à la rédaction de cette revue. Le document complet est disponible librement à l'adresse suivante :

http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0133
Voici un lien direct pour télécharger ce document au format PDF:
http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1199/tab.0133

En complément de cette revue, un site internet a été réalisé. Il est consultable à l'adresse suivante : http ://aralip.plantbiology.msu.edu/.

2.11. Triacylglycerol Lipases

(Vincent Arondel* and Rémi Zallot¹⁶)

2.11.1. Background

Triacylglycerol lipases are enzymes that hydrolyze long-chain, insoluble TAGs. Their biochemical properties and structure–function relationships have been extensively studied in mammals, fungi, and bacteria (Woolley et al., 1994; Schmid and Verger, 1998). Their most important features are summarized in this section.

All possess the same fold, called α/β hydrolase fold (Ollis et al., 1992). This fold is not specific for TAG lipases, as other carboxylesterases unable to hydrolyze lipids share the same fold. The active site is made of a catalytic triad (ser, asp/glu, his). Despite this structural homology, several families of lipases have been described. Their sequences can diverge widely, and only a loose consensus around the catalytic serine (Prosite PS00120) can be noted. Not all known TAG lipases contain this consensus, while a few non-lipolytic esterases do. Therefore, it is not possible to predict a TAG lipase based on sequence information only. Recently, TAG lipases responsible for the mobilization of intracellular stores in yeast, mammals, insects, and plants have been identified (Zechner et al., 2009). They differ from previously characterized TAG lipases: They resemble calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2), they contain a so-called patatin domain, and their active site is made of a catalytic dyad.

TAG lipases can be capable of hydrolyzing other substrates. For instance, most of them can hydrolyze DAG and, more rarely, MAG. In addition, some of them can hydrolyze phospholipids at the sn-1 position, cutin polymer, polyhydroxyalkanoates, steryl esters, and CoA esters. It is likely that widening the range of substrates used to characterize TAG lipases would show several other possible substrates. Actually, lipases used in bioconversions can act on numerous substrates (Schmid and Verger, 1998). Therefore, it is not because an enzyme hydrolyzes TAGs that it acts necessarily as a TAG lipase in vivo. Actually, there are about 50 to 70 putative TAG lipases (based on sequence similarity) in Arabidopsis: it is unlikely that all these enzymes are physiological TAG lipases (aside from the fact that these might be non-lipolytic esterases). For instance, the 'Defective In Anther Dehiscence1' (DAD1) (Ishiguro et al., 2001) encodes a lipase that hydrolyzes both TAGs and glycerolipids; it is likely that only the last function is physiologically relevant (i.e., release of linolenic acid for jasmonate synthesis; Acosta and Farmer. 2010): the activity of recombinant DAD1 on TAGs represents 6% than that on phosphatidylcholine. Furthermore, many enzymes have been sometimes hastily classified as lipases based on partial biochemical characterization. This is the case for the so-called GDSL family of lipases (Akoh et al., 2004). Because insoluble substrates such as TAGs are not convenient to handle, numerous enzymatic studies have been carried out using soluble chromogenic substrates (Huang, 1993; Beisson et al., 2000) such as short-chain esters of paranitrophenol (e.g., para-nitrophenyl acetate or butyrate). Unfortunately, these substrates can be hydrolyzed by esterases that are unable to hydrolyze true lipids. Only the GDSL lipase purified from sunflower has been quantitatively characterized (Teissere et al., 1995) with regard to true lipase activity:

¹⁶ Laboratoire de Biogenèse Membranaire, CNRS/University of Bordeaux, CNRS UMR5200, Bordeaux, France. *Email: vincent.arondel@ubordeaux2.fr

The specific activity on long-chain TAGs (15 nmol fatty acids min⁻¹ mg⁻¹) is five orders of magnitude below the one of pure human pancreatic lipase (3000 μ mol min⁻¹ mg⁻¹) and 3000 times less than pure recombinant SDP1. Recently, a pure GDSL lipase from *B. napus* was found to hydrolyze sinapoyl-choline (Clauss et al., 2008) with a specific activity of 10 μ mol min⁻¹ mg⁻¹. Therefore, it is clear that GDSL "lipases" are esterases. Whether some of them can indeed hydrolyze lipids and can be physiological lipolytic enzymes cannot be excluded, but this remains to be firmly demonstrated.

2.11.2. TAG lipases in Arabidopsis

Biochemical data are available on several TAG lipases from higher plants, most of them obtained from non-pure fractions (Huang, 1993; Mukherjee, 1994). One of the most studied enzymes is castor bean acid lipase, cloned in 2004 (Eastmond, 2004). Only seed and seedling lipases have been studied, except for lattices and the fruit of oil palm. However, TAGs are likely to be present in trace amounts in all tissues (W.L. Lin and Oliver, 2008) and can be abundant in other tissues/organelles than seed oil bodies.

In Arabidopsis, four possible lipases have been cloned and the corresponding recombinant enzymes characterized. AtLIP1 (El-Kouhen et al., 2005) resembles lysosomal acid lipase. It hydrolyzes TAGs with a specific activity estimated at 45 µmol min⁻¹ mg⁻¹. It appears to hydrolyze neither phospho- and galactolipids nor cholesteryloleate. The knockout mutant does not show any obvious phenotype and is not impaired in post-germinative fat storage breakdown. SAG101 (He and Gan, 2002) is a lipase-like protein that plays a role in leaf senescence: Senescence is delayed in antisense plants while over-expression of the gene leads to premature senescence. SAG101 recombinant protein exhibits a weak TAG lipase activity (about 4 nmol min⁻¹ mg⁻¹). At2g31690 codes for a protein that resembles fungal lipases (Padham et al., 2007). It locates to the plastid and is most abundant in 6-week-old leaves. Confocal microscopy studies suggest that neutral lipids are more abundant in antisense plants. Ultrastructure of plastids is modified when compared to WT and the antisense plants show delayed senescence. A purified recombinant protein hydrolyzes TAGs with a low specific activity (about 10 nmol min⁻¹ mg⁻¹). Actually, it appears to be much more active on galactolipids than on TAGs (Seo et al., 2009). A soluble enzyme (At4g24140) with acyltransferase, phospholipase, and TAG lipase activities has been described recently (Ghosh et al., 2009). Specific activities of the recombinant protein are low (pmol min-1 mg-1) on all substrates. Overexpression in yeast leads to a 1.5-fold increase in phospholipid content. Interestingly, At4g24140 shares sequence homology to CGI-58, a known cofactor to the mammalian lipase responsible for intracellular TAG breakdown (Zechner et al., 2009). Sugar dependant 1 (SDP1) is a lipase involved in fat storage breakdown during post germinative growth (Eastmond, 2006); it is discussed below.

2.11.3. TAG lipases involved in Arabidopsis fat storage breakdown

An ethyl methanesulfonate (EMS) mutant screen was performed to select seedlings with impaired growth on minimal media that could be rescued by transfer to a sucrose-containing medium. Among the mutants isolated, sdp1 was found to be affected in a gene that codes for a lipase that controls fat storage breakdown (Eastmond, 2006). The gene was identified by positional cloning and characterized in depth. The evidence presented is fairly strong: Only 20% of the mutant oil is hydrolyzed in 5-day-old seedlings (vs. 98% in WT). Electron microscopy data show that lipid bodies are fairly abundant in mutant 5-day-old seedlings, while they are totally absent from WT control. While lipase activity from a mutant crude extract is reduced by about 20%, the lipase activity specifically bound to oil bodies fell by 75% when compared to WT. An SDP1-GFP fusion protein associates to oil-bodies hemi-membrane in vivo. Recombinant SDP1 protein hydrolyzes triolein with a reasonably high specific activity (50 µmol min⁻¹ mg⁻¹), which is probably underestimated due to experimental conditions (limiting substrate).

SDP1 sequence relates more to iPLA2 than to most TAG lipases. It contains a patatin domain and probably hydrolyzes its substrate through a catalytic dyad. Arabidopsis contains another related gene called SDP1-like (At3g57140). Five-day-old seedlings from a double SDP1-SDP1-like knockout contain exactly the same amount of TAGs as at day 0, strongly suggesting that SDP1-like is responsible for the weak hydrolysis of TAGs detected in the SDP1 mutant (Quettier and East-mond, 2009).

Major unanswered questions:

- 1. How are TAG lipases regulated?
 - The lipolysis step is under regulation as the oil is not degraded in β -oxidation mutants (Graham, 2008). Also, the oil is not mobilized when plantlets are grown on a high-sucrose–lownitrogen media (Graham, 2008). Because SDP1 transcript is predominantly detected in maturating seeds and levels are much lower during postgerminative growth, it is likely that regulation occurs at a posttranscriptional level. A few hints have been suggested (Quettier and Eastmond, 2009): A mutant affected in caleosin, an oil body protein, exhibits delayed TAG breakdown (Poxleitner et al., 2006).
- 2. How are DAG and MAG hydrolyzed during postgerminative growth?

SDP1 recombinant lipase shows no activity on MAG and little activity on DAGs (Eastmond, 2006). This suggests the possible involvement of other lipases capable of hydrolyzing these substrates. There are no obvious candidates, as Atlip1 does not hydrolyze MAGs, either. In mammals, MAG lipases have been described (Karlsson et al., 1997). There are about 15 proteins in Arabidopsis that resemble this enzyme (BLAST scores from 75 to 123). Again, as for TAG lipases, similarity of sequence does not necessarily mean identical function.

3. Are there other physiological TAG lipases?

The studies on TAGs have been focused mostly on seed oil bodies of oleaginous plants. However, TAGs can be found in pollen grain, tapetum cells (Hsieh and Huang, 2004), and leaves treated with ozone or in the process of senescence. Therefore, it is likely that other physiological TAG lipases exist.



Figure 12. Triacylglycerol and Fatty Acid Degradation.

Triacylglycerols are first degraded by cellular lipases to release free fatty acids from glycerol. Then reactions involved in the β -oxidation of straight-chain fatty acids occur in the peroxisome (adapted from Goepfert and Poirier, 2007). "2x cycles" indicates that the molecule undergoes two successive rounds through the β -oxidation cycle. CTS is an ABC transporter involved in the import of β -oxidation substrates to the peroxisome. (A) Examples of the involvement of auxiliary activities in the degradation of oleic acid (C18:1 Δ 9*cis*).

(B) The core β -oxidation cycle.

(C) Example of the involvement of the monofunctional type 2 enoyl-CoA hydratase (ECH2) in the degradation of fatty acids with a *cis* double bond on an even-numbered carbon (C18:1 Δ 6cis, petroselinic acid).

Abbreviations: ACT, acyl-CoA thioesterase; ACX, acyl-CoA oxidase; DCI1, D3,5,D2,4-dienoyl-CoA isomerase; Isom, D3,D2-enoyl-CoA isomerase; KAT, 3-ketothiolase; LACS, long chain acyl-CoA synthetase; MAGL, monoacylglycerol lipase; MFP, multifunctional protein containing a 2E-enoyl-CoA hydratase (ECH) and a 3S-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HACDH); Red, 2,4-dienoyl-CoA reductase; TAGL, triacylglycerol lipase.

For additional details on genes involved in these reactions, please see http://aralip.plantbiology.msu.edu/pathways/triacylglycerol_fatty_acid_degradation

Si les premières lipases de plantes (Ricin, latex de papaye) ont été étudiées il y a près d'une centaine d'années de cela, il faut attendre les années 60-70 pour voir publié le travail important de Ory sur la lipase acide de ricin (Ory et al. 1960). Dans les années 80 sont publiées des études visant à identifier les lipases de plantes impliquées dans l'hydrolyse des TAGs de réserve. Ces études portent essentiellement sur l'étude de l'évolution de l'activité au cours du temps après l'imbibition de la graine, sur la caractérisation biochimique d'un extrait brut, la localisation sub-cellulaire (estimée par fractionnement cellulaire) et des tentatives d'enrichissement et de purification de l'enzyme. Les principales plantes étudiées sont le colza, le maïs et le ricin. Aucun de ces travaux n'a permis de cloner une lipase. Dans les années 1995-2000, l'abondance des études de séquençage systématique d'ESTs et le séquençage du génome d'Arabidopsis ont mis en évidence un grand nombre de lipases putatives. Seule une de celles-ci a permis de mettre en évidence un ADNc codant pour une protéine ayant une activité lipase supérieure à 1 μ g d'AG.min⁻¹.mg lipase⁻¹. La caractérisation des autres « lipases » exprimées de façon hétérologue montre des activités spécifiques généralement de l'ordre de (ou inférieur à) 10 nmol d'AG.min⁻¹.mg protéine⁻¹. La vaste famille des « lipases » dites « GDSL » a été étudiée dès 1995. Tandis que le substrat de certaines d'entre elles a été mis en évidence, il ne s'agit jamais, jusqu'à présent, d'un lipide. Jusqu'à preuve du contraire, ces enzymes sont des estérases non-lipolytiques. La première TAG lipase vraie clonée chez une plante est la lipase acide de Ricin en 2004. La première TAG lipase impliquée dans l'hydrolyse postgerminative des huiles s'appelle SDP1 et a été publiée en 2006. Nous aborderons dans ce chapitre les principaux travaux relatifs à l'analyse biochimique des lipases les plus étudiées, les tentatives d'identifications de lipases de plantes basées sur des données de séquence et la découverte de SDP1.

1.6.1 Caractérisation des activités lipase détectées chez les plantes supérieures

Historiquement, les recherches ont majoritairement été orientées vers les lipases impliquées dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative, donc focalisées sur les lipases des graines des oléagineux. C'est essentiellement de celles-ci dont je parlerai dans cette section. Cependant, il ne faut pas perdre de vue qu'il y a des TAGs dans des tissus très variés, comme par exemple les feuilles, où ils peuvent être stockés dans les plastoglobules (Lin et Oliver 2008, Bréhélin et al. 2007). On trouve également des TAGs dans les cellules du tapetum, qui participent à la synthèse du pollen (Wu et al. 1997). On en trouve aussi dans le pollen dont ils constituent la principale source d'énergie permettant sa germination et la croissance du tube pollinique en vue de la fécondation (Piffanelli et al. 1998, Footitt et al. 2007). Des TAG lipases existent nécessairement pour les hydrolyser, et ont éventuellement été détectées (Piffanelli et al. 1998, Mayfield et al. 2001, Shakya et Bhatla 2010) mais restent inconnues. A l'inverse, il existe des tissus contenant de grandes quantités de lipase, comme le mésocarpe de fruit de palme (Ngando Ebongue et al. 2006) ou bien le latex de papaye, qui ont été clonées (Dhouib et al. 2011) mais dont la fonction physiologique demeure inconnue.

Principales lipases étudiées chez les plantes

Ricinus comunis Le ricin présente une particularité : c'est une des rares plantes dont la graine sèche contient des activités lipase. En effet, deux activités lipases ont été découvertes dans les années 60 associées à la couche lipidique flottante après centrifugation d'un homogénat de graines de ricin non germées (Ory et al. 1962, Ory 1969, Muto et Beevers 1974). Elles sont différentiées par leur pH optimum : on parle de lipases acide (pH opt 4.5) et neutre (pH opt 7). L'activité lipase acide est très forte : in vitro, l'enzyme est capable d'hydrolyser la quasi totalité de son substrat endogène en un temps record de 20 minutes (Ory et al. 1960). Cette activité est élevée dans la graine sèche, augmente fortement pendant les deux premiers jours après l'imbibition et diminue ensuite (Ory et al. 1960). La lipase acide de ricin, appelée RcOBL1 (pour oil body lipase 1), est la première lipase clonée chez une plante (Eastmond 2004a). Le profil électrophorétique de corps lipidiques purifiés, qui contiennent donc une très forte activité lipase, ne montre que trois protéines. Deux sont des oléosines, la troisième présentant environ 30 % de similarité de séquence avec des lipases caractérisées à partir de champignons. C'est une approche protéomique qui a été réalisée sur les membranes des corps lipidiques qui a permis d'identifier RcOBL1.

Des expériences d'immuno-histochimie confirment sa localisation au niveau des corps lipidiques. Divers éléments vont cependant à l'encontre de l'implication de cette lipase dans l'hydrolyse des réserves pour la germination du ricin. En effet, son pH optimum d'activité est acide (pH 4,5) et elle n'est pas active au pH physiologique attendu (pH 7). De plus cette enzyme est présente chez la graine sèche et son maximum d'activité (au jour 1 et 2 après imbibition) semble précéder le maximum d'hydrolyse des TAGs (jour 3 et 4 après imbibition). L'identification des lipases de papaye CpLIP1 et de palme EgTAGL a montré une similarité de séquence d'environ 50 %.

Une lipase neutre montrant un profil compatible avec une fonction dans l'hydrolyse physiologique de l'huile a été mise en évidence par Ory mais non confirmée par d'autres chercheurs (Ory et Angelo 1971).

Il a été mis en évidence une lipase fortement active à pH 9 et associée aux glyoxysomes (Muto et Beevers 1974). L'hypothèse proposée pour le rôle de cette enzyme est l'hydrolyse des MAGs issus de l'activité TAG lipase neutre. Des anticorps dirigés contre une lipase glyoxysomale soitdisant purifiée (Maeshima et Beevers 1985) se sont avérés reconnaître la malate synthase.

Muto et Beevers (1974) ont étudié la succession des activités lipase mesurée pendant la croissance post germinative. Ils ont ainsi mesuré une activité acide associée aux corps lipidique, dont le maximum d'activité (o à 1 jour) précède le pic d'hydrolyse des TAGs (4-5 jours) et une activité alcaline, localisée majoritairement dans les microsomes et la fraction soluble, dont le maximum coïncide avec le pic d'hydrolyse des TAGs.



Figure 1.24 – Succession des activités lipases chez le ricin (Muto et Beevers 1974).

Activité lipase totale (a) (comprise dans la couche huileuse composée des corps lipidiques, dans les microsomes et dans la fraction soluble) à pH 5 (ronds noirs ligne pleine), 7 (ronds noirs ligne pointillée) et 9 (triangles).

Activité dans la couche huileuse (ronds), dans les microsomes (carrés) et dans la fraction soluble (triangles) à pH 5 (b) et à pH 9 (c).

On voit nettement une succession de l'activité, dans un premier temps associée aux corps lipidiques et ensuite une activité partagée entre les microsomes et la fraction soluble. Chaque activité à ses propriétés de pH optimum.

Zea mays Les graines en croissance post-germinative du maïs présentent une activité lipase neutre (pH opt 7,5) associée aux corps lipidiques. Cette activité apparaît au troisième jour et atteint son maximum au sixième jour après l'imbibition (Lin et al. 1983). Cette lipase a été purifiée jusqu'à homogénéité et étant donné son haut poids moléculaire de 270 kDa en gradient de saccharose et de 65 kDa en SDS PAGE, il a été proposé que cette lipase forme un homo-tétramère (Lin et Huang 1984). Cette lipase est très active sur la trilinoléine, TAG majeur de la graine de mais (Lin et al. 1986). Ce travail n'a pas donné de suite, les anticorps dirigés contre l'enzyme purifiée n'ayant pas permis de cloner la lipase (communication personnelle de A. Huang).

Brassica napus Deux activités lipases ont été identifiées sur des homogénats de graines germées de colza (Huang 1993). Une associée aux corps lipidiques, et l'autre a été identifiée dans des fractions microsomales. Ces deux lipases ont des pH optimums différents, des spécificités de substrat différentes et des profils d'expression différents (Hills et Murphy 1988).

Lin et Huang (1983) sont les premiers à décrire une activité lipase localisée au niveau des corps lipidiques chez le colza. Ainsi, 50 % de l'activité lipase totale est mesurée dans la fraction lipidique obtenue suite à une centrifugation à 10 000 g de l'extrait brut de cotylédons récupérés le quatrième jour de germination. Le pH optimum l'activité est déterminé à 6,5 sur trioléine et triérucine montrant qu'il s'agit d'une lipase acide. Cette activité ne représente que 8 % dans le cas des travaux de Hoppe et Theimer (1997b).

La lipase alcaline de colza est la lipase la plus étudiée au niveau biochimique. Dans certains cas, on la retrouve à 90 % dans la fraction membranaire microsomale (Theimer et Rosnitschek 1978). Elle présente une activité forte, de l'ordre de 5 Ui par cotylédons et un maximum d'activité à pH 9. Il n'y a pas d'activité chez la graine sèche. Deux jours après l'imbibition de la graine, il y a apparition de l'activité. Son maximum étant entre les jours 3 et 4 après l'imbibition. Cette lipase présente un profil temporel d'activité en accord avec l'hydrolyse maximale des TAGs au cours de la croissance post-germinative du colza. Une étude immunologique démontre qu'une lipase ayant un poids moléculaire de 56 kDa est localisée dans la fraction microsomale. Cette protéine n'est présente que chez les plantules, et pas dans d'autres tissus. Elle n'est pas présente chez la graine sèche. Elle est néo-synthétisée à partir de 2 jours après l'imbibition, et sa quantité et l'activité qu'on lui attribue semblent synchronisées avec l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative (Murphy et al. 1989). Cette activité lipase est vraisemblablement attribuable à la lipase alcaline glyoxysomale de colza.

Le comportement de cette lipase en fractionnement cellulaire n'est pas classique. En effet, après ultracentrifugation, l'activité lipase se retrouve à 70 % dans le surnageant, on considère qu'elle est soluble Hoppe et Theimer (1997b). Cette fraction soluble a été décrite dans différents articles, mais il n'a jamais été possible d'obtenir l'enzyme correspondante purifiée jusqu'à l'homogénéité (Weselake et al. 1989, Hills et Mukherjee 1990, Ncube et al. 1993, Fuchs et Hansen 1994).

C'est à partir de ces différentes publications d'ordre technique, qui ont permis d'enrichir l'activité lipase correspondante, qu'il a été décidé de travailler, et une partie du travail réalisé avant mon arrivée en thèse est présenté dans le Chapitre 2 page 60. Ce travail a permis d'identifier un gène candidat correspondant à l'activité lipase, possiblement impliqué dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative. Il a ensuite été décidé de travailler sur le gène orthologue, chez la plante modèle Arabidopsis.

Hydrolyse séquentielle des réserves chez le colza Hoppe et Theimer (1997a) présentent un travail très élégant qui présente une hypothèse d'hy-

drolyse séquentielle des corps lipidiques au cours de la croissance postgerminative. La majeur partie de leur travail est réalisée à partir de corps lipidiques purifiés. Ils démontrent que des corps lipidiques purifiés à un et deux jours après l'imbibition de la graine s'autolysent. En réalité, on peut penser que c'est la lipase associée aux corps lipidiques qui réalise cette hydrolyse.

Dans un second temps, il y a apparition de l'activité lipase soluble. L'activité lipase soluble préparée à 4 jours après l'imbibition est capable d'hydrolyser entièrement des corps lipidiques eux aussi préparés 4 jours après l'imbibition. Cette activité lipase soluble est sans doute celle associée aux glyoxysomes, et qui présente un comportement de fractionnement cellulaire anormal.

Cependant, il existe un phénomène très intéressant qui permet d'aller plus loin : l'activité lipase soluble préparée à 4 jours après l'imbibition est capable d'hydrolyser les corps lipidiques d'au moins 2 jours après l'imbibition mais n'est pas capable d'hydrolyser des corps lipidiques de graine sèche ou de graines d'1 jour après l'imbibition.

Devant ces constatations, les auteurs émettent plusieurs hypothèses : l'existence d'une lipase active sur les corps lipidiques très tôt après l'imbibition, qui serait l'enzyme d'hydrolyse initiale des TAGs. Viendrait ensuite une seconde activité soluble qui réaliserait le reste de l'hydrolyse.

Les auteurs soulignent l'importance des protéines qui sont enchassées dans l'hémi-membrane des corps lipidiques qui seraient des protéines qui interviendraient dans le contrôle de l'hydrolyse. Il est possible que ces protéines empêchent dans un premier temps les lipases d'accéder à leur substrat, et éventuellement certaines seraient des protéines d'ancrages des lipases aux corps lipidiques (Hoppe et Theimer 1997a).

Accès aux corps lipidiques

Comme démontré dans la section 1.5.3 page 32, les lipases agissent à l'interface eau-huile. La qualité de l'interface est importante.

In vivo, divers éléments interviennent à l'interface. Différentes hypothèses ont été émises expliquant le contrôle de l'accès des lipases aux corps lipidiques par les protéines qui y sont enchassées. Ces protéines pourraient permettre d'empêcher les lipases d'accéder à leur substrat, ou au contraire, elles pourraient interagir avec elles et constituer des structures d'ancrage.

C'est le cas des oléosines. Elles peuvent intervenir en tant que possible récepteur aux lipases (Wang et Huang 1987), possibles protéines d'ancrage avec les glyoxysomes, permettant le passage facilité des TAGs ou composés issu du catabolisme des TAGs (Chapman et Trelease 1991).

En se reposant sur différents travaux, il a aussi été émis l'hypothèse que des protéases pourraient hydrolyser les protéines enchassées au niveau des corps lipidiques, avant le début de l'hydrolyse de l'huile (Murphy 1990). De manière similaire, il a été émis l'hypothèse que l'hémimembrane phospholipidique devrait être hydrolysée pour que les lipases accèdent aux TAGs.

Il a été montré que des lipases dépourvues d'activité phospholipase

secondaire pouvaient hydrolyser efficacement *in vitro* les TAGs contenus dans les corps lipidiques sans autre intervention. Il a été montré qu'une monocouche de phosphatidylcholine pouvait contenir jusqu'à 5 % des TAGs. La lipase pourrait commencer par hydrolyser ces TAGs, assez lentement, jusqu'à ce qu'un « trou » se forme permettant un accès direct aux TAGs et une augmentation de l'activité (Beisson et al. 2001).

Conclusions

Les travaux de caractérisation des lipases de plantes ont montré l'existence de différents types de lipases. Ces différences concernent le pH optimum des enzymes, qui peut être acide, basique ou neutre. Il a été également montré que ces lipases pouvaient appartenir à différentes fractions sub-cellulaires, comme les corps lipidiques, les glyoxysomes et les microsomes. Par ailleurs, une lipase insoluble mais appartenant à une fraction moins dense que celle des microsomes a été mise en évidence chez le colza. Généralement, à l'exception de la lipase acide de ricin, le pic d'activité lipase est détecté pendant la vitesse maximale d'hydrolyse des TAGs, suggérant que ces lipases pourraient être effectivement impliquées dans l'hydrolyse des huiles de réserve. Malgré de nombreuses tentatives, les lipases n'ont pas été purifiées de façon convaincante puisque les anticorps obtenus contre ces fractions purifiées n'ont pas permis d'identifier puis de cloner ces enzymes. Seule la lipase acide de ricin a pu être identifiée par une approche protéomique, indépendante de son activité enzymatique, grâce à son abondance dans les corps lipidiques.

1.6.2 Tentatives d'identification de lipases par homologie de séquence

L'abondance des ressources d'ESTs et de génomes de plantes permet d'identifier de nombreux gènes par similarité de séquence. Si on établit la liste des gènes d'Arabidopsis codant pour des protéines montrant des similarités avec les séquences de toutes les familles de lipases connues (tous règnes confondus), on obtient 50 à 70 candidats possibles. Environ 50 protéines d'Arabidopsis contiennent le motif Prosite PS00120 décrit $[LIV] - {KG} - [LIVFY] - [LIVMST] - G - [HYWV] - S - {YAG} - G - [GSTAC]$ et la plupart ressemblent à des lipases connues. Une recherche (menée le 18 août 2011) dans la base de données TAIR http://www. arabidopsis.org/ en utilisant le mot clé "triglyceride lipase" identifie 39 loci. Le terme « lipase », employé seul, est présent dans l'annotation de 273 loci. Il est très peu probable que toutes ces protéines soient des TAG lipases et une majorité d'entre elles sont très probablement des estérases non lipolytiques. On ne peut donc pas attribuer à une protéine une fonction de TAG lipase en ne se basant que sur une similarité de séquence. Il est nécessaire d'apporter une preuve fonctionnelle par expression hétérologue d'une lipase active. Il est également important d'utiliser des TAGs à longues chaînes comme substrats et de déterminer des conditions expérimentales permettant d'obtenir une activité spécifique comparable à celle des lipases connues (environ 1000 U.mg⁻¹; 1 U = 1 μ mole d'acide gras libérée par minute), des estérases non-lipolytiques pouvant hydrolyser très faiblement des TAG à longues chaînes (activité spécifique de

l'ordre de 0,01 U.mg⁻¹). Chez Arabidopsis, l'approche visant à identifier des lipases par expression hétérologue de protéines ressemblant à des lipases n'a permis d'identifier qu'un candidat sérieux, appelé AtLip1. C'est la première lipase d'Arabidopsis a avoir été clonée (El-Kouhen et al. 2005). Elle présente une similarité avec la lipase lysosomiale humaine. Une protéine recombinante a été exprimée dans le système baculovirus/cellules d'insecte et présente une activité spécifique estimée à plus de 40 U.mg⁻¹ sur les TAGs à longues chaînes, à pH entre 5 et 7. Chez le mutant *atlip1*, il n'y a pas de modification de l'hydrolyse de l'huile au cours de la germination, ce qui suggère que cette enzyme n'intervient pas à ce niveau. Le rôle physiologique de cette enzyme n'est à l'heure actuelle toujours pas connu.

Parmi les loci d'Arabidopsis dont l'annotation contient le terme lipase se trouve une large famille multigénique de 108 membres, appelées lipases GDSL (Ling 2008). Cette annotation, très probablement erronée, résulte d'une caractérisation biochimique initiale incomplète, qui ne présente que des données qualitatives quant à la capacité d'une protéine à hydrolyser les TAGs à longues chaînes. Les protéines à motif GDSL ont été décrites pour la première fois par Upton et Buckley (1995). Dans la publication originale, qui décrit huit membres de la famille découverte issues de différents règnes, une de ces protéines, issue d'Arabidopsis, est qualifiée de lipase sur la base d'un test qualitatif d'hydrolyse d'AGs à longues chaînes. ce test a été réalisé sur Tween 80 et non pas TAG à chaîne longue (Brick et al. 1995).

La famille des lipases dites « GDSL » contiennent cette séquence consensus GDSL, qui ressemble au motif caractéristique des lipases GXSXG. L'analyse de la structure tridimensionnelle d'une thioestérase de cette famille permet de démontrer un repliement similaire au repliement α/β et la présence d'une triade catalytique (Lin et al. 1998). Une GDSL lipase purifiée à partir du tournesol a été caractérisée (Teissère et al. 1995) en terme d'activité lipolytique. Elle présente une activité extrêmement faible sur les TAGs (15 nmol AG.min⁻¹.mg⁻¹), environ 104 fois moins que la lipase pancréatique humaine (3000 mmol AG.min⁻¹.mg⁻¹). En réalité, les travaux consacrés aux enzymes de cette famille montrent que celles-ci sont effectivement des estérases (pour revue, consulter Akoh et al. 2004) mais les auteurs recherchant une activité TAG lipase ne parviennent pas à en mettre en évidence (Abdelkafi et al. 2009). Cet exemple illustre bien les précautions qu'il faut prendre pour identifier des lipases. C'est la raison pour laquelle nous avons limité le nombre de TAG lipases putatives d'Arabidopsis dans la base de données « Aralip » aux seules enzymes dont l'activité TAG lipase a été démontrée de façon quantitative et aux protéines présentant une très forte similarité (50 %) avec la séquence de TAG lipases avérées.

1.6.3 Identification et caractérisation de SDP1

Un travail majeur décrivant l'identification d'une lipase impliquée dans la croissance post-germinative d'Arabidopsis a été publié par Eastmond (2006). La base du travail à consisté à obtenir une collection de mutants d'arabidopsis présentant des retards de croissance post-germinative, retards pouvant être annulés en fournissant une source de carbone à la plantule. Il est intéressant de noter que cette lipase, appelée SDP1, n'aurait pas pu être identifiée par recherche d'homologie de séquence.

Le criblage Sugar Dependent

Des plantes qui présentent un défaut dans le catabolisme de leurs réserves présentent un arrêt de croissance lorsqu'on les cultive sur milieu minimum. L'apport d'une source externe de carbone (saccharose) permet de rétablir la croissance. C'est sur cette idée simple et robuste que le criblage d'une banque de mutants ethyl methyl sulfonate (EMS) d'Arabidopsis a été réalisé. Le criblage a consisté à sélectionner des plantules pour lesquels il y a arrêt de croissance au stade post-germinatif sur milieu minimum. Les graines utilisées ont été préalablement sélectionnées pour éliminer toutes celles présentant un défaut de remplissage susceptible d'affecter la croissance post-germinative. Les plantules sélectionnées sont repiqués sur un milieu contenant du saccharose, source exogène de carbone qui leurs permet de reprendre leur croissance. La Figure 1.25 présente le phénotype Sugar Dependent et des plantes sélectionnées avec ce criblage, telles qu'elles sont présentées dans la publication de Peter Eastmond (Eastmond 2006).



Figure 1.25 – Illustration du phénotype Sugar Dependent de plantes mutantes *sdp1* (Eastmond 2006).

Photographique illustrant le phénotype Sugar Dependent des plantes pour lesquels il y a arrêt de croissance durant la post-germination. Plantules à 5 jours, la barres représente 1 cm.

Toutes les plantes sélectionnées sont à l'origine de lignées récessives. Ces lignées peuvent être regroupées en 17 groupes de complémentation. Pour 11 de ces groupes, les mutations affectent des gènes déjà caractérisés qui interviennent dans la β -oxydation, dans le cycle glyoxylique, dans la néoglucogenèse ou qui sont nécessaires au bon fonctionnement du peroxysome. Les 6 autres groupes ont été appelés SDP1 à SDP6 (pour Sugar DePendant). Le mutant *sdp1* hydrolyse très faiblement ses TAGs au cours de la croissance post germinative. Le gène SDP1 a été identifié par clonage positionnel. Une protéine recombinante a été purifiée; elle présente une activité TAG lipase. Les caractéristiques d'allèles KO du mutant, du gène et de l'enzyme sont détaillées ci-dessous.



Figure 1.26 – Activité lipase chez les mutants sdp (Eastmond 2006).

Des extraits cellulaires totaux **(A)** et de membranes de corps lipidiques **(B)** sont préparés aux jours o et 2 après imbibition à partir de différents mutants *sdp* et de plantes sauvages (WT) qui ont poussé sur MS avec 1 % de saccharose. Leur capacité à hydrolyser de la trioléine radio-marquée a été mesurée. On voit que l'extrait de membranes de corps lipidiques de certains mutants est sévèrement impacté voir incapable d'hydrolyser la trioléine. On a chez ces mutants, perte de l'activité de la lipase associée aux corps lipidiques alors que l'extrait total perd peu de capacité à l'hydrolyse.

L'activité lipase a été mesurée à partir d'extrait protéiques de plantes mutantes sélectionnées et présentant le phénotype Sugar Dependent et comparée à celle de plantes de type sauvage (voir Figure 1.26). Elle a été mesurée, tout d'abord sur un extrait total, de graines sèches (jour o) et de graines 2 jours après l'imbibition. Au jour o, l'activité est très faible dans tous les cas, aussi bien pour les plantes sauvages que pour les plantes mutantes : de l'ordre de la mU (pour rappel : 1 U = 1 μ mol d'AGs libérés.min⁻¹.mg⁻¹). Au jour 2, l'activité mesurée est plus forte ; de l'ordre de 70 mU pour le type sauvage. Certains mutants présentent une réduction non négligeable dans l'activité lipase mesurée au jour 2 : ce sont les mutants *sdp1*, *sdp2*, *sdp3* et *sdp5*. Les membranes des corps lipidiques de ces mutants ainsi que de plantes sauvages ont été purifiés, et de manière similaire, l'activité lipase qui leur est associée a été mesurée. Encore une fois, au jour o, l'activité est très faible ; au jour 2, chez le type sauvage,
on note une activité de l'ordre de 30 mU. Les mutants *sdp1*, *sdp2* et *sdp3* présentent une forte réduction dans l'activité lipase associée aux corps lipidiques. Comme expliquée précédemment, la baisse d'activité associé aux corps lipidiques chez le mutant *sdp2* s'expliquerait par une inhibition de la protéine SDP1; on retrouve alors le phénotype correspondant et donc une baisse de l'activité lipase du même ordre. Le mutant *sdp3* n'a toujours pas été décrit à ce jour.

SDP1 est la lipase qui contrôle l'hydrolyse des réserves chez Arabidopsis thaliana

La protéine SDP1 est codée par le gène At5g04040. La publication de Peter Eastmond présente 3 allèles mutants pour ce gène obtenus par mutagenèse de type EMS. Il faut leurs ajouter 2 mutants d'insertion nuls (KO) de type T-DNA (Alonso et al. 2003). Ces 5 mutants sont présentés comme identiques d'un point de vue phénotypique (voir Figure 1.25 page 52). Des données de microscopie démontrent que ces mutants présentent une absence d'hydrolyse de l'huile contenue dans les corps lipidiques à 5 jours à après l'imbibition : on voit très clairement que les corps lipidiques ne sont pas dégradés chez des plantes mutantes pour sdp1 par rapport à des plantes de type sauvage. C'est cette absence d'hydrolyse qui entraîne le phénotype Sugar-dependent : un arrêt de croissance post-germinative. Les mutants *sdp1* ne présentent pas de problème au niveau de la germination en elle-même.

L'étude microscopique est complétée par une analyse de la quantité des TAGs au cours du temps. Alors que chez les plantes de type sauvage on a dégradation des TAGs qui seront utilisés en tant que source de carbone pour l'établissement de la plante, il est très clair que chez les mutants *sdp1*, cette dégradation est fortement réduite, voir quasiment absente : la quantité de TAGs mesurée reste donc élevée (voir Figure 1.27).



Figure 1.27 – Évolution de la quantité de TAG chez des plantes sauvages (WT) et mutantes *sdp1-1* au cours du temps (Eastmond 2006).

Chez les plantes mutantes *sdp1-1* on a quasiment pas d'hydrolyse des TAGs au cours du temps par rapport aux plantes sauvages. Il est à noter que chez les plantes *sdp1-1*, il semble qu'il y ait plus de TAGs que chez les plantes sauvages.

La quantité de TAG mesurée chez les plantes mutantes *sdp1* reste quasiment la même tout au long de la phase de post-germination : les TAGs ne sont pas dégradés. Chez les plantes de type sauvage (WT), il y a dégradation. Le gène responsable de la dégradation des TAGs chez Arabidopsis est sdp1. Une quantification des acyls-CoA a été réalisé chez le mutant *sdp1* en parallèle de plantes sauvages. Chez le mutant, il y a une diminution notable d'acyls-CoA de manière générale, et plus notamment en AG 20:1. Cela traduit une incapacité à cliver les TAGs en glycérol et AG (pour rappel, l'AG 20:1 est un acide gras spécifique des TAGs chez Arabisopsis voir page 11).

SDP1 est une TAG lipase à domaine patatine, telle qu'elles sont décrites dans la sous-section 1.5.6 page 35. SDP1 possède un motif sérine estérase GXSXG, mais cependant pas ne correspond donc pas aux lipases dites "classiques". SDP1 est cependant une lipase vraie, au sens ou sa fonction première est l'hydrolyse des TAGs à chaînes longues.

Dans le génome d'Arabidopsis, on trouve deux protéines avec une forte ressemblance à SDP1 : SDP1-like (SDP1L) et adipose triglyceride lipase-like (ATGLL en référence à la lipase de mammifère impliquée dans l'hydrolyse des réserves). Tout récemment, il a été publié des données concernant ces mutants (Kelly et al. 2011). SDP1L est responsable de la faible activité lipase résiduelle chez le mutant *sdp1*, et c'est elle qui est responsable de la dégradation des TAGs observable chez le mutant sdp1 (voir Figure 1.27 page ci-contre). Le double mutant *sdp1/sdp1-like* présente un phénotype accentué de sdp1 (Quettier et Eastmond 2009, Kelly et al. 2011). SDPL complémente partiellement le mutant *sdp1* lorsqu'elle est exprimée sous contrôle du promoteur fort 35S ou sous le contrôle du promoteur SDP1L. In vivo, on peut déduire que SDP1 est responsable de 80 % de l'activité lipase associée aux corps lipidiques. De la même façon, on peut déduire que l'activité SDP1 ne représente au jour 2 seulement 15 % de l'activité lipase totale. Si l'on considère à la fois SDP1 et SDP1L, ces 2 enzymes sont responsables de plus de 90 % de l'activité lipase associée aux corps lipidiques mais de moins de 20 % de l'activité lipase totale.

Les fonctions de SDP1 et SDP1L semblent redondantes. Chez le double mutant *sdp1/sdp1l*, le taux d'hydrolyse des TAGs est de l'ordre de 5 % comparée à une plante sauvage. Malgré cette réduction drastique, et dans les conditions de laboratoire, seule une infime partie des plantes ne se développent pas normalement. Il existe un retard statistiquement démontré de ces plantes vis-à-vis de plantes sauvages, mais elles finissent par se développer. Il est émis l'hypothèse que ces 5 % peuvent être suffisants pour qu'une partie (ou la totalité) des cellules des cotylédons de ces individus puissent établir leur capacité photosynthétique et que cela suffit à ce qu'une fois que la photosynthèse a débuté, ces cellules puissent exporter le carbone nécessaire à l'ensemble du plantule, permettant son établissement. Ceci semble confirmé par le fait que si l'on enterre à 5 mm de profondeur les mêmes graines, aucune ne s'établie. Les gènes SDP1 et SDP1-like sont important mais pas indispensables pour la croissance post-germinative (Kelly et al. 2011).

Un gène chimère codant pour une protéine de fusion SDP1-GFP a été construite par Peter Eastmond. Son expression transitoire dans une plante mutante sdp1 à 5 jours après imbibition permet de confirmer la localisation associée aux corps lipidiques. Cette protéine chimère est fonction-nelle et on la retrouve active dans une fraction de corps lipidiques purifiés

(Eastmond 2006). Une expression hétérologue chez la levure suivie de la purification de la protéine taguée Hisx6 a été possible. Une caractérisation biochimique de cette protéine recombinante rSDP1 a été réalisée et permet de définir son pH maximum qui est de l'ordre de 8. L'activité sur différents substrats ainsi que l'effet de différents inhibiteurs ont été mesurés.

Ces données sont cependant informatives sur la capacité à hydrolyser ou non certains substrats. Il faut en retenir que rSDP1 est capable d'hydrolyser préférentiellement les TAGs, puis dans une mesure moindre les DAGs, mais pas les MAGs, et qu'elle n'est pas influencée par l'Oleoyl-CoA; il semble qu'elle ne soit pas l'objet d'une régulation négative directe par les acyl-CoAs.



Figure 1.28 – Profil d'expression du gène sdp1 (Eastmond 2006).

L'expression du gène sdp1 augmente pendant la mise en place des réserves dans la graine, puis diminue avec l'arrêt du métabolisme. Le niveau de transcrit reste élevé dans la graine sèche, puis diminue avec la reprise du métabolisme. Alors qu'il y a des transcrits sdp1 pendant la germination, l'expression de sdp1 semble être nulle pendant la croissance post-germinative. DAF : Jours après floraison; DAI : jours après imbibition.

Le profil d'expression de sdp1 ne correspond pas à la prédiction que l'on pourrait en faire à savoir : la lipase qui contrôle la post germination n'est pas exprimée pendant cette phase (voir Figure 1.28). sdp1 et sdp1l présentent des profils d'expression similaires. Cependant, sdp1l est exprimé moins fortement et est spécifiquement exprimé au niveau du pollen. Son rôle dans ce cas précis pourrait être l'hydrolyse des réserves pour l'avancée du tube pollinique pour la fécondation (voir la sous section 1.6.1 page 46). Etonnamment, le profil d'expression du gène sdp1 (et sdp1) d'ailleurs) correspond à la mise en place des réserves plutôt qu'à leur hydrolyse. Ceci est à mettre en parallèle aux données présentées dans la sous-section 1.2 page 8. Pour rappel, à la toute fin de la mise en place des réserves, il y a une diminution de la quantité d'huile dans la graine (voir Figure 1.2 page 8). On peut se poser la question d'un rôle de la protéine SDP1 (et de SDP1L) dans ce phénomène : il n'y a qu'une très légère augmentation de la quantité de TAG par graine chez le mutant sdp1 par rapport au sauvage (voir Figure 1.27 page 54). Une possible explication pourrait être la nécessité de stocker les protéine SDP1 et SDP1L pour qu'elles soient disponibles dès l'imbibition, alors que la machinerie de transcription et de traduction n'est pas encore en place. Dans ce cas, à l'imbibition, elles seraient dé-stockée et pourraient agir sur les corps lipidiques pour initier l'hydrolyse de l'huile, et permettre l'initiation de la libération de l'énergie nécessaire à la reprise du métabolisme. Les gènes sdp1 et sdp1l sont importants mais non indispensables.

Chez les mammifères, il existe un gène appelé Comparative Gene Identifier 58 (CGI58), décrit comme étant un co-activateur de la lipase à domaine patatine Adipose TriGlyceride Lipase (ATGL) qui est impliqué dans l'hydrolyse des réserves (Lass et al. 2006). Il existe chez Arabidopsis, une protéine homologue à ATGL appellée ATGL-like (ATGLL) (Eastmond 2006, Kelly et al. 2011). Un mutant atgll d'arabidopsis ne présente pas de défaut d'hydrolyse des TAGs pour la croissance post-germinative, suggérant qu'il n'y participe pas (Kelly et al. 2011). Son rôle biologique n'est cependant pas défini. Chez les mammifères, CGI58 ne présente pas d'activité lipase, cependant, il a été mis en évidence que des homologues de cette protéine chez la levure (ICT1) et chez arabidopsis (CGI58-like) possèdent une activité TAG lipase, phospholipase, et acide lysophosphatidique acyl transférase (Ghosh et al. 2008; 2009). Sa fonction d'activateur d'ATGL tel qu'il a été décrit chez les mammifères semble unique, puisqu'elle ne semble pas conservée chez arabidopsis ou la levure. Chez arabidopsis, le mutant cgi58l n'est pas impacté dans la croissance postgerminative (James et al. 2010, Kelly et al. 2011). Cependant, ce mutant présente une accumulation non négligeable de TAGs dans ses feuilles, suggérant que la fonction biologie in vivo de CGI58L est une activité lipase vraie, mais non liée à l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative.

1.6.4 Organisation de l'activité lipase au cours du temps

On retrouve chez différentes espèces de plantes une organisation de l'activité lipase au cours du temps. Peu de publication l'on directement évoqué. Dans un premier temps, l'activité lipase associée aux corps lipidiques est la première à apparaître. Cette activité représente une proportion faible de l'activité lipase totale, mais elle est d'une importance considérable, comme le démontre les publications qui traitent SDP1 (Eastmond 2006, Quettier et Eastmond 2009, Kelly et al. 2011). Le pic de cette activité, dans les premiers jours après l'imbibition de la graine, ne correspond cependant pas au pic maximum d'hydrolyse des TAGs. En effet, alors que l'activité associée aux corps lipidiques diminue, l'activité lipase soluble (ou associée aux glyoxysomes) apparaît ensuite pour atteindre son maximum aux jours 3 à 4 après l'imbibition. Cette seconde activité coïncide avec le maximum d'hydrolyse des TAGs. La figure 1.24 page 47 illustre très bien cette organisation des activités lipases dans le cas du ricin.

CONCLUSION DU CHAPITRE

Pour qu'une plante puisse s'établir, il y a mise en réserves dans la graine de l'énergie et des éléments qui vont lui être nécessaires ensuite. Cette énergie et ces éléments sont stockés dans des structures spécialisées. Chez les oléagineux, la forme majoritaire de stockage du carbone est réalisée sous forme de TAGs, dans les corps lipidiques. Plusieurs étapes sont nécessaires à l'établissement d'un plantule à partir des ressources de la graine. L'étape la plus importante est la croissance-post germinative. Durant cette étape, il y a nécessité d'hydrolyse des réserves de la graine, puisque celle-ci n'a pas encore acquis la capacité de photosynthèse et n'est donc pas encore autotrophe. La première étape du catabolisme des TAGs est réalisé par l'action d'une lipase, qui libère des acides gras du glycérol, ensuite métabolisés en éléments simples et énergie. Les lipases sont des enzymes atypiques, qui fonctionnent à l'interface formée par leur substrat, les TAGs et l'environnement aqueux qui les entourent. Très peu de lipases végétales sont connues. Cela est du au fait que certaines de leurs propriétés biochimiques font que ce n'est pas le sujet d'étude le plus simple. Bien qu'il existe des lipases qui n'interviennent pas dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative, ce ne sont pas les plus étudiées. L'étude de la lipolyse pour la croissance germinative est toujours en cours. Récemment, il a été mis en évidence chez la plante modèle Arabidopsis thaliana, qu'une lipase à domaine patatine, SDP1, est la lipase clé du contrôle de la lipolyse pour l'établissement des plantules. Il existe une lipase homologue à SDP1, SDP1L qui agit de concert avec elle. Ces lipases sont associées aux corps lipidiques et bien que ce soient des enzymes très importantes physiologiquement parlant, elles ne représentent qu'une faible partie, de l'ordre de 20 %, de l'activité lipase totale au cours de la croissance post-germinative. La grande partie de l'activité lipase restante a été caractérisée au niveau biochimique, cependant aucun des gènes responsables de cette activité, n'a pour l'heure été identifié.

Travail réalisé avant mon arrivée en thèse

IVI IVI P	AIKE					
2.1	Fractionnement de l'activité lipase	60				
2.2	Enrichissement de l'activité lipase	60				
2.3	Marquage par la tétrahydrolipstatine	61				
2.4	Identification de protéines candidates	61				
2.5	Taille de la lipase putative	64				
Con	Conclusion					

ANS ce chapitre, je présente le travail qui a été réalisé avant mon arrivée en thèse.

Le travail présenté dans ce chapitre a été réalisé essentiellement par R. Dhouib, avec la participation de H. Manzoor. Les expériences de détermination des peptides par spectrométrie de masse ont été réalisées à la plateforme de protéomique de Bordeaux, sous la direction de Marc Bonneu. Ce travail a permis d'identifier la lipase putative dont l'étude est l'objet de ma thèse. Les éléments présentés dans ce chapitre sont : le comportement de la lipase au cours d'expériences de fractionnement sub-cellulaire, les étapes d'enrichissement nécessaires pour concentrer une lipase présente en faible abondance, en vue de pouvoir la marquer par un inhibiteur radioactif et l'identification de cette enzyme par spectrométrie de masse. 2

2.1 FRACTIONNEMENT DE L'ACTIVITÉ LIPASE

Le matériel végétal (plantules étiolées de colza à 4 jours après imbibition) a été broyé au froid, à l'aide d'un pilon et d'un mortier, dans un tampon Tris pH 7,5 simple, ne contenant pas d'inhibiteur de protéase. Le broyat a été filtré sur Miracloth et centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes. Le tube présente un culot de débris, une fraction claire et une couche huileuse à sa surface. La couche huileuse et la fraction claire ont été prélevées séparément. La couche huileuse a été diluée par le tampon d'extraction et re-centrifugée, cette opération étant répétée trois fois afin d'obtenir une couche huileuse sans contamination par la fraction claire. Une mesure de l'activité lipase à pH 9 montre que 91 % de celle-ci est dans la fraction claire et 9 % dans la couche huileuse. Aucune activité n'est détectée dans le culot de débris.

La fraction claire a été centrifugée à différentes vitesses, pendant des durées variées. Après une centrifugation de 20 minutes à 35 000 g, toute l'activité lipase est retrouvée dans le surnageant. La centrifugation du surnageant à 164 000 g pendant 1h30 donne un culot contenant environ 1/3 de l'activité lipase, les 2/3 étant dans le surnageant. Si ce dernier surnageant est lui-même centrifugé 3 h à 222 500 g, alors l'activité lipase est également répartie entre culot et surnageant.

Ces résultats indiquent que l'activité lipase présente un comportement ni de protéine membranaire (celles-ci culottent en majorité lors d'une centrifugation d'une heure à 105 000 g), ni de protéine soluble, celles-ci, quand leur masse est inférieure à 100 kDa, ne sédimentant pas lors de la centrifugation la plus forte réalisée. On retrouve donc le comportement inhabituel de cet enzyme, tel qu'il a été décrit dans la littérature (Weselake et al. 1989) : l'enzyme responsable de l'activité est insoluble mais ne semble pas être liée aux membranes. La lipase pourrait donc s'agréger de façon artéfactuelle lors du broyage. Son comportement rappelle celui observé pour la lipase pancréatique du porc : cette enzyme est agrégée à des lipides ce qui empêche sa purification. La forme de lipase dite lente, c'est-à-dire présentant un comportement chromatographique en adéquation avec sa masse moléculaire n'a été obtenue qu'après délipidation du pancréas avant extraction (Verger et al. 1969). L'application du protocole de délipidation utilisé avec succès pour la lipase de porc n'a pas permis de modifier le comportement de la lipase de colza, ainsi que l'utilisation de protocoles plus stringents (Soxhlet en utilisant du chloroforme/méthanol 2/1 v:v comme solvant).

2.2 ENRICHISSEMENT DE L'ACTIVITÉ LIPASE

La fraction claire mentionnée ci-dessus présente une activité lipase de 2 U.mg⁻¹ (1U = 1 μ mole d'acide gras libéré par minute). En se basant sur l'activité spécifique de lipases connues (quelques milliers d'unités par mg de protéines), un enrichissement conséquent était nécessaire au succès de l'approche envisagée. Cet enrichissement a été réalisé par centrifugations différentielles, en profitant des propriétés particulières de l'enzyme (voir le Tableau 2.1 page suivante). L'utilisation d'un tamis moléculaire a permis d'enrichir légèrement plus l'activité lipase et, selon les expériences, il a été

Échantillon	Volume (mL)	Activité (U.mL ⁻¹)	Protéine (mg.mL ⁻¹)	Activité totale (U)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	Rendement	Enrichissement
Extrait total	425	5,89 ± 0,19	11,11	2503	4721,75	0,53	100 %	1
Surnageant après 30 000 rpm	370	3,89 ± 0,19	10,9	1439,3	4033	0,36	57,50 %	0,67
Culot post 40 000 rpm	9	202,5 \pm 22,5	25	1822	225	8,1	72,80 %	15
Culot post 40 000 rpm solubilisé avec du CHAPS	20	53,16 ± 7,75	3,72	1063,33	74,4	14,29	42,00 %	27
Surnageant post 55 000 rpm	18	$33\pm$ 5,57	0,9	594	16,2	36,67	23,70 %	69

possible d'obtenir des fractions ayant une activité spécifique maximale de 30 à 50 U.mg⁻¹. Compte tenu de l'activité spécifique prêtée à la lipase, celle-ci devrait représenter un à quelques pourcents des protéines totales.

Tableau 2.1 – Étapes de centrifugation, rendement et enrichissement de l'activité lipase

Ces différentes étapes de centrifugation permettent un enrichissement de l'activité lipase d'un facteur 69.

2.3 MARQUAGE PAR LA TÉTRAHYDROLIPSTATINE

La tétrahydrolipstatine (THL), est un inhibiteur spécifique des TAG lipases à sérine catalytique. Le mécanisme d'inhibition implique la formation d'une liaison covalente à la sérine catalytique impliquée dans l'hydrolyse des TAGs. L'activité lipase (enrichie) présente chez *Brassica napus*, est sensible à cet inhibiteur. Pour identifier la protéine responsable de cette activité, l'idée est donc d'utiliser la THL en tant qu'hameçon. Afin d'identifier les protéines qui lui sont liées, la THL utilisée est radiomarquée. Les fractions enrichies en activité lipase sont incubées en présence de THL radiomarquée. Les protéines sont ensuite séparées sur gel SDS-PAGE, et une autoradiographie du gel est réalisée. La THL radiomarquée, liée de manière covalente à la protéine hameçonnée, apparaît donc sous la forme d'une protéine de 42 kDa. La figure 2.1 page suivante présente le résultat obtenu à partir de l'extrait enrichi par centrifugation différentielle. La bande marquée ne correspond à aucune bande clairement visible sur le gel, ce qui suggère qu'elle reste peu abondante.

2.4 IDENTIFICATION DE PROTÉINES CANDIDATES

La filtration sur gel montre bien la mauvaise résolution de l'activité lipase (voir Figure 2.2 page 63). Par contre, l'analyse par électrophorèse des fractions montre que les protéines les plus abondantes sont, elles, correctement résolues. On pouvait donc penser que les contaminants de la lipase de deux fractions éloignées pourraient ne pas être les mêmes, limitant ainsi la liste des candidats aux seules protéines présentes dans les deux fractions. Les fractions 29 et 37 du profil montré Figure 2.2 page 63 ont été incubées avec de la THL non radioactive et chargées sur un gel



Figure 2.1 – Révélation d'une bande unique par la tétrahydrolipstatine radiomarquée

Cette figure présente une illustration du résultat obtenu pour une fraction enrichie après incubation avec de la THL radiomarquée. Elle présente un profil protéique complexe, visible en SDS PAGE. Malgré la complexité de l'échantillon, une unique bande est révélée en autoradiographie. Cette bande à une masse moléculaire estimée de 42 kDa.

d'électrophorèse. Pour les deux fractions, 3 bandes de moins d'un millimètre ont été découpées, correspondant à la taille de la bande attendue, plus les bandes au millimètre immédiatement supérieur et inférieur. Ces bandes ont été analysées par spectrométrie de masse (analyse MS/MS de peptides trypsiques) et les spectres utilisés pour cribler le protéome d'Arabidopsis.

Moins de 20 protéines ont été retrouvées dans les bandes de 42 kDa provenant des deux fractions 29 et 37 (voir le Tableau 2.2 page suivante). La présence d'au moins la moitié d'entre elles s'explique par leur abondance. Certaines des enzymes sont des hydrolases qui pourraient être des cibles potentielles de la THL (voir le Tableau 2.2 page ci-contre).

Le candidat le plus plausible est la lipase putative. Elle présente une homologie notable avec la lipase acide de ricin publiée par Eastmond (2004a) ainsi qu'avec la lipase de papaye (>50 et 60 % de similarité, respectivement; voir le Tableau 2.3 page 64). Elle correspond à la protéine codée par le gène At1g45201. Ce gène est présent dans la base de donnée TAIR, et est appelé TLL pour Triacylglycerol Lipase Like. Les résultats obtenus au cours de ma thèse me poussent à dire que ce gène code bien pour une triacylglycérol lipase. Je propose donc de modifier son nom en AtTAGL, pour Arabidopsis thaliana TAG lipase. De manière similaire, je propose d'appeler la protéine (et le gène qui l'encode) identifié chez *Brassica Napus* par BnTAGL.

Protéines communes aux 2 fractions (Arabidopsis)	Poids moléculaire déduit à partir de l'ADNc (kDa)	Possible activité estérase	Possible acide aminé catalytique impliqué
AcylCoA oxidase	47		
Catalase	55		
Cruciferin	50		
Cysteine proteinase	51	+	cystéine
Elongation factor 2 (EF2)	94		
GDSL lipase	43	+	sérine
GDSL fucosidase	40	+	sérine
Glucan-protein synthase	41		
Heat Shock protein	71		
Isocitrate liase	64		
Putative lipase (AtTAGL)	44 et 55	+	sérine
Mannosidase	105 à 115	+	
Myrosinase associated protein	43	+	sérine
Myrosinase/Glucosidase	60	+	
Nitrilase	45	+	cystéine
PEP Carboxykinase	73		
Regulatory proteosome (small) subunit	44 ou 108		
Rubisco	53		

Tableau 2.2 – Protéines détectées dans la bande de 42 kDa

Sont présentées dans ce tableau les protéines détectées dans le protéome d'Arabidopsis par les spectres MS/MS résultant de l'analyse des peptides trypsique de la bande de 42 kDa. Ne sont présentées que les protéines contenues à la fois dans les fractions 29 et 37.

La lipase putative, AtTAGL est retenue en tant que candidat.



Figure 2.2 - Profil chromatographique obtenu après Filtration sur gel

L'extrait enrichi par centrifugation différentielle a été chargé sur une colonne ACA34. La colonne a été calibrée par quelques protéines de masse moléculaire connue, indiquées par des flèches. L'activité lipase est très étalée et une partie est trouvée dans le volume mort de la colonne (> Mr > 700 kDa).

Les fractions allant de 29 à 41 présentent de fortes activités, avec de 16 à 28 U.mg⁻¹ et l'activité la plus forte se trouve dans la fraction 30 avec 10 U.mL⁻¹.

	BnTAGL	AtTAGL	RcOBL1	CpLIP1		
BnTAGL		89.9	52.1	60.4		
AtTAGL	81.2		52.1	61.3	τil.	
RcOBL1	35.8	36.9	—	52.8	sin	
CpLIP1	44.8	45.2	35.7		%	
% identity						

Tableau 2.3 – Identité et similarité entre BnTAGL (reconstruite), At-TAGL, RcOBL1, et CpLIP1

BnTAGL et AtTAGL partagent 89,9 % de similarité et 81,2 % d'identité. Les valeurs sont plus faible avec RcOBL1 et CpLIP1, mais tout de même assez forte pour penser que ces protéines sont des TAG lipases. Cp : *Carica papaya*, Rc : *Ricinus communis* Tableau réalisé avec TexShade (Beitz 2000a) à partir d'un alignement Clustalw 2 (Larkin et al. 2007).

2.5 TAILLE DE LA LIPASE PUTATIVE

Selon le modèle d'épissage du gène At1g45201, la taille de la protéine codée par le gène pourrait être soit de 44 kDa, soit de 55 kDa. Des bandes supplémentaires ont été découpées sur le gel et analysées par spectrométrie de masse. Aucun peptide correspondant à AT1g45201 n'est détecté dans les bandes correspondant à des masses supérieures à 42 kDa alors que quelques peptides sont mis en évidence dans les deux bandes immédiatement inférieures à celle de 42 kDa. La séquence de l'ADNc de BnTAGL a été reconstituée à partir d'ESTs présentes dans GenBank (voir la Figure 2.4 page 66). Il code pour une protéine de 55 kDa. Les peptides contenus dans cette séquence et identifié par spectrométrie de masse sont au nombre de 18. Aucun d'entre eux n'est contenu dans la partie N-terminale de la protéine déduite (80 premiers acides aminés; voir la Figure 2.3 page suivante). Un clivage protéolytique de ce segment Nterminal pourrait expliquer la taille plus réduite de la protéine marquée par la THL. Une telle différence de taille a été observée dans le cas de la lipase de papaye CpLip1 (Dhouib et al. 2011).

CONCLUSION DU CHAPITRE

Ce travail a permis d'identifier un bon candidat correspondant à la lipase présente dans les plantules de colza et déjà étudiée par plusieurs chercheurs. Il a été décidé de continuer le travail sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, et de caractériser le gène correspondant AtTAGL et de comprendre son rôle physiologique pour la plante. Cet objectif constitue mon projet de thèse.



Figure 2.4 - Les acides ar en rouge. Fig		BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus	BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus	BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus	BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus	BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus	BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus	BnTAGL AtTAGL RcOBL1 consensus
– Alignement des protéines candidates BnTAGL (reconstruite), AtTAGL avec la lipase caractérisée de Ricin RcOBL1 uninés de la triade catalytique, tels que définis par Eastmond (2004a) dans la publication caractérisant la lipase de ricin RcOBL1 sont encadrés igure réalisée avec TexShade (Beitz 2000a) à partir d'un alignement Clustalw 2 (Larkin et al. 2007).	X non conserved ≥ 50% conserved ≥ 80% conserved	NWIMRTVRIVGIIIPGVSDHFPLDYVNSTRLGGLARPLATTIPODKLSLIA. 479 NWLMRFVRVVGIVFPGGSNHFPFDYVNSTRLGGLVRPPPTTIPEDKLALIA. 479 TWESRMFRILGLFLPGVAAHSPVNVSVRLGRELAIPLMSLKMMAQGY 526 nwlmRRivGPGvsnHfP.dYVNStrLggl.rppptttdkl.lia.	FVYNNDIVPRVPFDDKILFSYKHYGSCNYFNSLYKGKVREDAPNANYISMLWLIPKILSGVWEFIRSFIIRFWKGKEYKE FVYNNDVVPRVPFDDKYLFSYKHYGPCNSFNSLYKGKVREDAPNANYFNLLWLIPQLLTGLWEFIRSFILQFWKGDEYKE VVYCNDMVPRVPFDD.VFFTFEHFGTCIYYDSRFFGYFTKEEPSRNPFGIENAISAHITAWWELWRSFILNHVYGAEYKE fVYnNDiVPRvPfDDk.lFs.kH.G.CnyslykgkvrePnaNyfsllwlTp.lwE.iRSFifwkG.eyKE	ROKLRDMLAIDKNSKFILTGH <mark>S</mark> LGGAIAALFPAILAVHGEDELLDKLEGVYTFGOPRIGDEOFGEYMKEVVRKHGIKYER 34 ROMLRDKLGRNKNLKYILTGHSLGGALAALFPAILAIHGEDELLDKLEGIYTFGOPRVGDEDFGEFMKGVVKKHGIEYER 34 ASTLKGLLKDHKNAKFVVTGHSLGGALAILFTCILEIQQETEVLDRLLNVYTFGOPRIGNYNLGYFMONRLNFPERRYFR 39 rq.L.d.Lnkn.KfilTGHSLGGALA.LFpaILaihgE.ElLd.Leg.YTFGOPR.GdedfGe.Mknv.kkhgieY.R	PFDADDWCTDLDVSWYEMKNVGKIHAGFSRALGLQKN	<pre>21GTIEYKSMLSMMASKIAYENKSFITSVVKNTWKMDFVGYYDFYNAYQERNLTQAFVEKASSTNPNLIVVSFRGTE 21GSIEYKSMLSIMASKISYESKPYITSVVKNTWKMDLVGNYDFYNAFOESKLTQAFVFKTSSTNPDLIVVSFRGTE 21 KIKGALGNRSLMDLCIMASKLAYENKSFItsVVAEHWKMHFVADYGGMNYFQDARNTHAFTECDKFKDANLIVTSFRGTG 23g.ieyksmLs.MAsKiaYEnksfitsVVkntWKMdfvg.ydfyNa.QetqAfvFkdsstnp.lIVvsFRGTe</pre>	GRIITYWPNLLTANGGFFNLILNLLTGKLVKPDESSATYASFLGCTDRRVELDQKIEV	MSKTNMKFCNSYFLVDPTKASVYDLILLLFSPNLISARFIDSPPDTLNSARRSFASRMMIALAIFLQKVLIFIRTPLAFI 8 MSKTNMKFCNSYFLVDPTKASFLDLLLLFSSNLTSARFIDSPPDTLKGFRRSFASRMILALAIFLQKVLMLLSKPFAFI 8 MDDAGKITSTSHLIVSPDEGTFLDLFKHIVLSDLGSGAKFFRASDQRVPATAAYYSRMPVSVFICKILQLFQMPAAML 7 ms.tn.kfcns.flvdP.kas.ldLfllfss.ltsarfidsppdtl.parrsfasRWiialflqKvL.l.skPlAfi
			7000	$\overline{\infty} \ \overline{\infty} \ \overline{\infty}$	$\infty \infty \infty$	ωωω	$\infty \infty \infty$	000

Résultats et Discussion

Somma	IRE		
3.1	Étude	S PRÉLIMINAIRES	69
	3.1.1	Étude génomique	69
	3.1.2	Étude de l'expression d'AtTAGL	73
	3.1.3	Étude de la protéine	75
	3.1.4	Profil de la mobilisation des réserves lipidiques	83
3.2	Expres	SSION HÉTÉROLOGUE	85
	3.2.1	Clonages pour l'expression hétérologue de l'enzyme At- TAGL	86
	3.2.2	Expression hétérologue chez Nicotiana benthamiana	89
	3.2.3	Test de la présence de la protéine par western blot	90
3.3	Profil	d'expression des gènes de la famille d'AtTAGL .	91
	3.3.1	AtTAGL est le seul gène de la famille multigénique à être	
		exprimé pendant la croissance post-germinative	92
	3.3.2	Étude <i>in vivo</i> du promoteur d'AtTAGL	94
3.4	Local	ISATION SUB-CELLULAIRE	102
	3.4.1	Constructions	102
	3.4.2	L'agroinfiltration avec les constructions contenant At- TAGL entraîne de la mort cellulaire chez <i>Nicotiana tabacum</i>	102
	3.4.3	AtTAGL est co-localisée avec un marqueur du peroxy- some chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	104
	3.4.4	Localisation in vivo chez des plantules d'Arabidopsis thaliana	106
3.5	Fonct	ION PHYSIOLOGIQUE ET RÔLE <i>in vivo</i>	108
55	3.5.1	Mutant attagl d'Arabidopsis	108
	3.5.2	Contrôle quant-à la lignée SALK_145591	109
	3.5.3	Nécessité d'autres lignées mutantes <i>attagl</i>	110
	3.5.4	L'activité lipase est affectée dans le mutant d'insertion	112
	3.5.5	L'activité lipase soluble d'Arabidopsis est sensible à la	
		THL, tout comme celle du colza	114
	3.5.6	Les mutants <i>attagl</i> présentent un léger retard de germi- nation mais ne présentent pas de différence avec le type	
		sauvage pour la croissance post-germinative	115
	3.5.7	Le protil d'hydrolyse de l'huile est similaire chez les plantes sauvages et mutantes <i>attagl</i>	116
	3.5.8	Compensation possible à l'absence d'AtTAGL par une modification du profil d'expression d'autres lipases	117

E chapitre présente les résultats obtenus lors des expériences réalisées.
Ils sont discutés de manière succincte.

Le travail réalisé avant le début de ma thèse a permis d'identifier un gène candidat, AtTAGL codant pour une lipase putative possiblement impliquée dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative d'*Arabidopsis thaliana*. L'objectif clairement énoncé lors de mon arrivée en thèse, était de caractériser ce gène, afin de vérifier son implication dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative. Diverses expériences ont été réalisées dans ce but.

Fabien Moretto dans le cadre de son stage de Master 2 intitulé "Étude d'une lipase putative chez *Arabidosis thaliana*" a participé au travail présenté dans ce chapitre. Il a contribué à une partie des expériences de RT PCRq ainsi qu'à la construction du aMiRNA.

3.1 Études préliminaires

La base de donnée TAIR (The Arabidopsis Information Resource), qui rassemble des données génétiques et de biologie moléculaire est un formidable d'outil lorsque l'on travaille sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, les données disponibles comprennent la séquence complète du génome, la structure des gènes, des informations concernant le produit de gènes, l'expression des gènes, des cartes du génome, les marqueurs génétiques et physiques, le métabolisme, des publications et des informations intéressantes pour la communauté de recherche ayant fait d'Arabidopsis son modèle. TAIR fournit également des hyperliens vers d'autres ressources concernant Arabidopsis (mais pas uniquement cette espèce). Par exemple, l'ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) et le NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) sont des structures de collecte, préservation, reproduction et de distribution des ressources telles que de l'ADN et des graines d'Arabidopsis.

Le TAIR est donc une ressource qu'il est important de consulter quand on s'attaque à un projet de recherche. Ce paragraphe présente donc les données provenant du TAIR en relation avec le gène qui m'intéresse, complétées par quelques résultats expérimentaux que j'ai obtenus. Ensuite, je présenterai des résultats permettant de mesurer les intervalles de confiance que l'on peut accorder à des études de croissance postgerminative.

3.1.1 Étude génomique

Identification d'ADNc de colza et d'Arabidopsis codant la protéine marquée par la THL

L'analyse protéomique permet d'identifier 7 ESTs de colza (*Brassica napus*) qui peuvent être assemblées en un ADNc que j'appellerai Bn-TAGL. Cet ADNc code pour une protéine de 55 kDa et 18 peptides de cette protéine ont été détectés par l'analyse protéomique. L'analyse protéomique a également permis d'identifier directement le locus At1g45201 d'*Arabidopsis thaliana*.

Le locus correspondant au gène AtTAGL est identifié par le code unique : At1g45201. Ce locus est situé sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis thaliana* et correspond à 4830 paires de bases (pb). Il est défini comme étant dans le sens direct, et est localisé par les coordonnées suivantes 17123821 à 17128651. Les loci les plus proche d'At1g45201 sont At1g45191 4646 pb en amont et At1g45207 1699 pb en aval.

La séquence complète génomique au locus At1g45201 est présentée en Annexe, dans la Figure A.3 page iii.

L'analyse de prédiction de transcrits qui figure dans TAIR propose 2 formes d'épissage différentes, produisant les transcrits At1g45201.1 qui code pour une protéine de 55 kDa et le transcrit At1g45201.2 qui code pour une protéine de 44 kDa. Ce dernier contient, par rapport au premier, l'intron numéro 5 mais est dépourvu de l'exon numéro 6; il code donc pour une protéine tronquée d'une centaine d'acides aminés en Cter par rapport à la protéine codée par At1g45201.1 (voir la Figure 3.1). Nous avons donc utilisé des oligonucléotides spécifiques de chacune des formes pour estimer l'expression relative de ces deux formes pendant la croissance post-germinative (voir la Figure en annexe A.5 page v). Les résultats indiquent que le transcrit « tronqué » At1g45201.2 ne représente que 5 +/-2 % du transcrit At1g45201.1.

Les protéines déduites des ADNc AtTAGL et BnTAGL présentent une identité et une similarité de séquence de 81,2 % et 89,9 %, respectivement. Nous verront plus loin que cette ressemblance est beaucoup plus élevée que celles notées avec d'autres membres de la famille d'AtTAGL. On peut donc considérer qu'AtTAGL et BnTAGL sont des orthologues.



Figure 3.1 – Modèles informatiques de l'épissage d'At1g45201 et ESTs chez les genres Arabidopsis et Brassica

Deux modèles d'épissage sont proposés. La forme longue présente un nombre conséquent d'ESTs. La forme courte ne présente qu'une seule EST. Il existe des ESTs correspondant à ce locus chez des plantes du genre Brassica. Certaines de ces ESTs, si on les traduit *in silico*, correspondent à la protéine BnTAGL. Elles nous permettent de définir qu'AtTAGL et BnTAGL sont des orthologues l'un de l'autre. Ces données sont issues du serveur "TAIR GBrowse".

AtTAGL est un membre d'une famille multigénique

Une requête BLAST (Altschul et al. 1990) avec la protéine AtTAGL contre l'ensemble des protéines du TAIR permet de mettre en évidence un ensemble de 4 protéines proches d'AtTAGL qui forment une famille multigénique. Les résultats de cette requête sont présentés dans le Tableau 3.1.

Locus	Nom	Type de protéine	Score	P value
AT1G45201.1	AtTAGL, ATTLL1, TLL1	triacylglycerol lipase	2368	8.3e-247
AT5G42930		alpha/beta-Hydrolases superfamily	1263	1.0e-129
AT1G56630		alpha/beta-Hydrolases superfamily	1147	2.0e-117
AT5G67050		alpha/beta-Hydrolases superfamily	930	2.0e-94
AT3G14360		alpha/beta-Hydrolases superfamily	410	1.7e-85

Tableau 3.1 – Requête WUBlastP réalisée avec AtTAGL contre l'ensemble des protéines du TAIR démontrant la présence d'une famille multigénique chez Arabidopsis

4 candidats présentent une homologie forte avec AtTAGL. Le prochain candidat, AT5G18640 présente un score de 119 et une P value de 2.9 e⁻⁰⁵ qui démontre une homologie beaucoup plus faible vis à vis d'AtTAGL. Ces 5 gènes forment une famille multigénique chez Arabidopsis.

Le Tableau 3.2 présente les homologies et similarités entre les différents membres de cette famille multigénique.





Les identités et similarités sont fortes au sein de la famille multigénique. Tableau réalisé avec TexShade (Beitz 2000a) à partir d'un alignement Clustalw 2 (Larkin et al. 2007).

Un alignement partiel des résidus les plus importants pour l'activité lipase a été réalisé et est présenté dans la Figure 3.2 page suivante.

Les résidus formant la triade catalytique ont été identifiés par homologie de séquence avec RcOBL1 (Eastmond 2004a et Figure 2.4 page 66), et avec des lipases caractérisées de *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, et *Thermomyces lanuginosus*. Le haut degré de conservation de ces résidus chez les différentes espèces tend à valider que ce sont bien ces résidus qui forment la triade. Cet alignement démontre que les protéines codées



Figure 3.2 – Environnement des 3 résidus de la triade catalytique

Cette figure présente les acides aminés jouxtant les 3 résidus (encadrés en rouge) de la triade catalytique putative et leur conservation dans les 5 membres de la famille d'AtTAGL chez Arabidopsis. La sérine catalytique montre, le domaine le mieux conservé. Il correspond au pentapeptide GXSXG inclus dans le domaine Prosite PS00120 plus étendu. L'acide aspartique (D) est entouré d'un résidu tryptophane et d'un résidu hydrophobe, tandis que l'histidine n'est entouré d'aucune séquence conservée. Figure réalisée avec TexShade (Beitz 2000a) à partir d'un alignement Clustalw 2 (Larkin et al. 2007).

par cette famille multigénique, présentent les acides aminés possiblement impliqués dans la triade catalytique.

Il existe donc chez *Arabidopsis thaliana*, une famille multigénique composée de 5 paralogues, qui présentent une homologie relativement forte avec RcOBL1, la lipase acide caractérisée du ricin.

Cette famille existe dans tout le monde végétal

On trouve, en plus des 5 gènes présents chez *Arabidopsis thaliana*, 5 paralogues chez dans *Brachypodium distachyon* (une graminée), 4 chez *Oryza sativa* (le riz), 6 chez le peuplier *Populus trichocarpa*, 5 chez la vigne *Vitis vinifera*, 1 chez *Carica papaya* (dont seulement 80 % du génome est disponible).

Il semble donc que cette petite famille multigénique existe chez toutes les plantes terrestres à partir des bryophytes (Embryophytes, voir Figure 3.3 page suivante). Chez les algues vertes ou les champignons, les similarités sont plus faibles et restreintes sur une portion ne dépassant pas le tiers de la séquence, correspondant au domaine à repliement α/β . Les outils de comparaison des génomes ne mettent pas en évidence cette famille au delà des mousses.

Les paralogues, et orthologues d'AtTAGL peuvent se classer en 2 grandes familles, et pour chacune d'elle, en 2 sous-familles. Au sein d'une famille, on retrouve aussi bien des paralogues que des orthologues. Il est intéressant de noter que des enzymes caractérisées, au moins partiellement au niveau biochimique, comme RcOBL1, CpLip1, EgTAGL, et Bn-TAGL sont présentes dans différentes familles, et sous-familles. Certaines de ces enzymes ont étés démontrées TAG lipases et d'autres sont supposées avoir une activité TAG lipase.

La présence de paralogues au sein de familles différentes laisse penser que ces enzymes sont spécialisées. Leurs modes de fonctionnement biochimique, mais aussi leurs fonctions biologiques pourraient être différentes.



Figure 3.3 – Phylogénie moléculaire de la famille élargie d'AtTAGL

L'histoire évolutive a été calculée en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance, basée sur le modèle "JTT matrix" (Jones et al. 1992) en utilisant le logiciel MEGA 5 (Tamura et al. 2011). L'arbre présentant le maximum de vraisemblance est présenté. Chaque cadre de couleur différente rassemble une sous famille. Les carrés noirs insérés mettent en évidence les lipases précédemment identifiées / ou sujet de cette étude (AtTAGL et BnTAGL). Bd : *Brachypodium distachyon*, Os : *Oryza sativa*, Pt : *Populus trichocarpa*, Vv : *Vitis vinifera*, Cp : *Carica papaya*, At : *Arabidopsis thaliana*, Bn : *Brassica napus*, Rc : *Ricinus comunis*, Eg : *Elaeis guineensis*

On peut prendre l'exemple d'At3g14360 qui est proche de la lipase acide de ricin RcOBL1, alors qu'AtTAGL est plutôt proche de la lipase de colza BnTAGL. Cela peut suggérer que la protéine At3g14360 serait plutôt active à pH acide, et on peut envisager sa localisation *in vivo* au niveau des corps lipidiques. A l'opposé, on peut envisager qu'AtTAGL serait plutôt active à pH alkalin, avec un comportement de type soluble, par analogie avec BnTAGL.

Ces considérations peuvent amener à une question simple : est ce que tous les membres de la famille multigénique d'AtTAGL sont impliqués dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative?

3.1.2 Étude de l'expression d'AtTAGL

On peut trouver dans les bases de données d'ESTs de *Brassica napus* 7 ESTs sur environ 550 000 codant pour BnTAGL. La majorité d'entre elles (4) proviennent de jeunes plantules et 2, de racines soumises à un stress hydrique. Chez Arabidopsis, il y a 92 ESTs sur plus d'un million et demi codant pour AtTAGL, plus des trois quarts (73) d'entre elles provenant de jeunes plantules. La base de données MPSS pour "Massively Parallel Signature Sequencing" (Lu et al. 2005) fait également état d'une expression majoritaire d'AtTAGL au cours de la croissance post-germinative. Près de 80 % des 194 signatures correspondantes au mRNA d'AtTAGL sont retrouvées au cours de la croissance post germinative. La majorité du reste des signatures est retrouvé dans les feuilles à 21 jours. Ces données suggèrent qu'AtTAGL est exprimée modérément et plutôt au cours de la croissance post-germinative chez Arabidopsis. Malheureusement, At-TAGL n'est pas présent sur les puces à ARN les plus utilisées à l'heure actuelle. Il n'y a donc pas de données d'expression pour ce gène dans les bases associées aux puces à ARN.

Il existe une base de donnée du protéome d'Arabidopsis. Elle est complémentaire de la base de donnée MPSS : ce ne sont non pas les ARNs mais les protéines qui sont détectées dans différents organes au cours du temps qui y sont présentés. Bien que ces données ne soient pas quantitatives, elles sont néanmoins intéressantes au niveau qualitatif. Dans la base "AtProteome", des peptides correspondant à AtTAGL ont été identifiés dans les cotylédons, les racines, et les feuilles jeunes (Baerenfaller et al. 2008).

Analyse du promoteur in silico

Deux bases de données ont été utilisées pour l'étude du promoteur. Il s'agit de "Plant Promoter DB" (Yamamoto et Obokata 2008) et de "Atha-MAP" (Bulow et al. 2010). Ces 2 bases de données ne présentent pas exactement les mêmes résultats. Je présente ici les données pour des séquences connues et conservées à 100 %.

Tout d'abord, on trouve les éléments classiques tels que la boîte TATA localisée à la position -107 à -97 pb du site d'initiation de la transcription et le patch Y à la position -55 à -41. Ensuite, à la position -188 à -145 se trouve une boite permettant la liaison de facteurs appelés bZIP-Dof et à la position -213 à -206 pb un élément susceptible de permettre l'activation d'un gène lors du passage de la lumière à l'obscurité (Simpson et al. 2003). Les deux éléments suivants sont, en position -344 à -335, une boite permettant la fixation du facteur de transcription GT-1, entraînant une activation du promoteur à la lumière (Lam et Chua 1990) et, en position -596 à -605 un domaine de fixation pour le facteur de transcription MYB2.

Ces données restent hypothétiques : les séquences reconnues par les facteurs de transcription sont variables, et on ne peut pas exclure la présence de séquences fortuites dans cette région promotrice.

Il est difficile de comprendre la présence de deux éléments répondant de façon opposée à la lumière, d'autant plus que la lipolyse et l'activité lipase au cours de la croissance post-germinative n'apparaît pas sensible à la lumière. Le facteur MYB2 est lié à la signalisation par l'acide abscissique. Nous avons vu plus haut que l'acide abscissique ne semble pas jouer un rôle majeur dans la mobilisation des lipides de réserve (voir la soussection 1.4.2 page 25). On peut noter qu'il est impliqué dans la résistance au stress hydrique et que 2 ESTs de colza codant BnTAGL proviennent de banques issues de racines de colza soumis à stress hydrique.

La famille des facteurs de transcription Dof comprend plusieurs di-

zaines de membres, dont certains sont impliqués dans le métabolisme des carbohydrates. L'étape de lipolyse jouant un rôle clé dans la transformation de l'huile en sucre, la possibilité de l'intervention d'un facteur Dof dans la régulation de l'expression du gène AtTAGL est à garder en mémoire pour de possibles futures études.

En effet, si AtTAGL code pour une TAG lipase impliquée dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative, la finalité du catabolisme des TAGs est la génération de sucres (et d'énergie). Dans ce cas, AtTAGL est la première enzyme d'un ensemble de voies métaboliques qui permettent la synthèse de carbohydrates. Un élément régulateur en réponse aux carbohydrates qui contrôlerait l'expression d'AtTAGL pourrait être un élément contrôlant l'ensemble de la voie du catabolisme des TAGs.

Régulation des niveaux de transcrits d'AtTAGL par AtGRP7

Une dernière information fournie par TAIR, qu'il aurait été difficile de trouver autrement, est une publication qui démontre que les niveaux de transcrits d'AtTAGL sont régulés indirectement par AtGRP7, une protéine impliquée dans le rythme circadien (Schoning et al. 2007). AtGRP7 est une protéine qui a été démontrée capable d'interagir avec de l'ARN : elle interagit avec son propre transcrit. Un niveau élevé de la protéine AtGRP7 entraîne une diminution de la quantité de ses propres transcrits. Un criblage de l'expression de gènes chez des plantes surexprimant AtGRP7, en comparaison avec des plantes sauvages, a été réalisé. Il a mis en évidence que chez les lignées surexpresseur d'AtGRP7, AtTAGL présente une expression réduite. Néanmoins, bien qu'AtTAGL présente une expression au cours de la journée qui n'est pas constante, AtTAGL ne présente pas d'oscillations typiques du rythme circadien. Il semble qu'AtGRP7 a un impact indirect sur la quantité de transcrits d'AtTAGL, probablement via une cible intermédiaire, non identifiée à l'heure actuelle. Aucune donnée ne suggère une signification physiologique de cette influence d'AtGRP7 sur AtTAGL.

Pour conclure, la seule information significative apportée par cette étude *in silico* est que les ESTs codant pour AtTAGL proviennent en majorité de plantules en croissance post-germinative.

3.1.3 Étude de la protéine

Les éléments intéressants pour l'étude bioinformatique de la protéine AtTAGL sont en priorité les éléments qui renseignent sur son repliement, et dans un second temps, les éléments qui déterminent son adressage subcellulaire.

Etude bioinformatique de l'enzyme AtTAGL

Différents paramètres biochimiques peuvent être évalués *in silico*. Ainsi, le transcrit AtTAGL code pour une protéine de 479 acide aminés. Sa séquence complète est présentée en annexe, dans la Figure A.6 page vi.

Les données présentées ci dessous sont été obtenues sur le site internet Expasy (Gasteiger et al. 2005). Son poids moléculaire estimé est de 54 776,2 g.mol⁻¹, soit environ 55 kDa. Son point isoélectrique théorique est de 9,04. Son coefficient d'extinction molaire varie de 89270 à 89520 en fonction de si l'on considère l'ensemble des cystéines comme étant réduites ou intervenant dans des ponts disulfures. La protéine est considérée comme stable et son temps de demi-vie estimé est élevé. Selon le logiciel TermiNator, le temps de demi-vie de la protéine est de 127 heures et l'efficacité de la machinerie de traduction est estimée à faible pour cette protéine, entraînant une faible quantité de protéine produite (Meinnel et al. 2005).

Analyse de la séquence d'AtTAGL

On a vu dans la Section 3.1.1 page 71 et la Figure 3.2 page 72 qu'At-TAGL (comme certains des membres de sa famille multigénique) présente des éléments typiques d'une TAG lipase. L'élément le plus fort en ce sens est notamment la séquence pentapeptidique GXSXG présente au sein du domaine prosite PS00120, caractéristique des lipases dites classiques. Il est possible de prédire les résidus intervenant dans la triade catalytique par alignement de séquence avec des lipases connues (voir Figure 2.4 page 66) : ce sont les résidus Ser 290, Asp 354 et His 448.

Par alignement de séquence avec la lipase de *Thermomyces lanuginosus*, on peut estimer qu'il existe un volet amphiphile et il serait constitué chez AtTAGL par les résidus 217 à 228 (Brzozowski et al. 2000).

Structure de la protéine

Un logiciel de prédiction de la structure secondaire a été utilisé. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.4 page suivante.



Séquence d'AtTAGL. Les acides aminés possiblement impliqués dans la triade catalytique sont encadrés en rouge. Cette séquence a été soumise à programs/yaspinwww/ (Lin et al. 2005). Les éléments prédits par ce logiciels sont annoté β pour les brins beta et α pour les hélices de type alpha. J'ai ajouté un coude T qui pourrait être présent. Le volet amphiphile est prédit à parti de l'alignement de la séquence avec la lipase de Thermonyces lanuginosa un logiciel de prédiction de structure secondaire appelé "YASPIN secondary structure prediction" accéssible à l'adresse http://www.ibi.vu.nl/ (Brzozowski et al. 2000). Ce logiciel donne une prédiction que l'on peut considérer correcte dans la zone du site catalytique. En effet, on retrouve avant le domaine prosite PS00120, un brin β qui pourrait correspondrait au 5 ^{ème} brin β du repliement de type α/β (position 281 à 289), suivi d'une hélice α (position 292 à 305) qui correspondrait à l'hélice α C de ce repliement. On trouve aussi l'acide aspartique en C ter d'un brin β (position 345 à 351) qui pourrait être le brin *beta*7, et l'histidine entre le brin β 8 (position 433 à 442) et l'hélice α F (position 450 à 459 Kourist et al. 2010).

Il est intéressant de noter que ce logiciel prédit une hélice α très longue entre les positions 61 et 92. Ce même élément est prédit comme étant un segment transmembranaire par la quasi totalité des programmes de prédictions rassemblés sur le site Aramemnon. Un second segment transmembranaire consensus est prédit, allant des positions 285 à 307. Ce second segment, bien qu'étant prédit lui aussi par un nombre important de programmes, ne peut pas être un segment transmembranaire. En effet, la sérine catalytique supposée impliquée dans l'activité de l'enzyme At-TAGL est situé dans ce segment, en position 290. Le premier modèle de protéine de la Figure 3.5 page ci-contre illustre ce problème. Cet exemple illustre bien que les analyses *in silico* doivent être vérifiées, et qu'elles ne remplacent pas les analyses *in vivo* ou *in vitro*. Un second modèle plus plausible a été réalisé. Il ne comporte qu'un seul segment transmembra-

AtTAGL contiendrait donc un domaine d'ancrage à la membrane en Nter, puis une structure de liaison à un domaine catalytique en Cter.



Figure 3.5 – Modèles proposé pour le positionnement de l'enzyme At-TAGL par rapport à la membrane

Selon les logiciels de prédiction de domaines transmembranaires, il existerait 2 domaines. Le premier comprenant les acides aminés 61 à 91, et permettant un ancrage à une membrane. Le second serait constitué des acides aminés 285 à 307. Ce second domaine transmembranaire est improbable étant donné qu'il contiendrait la Serine 290 impliquée dans le mécanisme réactionnel enzymatique. Le second modèle est le modèle plus logique. Dans ce modèle, il existe un premier segment d'environ 60 acides aminés qui pourraient permettre l'adressage d'AtTAGL. Il y aurait ensuite un segment transmembranaire, qui permettrait l'ancrage de la protéine à une membrane. Il viendrait ensuite une structure de type globulaire qui porterait tous les acides aminés nécessaires à l'activité cataly-tique.

La base de données Aramemnon prédit qu'il existe un segment transmembranaire qui jouerait un rôle d'ancrage à la membrane.

Représentation réalisée avec Textopo (Beitz 2000b).

Un modèle de structure tridimensionnelle de l'enzyme AtTAGL a été réalisé grâce au logiciel Phyre2 (Kelley et Sternberg 2009). Ce logiciel combine une modélisation de la protéine à partir de la séquence primaire, avec un alignement des séquences de protéines dont la structure a été validée expérimentalement. Le logiciel présente les résultats en décrivant les parties pour lesquelles la modélisation a été réalisée à partir de structures résolues par la technique (structure considérée fiable), ou à partir de la séquence primaire (structure hypothétique).

Il existe un nombre conséquent de lipases, ou de protéines à repliement α/β dont la structure est résolue et notamment celle de *Thermomyces lanuginosus*, dont la séquence est proche d'AtTAGL. AtTAGL a été modélisée avec ce logiciel. Le résultat est présenté dans la Figure 3.6 page ci-contre.

La structure générale prédite est constituée d'une longue première hélice α qui pourraient correspondre à un segment transmembranaire, puis un domaine plus linéaire que l'ont pourrait qualifier de domaine de liaison au domaine final globulaire. L'étude attentive de ce modèle démontre qu'il n'est pas réaliste. En effet, la partie Cter de la protéine, qui contient l'histidine catalytique, est présentée comme une structure linéaire (avec un niveau de confiance faible) alors que cet acide aminé en particulier devrait faire partie de la structure globulaire, l'histidine devant être proche des deux autres résidus de la triade (voir Figure 3.6 page suivante). Par contre, la partie de la protéine comprise entre les résidus 150 et 390 et qui constitue le domaine globulaire contenant le feuillet α/β catalytique avec la sérine et l'acide aspartique nécessaires à l'activité semble correctement modélisée, avec une confiance en la prédiction élevée.

Dans la zone globulaire qui contient les acides aminés catalytiques, le modèle présente des brins β parallèles reliés entre eux par des hélices α qui constituent le repliement typique α/β . La sérine catalytique et l'acide aspartique occupent des positions qui semblent superposables à celles de leurs homologues de la structure résolue de la lipase de *Thermomyces lanuginosus*. On peut également déduire de ce modèle les acides aminés formant un volet amphiphile (217 à 228) par homologie de structure. Ces éléments sont illustrés dans la Figure 3.7 page 82.

Un autre outil qui ressemble beaucoup a Phyre 2 a été utilisé. Il s'agit de "3DLigandSite" (Wass et al. 2010). Son fonctionnement est similaire à celui de Phyre 2. Il détermine les possibles ligands à partir de structures résolues. Dans le cas d'AtTAGL, ce site prédit une glycosylation sur l'asparagine 225. Cette prédiction est issue encore une fois des structures connues de protéines à repliement α/β . Cette donnée est en opposition avec les outils de prédictions d'après la séquence primaire uniquement, qui ne prédisent pas ce site pour une éventuelle glycosylation. Les glycosylations rendent les protéines plus résistantes à la protéolyse.

D'après le site Aramemnon, aucun des logiciels de prédiction de modifications post-traductionnelles ne prédit une modification de type lipidique pour l'enzyme AtTAGL.



Figure 3.6 – Localisation des acides aminés de la triade catalytique dans la structure 3D modélisée par le logiciel Phyre 2

La structure prédite par le logiciel Phyre2 est représentée selon la coloration suivante : En jaune les brins β , en bleu les coudes, et en rose les hélices α . Les 3 acides aminés supposés de la triade catalytique sont représentés en bleu. Bien que la sérine et l'acide aspartique soient situés idéalement proche, et dans une conformation qui permet l'activité lipase, l'histidine est située elle bien plus loin. En réalité, la partie contenant la sérine et l'acide aspartique est situé dans la zone de confiance élevée, modélisée par analogie à des structures résolues alors que l'histidine est localisée dans une partie modélisée à partir de la séquence primaire de la protéine.

Prédiction de l'adressage in vivo

In silico Les 37 premiers acides aminés d'AtTAGL sont prédits comme constituant un peptide signal qui est clivé (ProP).

Aramemnon fourni les résultats de différents sites de prédiction de la localisation cellulaire. En ce qui concerne AtTAGL, le consensus est fort pour prédire que cette protéine est localisée au niveau du système endomembranaire. Une localisation au niveau des chloroplastes ou des mitochondries est clairement exclue (absence de signal d'adressage typique vers ces organites). Il n'existe cependant aucune séquence d'adressage connue et identifiée dans la séquence d'AtTAGL.

Protéomique Divers études de protéomique, réalisées sur des compartiment sub-cellulaires ont été publiées. Ces données sont des données obtenues expérimentalement dont la fiabilité reste limitée car aucune n'utilise de protocole permettant une purification, parfaite du compartiment subcellulaire étudié.

Il existe deux articles qui identifient AtTAGL par protéomique.

Dans le premier, AtTAGL est retrouvée dans un mélange d'endomembranes et de membranes non identifiées (Mitra et al. 2007). AtTAGL est donc très vraisemblablement une protéine membranaire, ce qui est en accord avec le modèle présenté Figure 3.5 page 79. Dans le deuxième, At-TAGL est détectée dans le protéome du tonoplaste, la membrane de la vacuole (Carter et al. 2004). Si l'on considère qu'il existe des fusions corpslipidiques vacuoles (voir la Figure 1.13 page 24 et Huang 1996), la locali-



Figure 3.7 – Localisation des acides aminés de la triade catalytique dans la structure 3D modélisée par le logiciel Phyre 2

La zone globulaire, présentant le repliement α/β , prédit par le logiciel Phyre 2 correspondant à AtTAGL (violet) est superposée à la même zone de la lipase de *Thermomyces lanuginosus* (en blanc). Divers éléments de la protéine AtTAGL sont mis en évidence : En jaune, la sérine catalytique, en rouge l'acide aspartique, et en vert la structure correspondante au volet amphiphile. L'histidine n'est pas présente dans cette structure. On note une superposition quasiment intégrale entre les deux protéines. Il existe cependant quelques différences, comme avec la petite structure à droite de l'image en violet et correspondant à AtTAGL. Ces divergences sont expliquées par des insertions dans la séquence d'AtTAGL qui n'existent pas au niveau du repliement α/β des protéines dont les structures sont résolues.

sation d'AtTAGL au niveau de la vacuole est intéressante et pas dénuée de sens.

L'analyse de toutes ces données et prédictions nous indique que l'ARNm d'AtTAGL code pour une protéine de 55 kDa, contenant un possible peptide signal. Sa structure est composée d'un domaine transmembranaire puis d'un domaine globulaire portant l'activité lipase, avec une triade catalytique similaire à celle des lipases connues. Une partie du domaine globulaire a pu être modélisée avec une confiance élevée. L'existence d'un domaine transmembranaire est compatible avec les données de protéomique qui indiquent une localisation membranaire de la protéine.

La différence de masse moléculaire entre la protéine détectée par marquage avec la THL et la séquence déduite a déjà été notée dans le cas de la lipase de papaye CpLip1 (Dhouib et al. 2011). Il se pourrait que ces enzymes présentent une migration artéfactuelle sur gel SDS PAGE. Il se pourrait aussi qu'au cours de la purification, il y ait libération de protéases endogènes. Le domaine de liaison reliant le segment transmembranaire au domaine globulaire pourrait être sensible à ces protéases. Le clivage entraînerait le relargage d'une enzyme qui pourrait être soluble et dont la taille serait de 40 à 45 kDa selon le site de clivage.

Bien qu'il n'y ai pas de données d'expression disponibles, l'origine des ESTs correspondantes à ce gène suggère une expression préférentielle dans les jeunes plantules, ce qui est compatible avec le matériel biologique utilisé pour enrichir l'activité chez le colza.

AtTAGL pourrait être localisée au niveau du tonoplaste (Carter et al. 2004).

3.1.4 Profil de la mobilisation des réserves lipidiques

La mobilisation des lipides de réserve se produit sur une courte période et la quantité de lipide peut varier de façon importante d'un stade à l'autre. Il est donc très important de s'assurer que les échantillons biologiques sur lesquels on travaille soient homogènes et puissent être comparés entre eux. Ce travail commence par les conditions d'obtention des graines. En effet, il a été démontré que des variations dans les conditions de culture peuvent entraîner des répercussions importantes dans le contenu de la graine sèche d'Arabidopsis (Li et al. 2006). Il est donc important de travailler avec des graines correctement remplies.

Par ailleurs, si on souhaite comparer deux types de plantes, il est indispensable que les graines utilisées proviennent de plantes ayant poussé côte-à-côte dans les mêmes conditions. Le critère de contenu d'huile n'est pas suffisant. Par exemple, des graines ayant été récoltées à 6 mois ou un an d'intervalle, contenant la même quantité d'huile, peuvent montrer des conditions différentes de levée de dormance. Les graines vieilles présentent également une croissance post-germinative plus lente que les graines jeunes et ceci à contenu égal en huile.

Nous avons réalisé une première étude de l'évolution des lipides au cours de la croissance post-germinative à partir d'échantillons de grande taille (2500 plantules par point). La Figure 3.8 illustre les résultats obtenus.



Figure 3.8 – Évolution des lipides au cours de la croissance postgerminative pour une plante de type sauvage

Les mesures ont été réalisées au cours des 7 premiers jours après l'imbibition de la graine. Les lipides totaux sont extraits. Les acides gras (AGs) sont transméthylés, puis quantifiés par chromatographie en phase gazeuse. Les valeurs obtenues sont rapportées au poids sec des plantules lyophilisées. L'évolution des AGs, des lipides totaux, et de l'AG eïcosanoïque C20:1 est donnée en % du poids sec. Le C20:1 représente l'évolution de la quantité d'huile, puisqu'il lui est spécifique.

L'ensemble des espèces lipidiques représente près de 40 % du poids de

la graine sèche, soit environ 8 μ g par graine. Les AGs totaux représentent 34 % du poids de la graine sèche. Cette quantité demeure stable pendant 2 jours après l'imbibition. Á 4 jours après germination près de 50 % des AGs totaux ont été métabolisés, au 7^{ème} jour, il demeure un peu plus de 7 % des AGs totaux dans la graine.

L'évolution de l'acide eïcosénoïque C20:1 a été suivie. En effet cet AG à chaîne longue se retrouve exclusivement estérifié sur les TAGs et est considéré comme étant un marqueur de l'huile de réserve. L'évolution du C20:1 est parallèle à celle des AGs totaux : partant de 7 % du poids sec, elle décroît rapidement entre le second et le quatrième jour, où plus de la moitié du C20:1 a été hydrolysé. Au septième jour il ne reste plus qu'1 % du poids sec en C20:1.

La quantité d'AGs totaux dans la graine sèche est en accord avec les données de la littérature et démontre que les conditions de cultures utilisées permettent un remplissage optimal de la graine (Lemieux et al. 1990).

Les barres d'erreur sont inférieures à 5 %. Cela est dû essentiellement à la grande taille de l'échantillon. Malheureusement, nous avons dû travailler par la suite avec des échantillons de 20 plantules et les barres d'erreurs obtenues ont alors toujours été supérieures à 5 %, généralement de 8 à 10 %.

Par exemple, au sein d'un même lot de graines sèches, la moyenne des écarts types est de +/- 3,6 % quand on mesure la quantité d'huile sur 20 graines. Cette valeur peut aller jusqu'à près de 10 %, pour des graines conservées pendant un temps long.

Nous avons également observé, en utilisant deux systèmes de culture (miniphytotron et chambre de culture plus vaste) pourtant présentant des conditions quasiment similaires (même température moyenne, éclairage de 100 ou 150 μ mol de photons.m²-¹.sec⁻¹, humidité différente 60 ou 35%) un décalage de 1 jour dans les pics d'activité lipase et d'hydrolyse de l'huile. Nous avons donc toujours fait très attention à faire pousser exactement dans les mêmes conditions les différentes plantes que nous souhaitions comparer. De même, les graines utilisées pour nos expériences de croissance post-germinative sont issues de plantes cultivées dans les mêmes conditions, la récolte et le stockage étant réalisés dans des conditions exactement identiques.

Si on calcule la dérivée de la courbe représentant l'évolution des AGs au cours du temps (présenté par la Figure 3.8 page précédente), on observe un pic de dégradation des lipides, au cours des jours 3, 4 et 5 après l'imbibition (voir Figure 3.9 page suivante). La vitesse d'hydrolyse maximale est alors de 2 μ g d'AG par jour par graine, toutes activités lipases confondues.

Conclusion des études préliminaires

Il est prédit *in silico* 2 formes d'épissage alternatifs pour AtTAGL. La forme prédite courte n'est vraisemblablement pas une réalité *in vivo* et l'ARNm code donc pour une protéine de 55 kDa, qui pourrait contenir un peptide signal de 39 acides aminés.



Figure 3.9 – Évolution de la vitesse de dégradation des acides gras au cours du temps

La représentation de la dérivée de la quantité d'AGs mesurée au cours du temps permet d'illustrer la vitesse de dégradation réelle *in vivo* des AGs. Elle nous donne une information quant au profil de l'activité de la β -oxydation. On peut supposer que l'activité lipase suit celle de la β -oxydation. On peut donc penser que cette courbe représente l'activité lipase réelle et totale (soluble et localisée au niveau des corps lipidiques) à partir des données mesurées *in vivo* sur l'évolution des AGs au cours du temps.

Les études prédictives suggèrent qu'AtTAGL est ancré à une membrane par un segment transmembranaire. Un domaine globulaire responsable de l'activité lipase impliquant une triade catalytique serait lié à cet ancrage par un domaine de liaison. Une étude protéomique localise AtTAGL au niveau du tonoplaste, la membrane vacuolaire. Différentes données démontrent qu'AtTAGL est exprimé et traduit pendant la croissance post-germinative d'Arabidopsis. AtTAGL est un membre d'une famille multigénique que l'on retrouve des mousses aux plantes supérieures. Cette famille est divisée en 2 groupes qui présentent des propriétés biochimiques et de localisation différentes. Cela suggère que les différentes membres de cette famille ont des fonctions physiologiques différentes.

Dans nos conditions de culture, l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance-post germinative s'effectue des jours 3 à 5 après l'imbibition. L'hydrolyse maximale des réserves lipidiques est centrée sur le jour 4 avec une vitesse de 2 μ g par jour.

Nous avons vérifié la variabilité de notre matériel biologique et pris le maximum de précautions pour mener nos études comparatives : les analyses ont été effectuées sur des lots de graines et des plantes qui ont étés mises à pousser rigoureusement dans les mêmes conditions afin de limiter au maximum la variabilité.

3.2 Expression hétérologue

Le but de l'expression en système hétérologue est de produire en masse la protéine AtTAGL pour la purifier et réaliser sa caractérisation biochimique.

3.2.1 Clonages pour l'expression hétérologue de l'enzyme AtTAGL

Le clonage du gène AtTAGL a permis la création de différentes constructions. Certaines constructions ont été exploitées en vue d'expression en système hétérologue chez des microorganismes, d'autres pour réaliser des études de localisation *in vivo* et enfin, certaines sont utiles pour de la sur-expression en système homologue, et la complémentation du mutant *attagl*.

Expression chez des microorganismes

En plus de la forme complète correspondant à la séquence native d'At-TAGL, il a été cloné deux segments plus courts, appelés rAtTAGLshort et rAtTAGLshorter.

rAtTAGLshort est raccourcie des 70 premiers acides aminés. On élimine ainsi le segment qui correspondrait à l'adressage de la protéine. rAtTAGLshorter est amputée des 104 premiers acides aminés d'AtTAGL, et dans ce cas, la protéine recombinante ne porterait plus, ni le segment d'adressage, ni le segment transmembranaire, responsable de l'ancrage de cette protéine.

Ces formes raccourcies d'AtTAGL ont été clonées dans le but de faciliter l'expression d'une protéine recombinante chez les microorganismes. En éliminant ces sections hydrophobes, qui généralement sont des obstacles à l'expression, et qui permettraient de produire une protéine soluble, on espère une expression suffisante et un repliement correct. La figure 3.10 page 88 représente schématiquement ces diverses constructions.

Ces 3 constructions ont été placées dans des vecteurs d'expression spécifique, qui permettent l'ajout d'une ou plusieurs étiquettes, grâce au système Gateway. Les vecteurs de destination sont des vecteurs d'expression inductible à l'IPTG avec une ou des étiquettes dont une His_6 .

Diverses souches d'expression ont été utilisées, de la plus courante BL21DE3 à des souches pour constructions difficiles (pLysS et pLysE) en passant par la souche C41, plus efficace pour la production de protéines membranaires. Différentes conditions d'induction ont été testées (durée, concentration en IPTG, température). Des aliquots de cellules sont prélevés à différents temps, repris dans un tampon de lyse, puis lysée avec une sonde à ultrason sur glace.

Les comparaisons des profils de protéines n'ont jamais permis de mettre en évidence une expression de protéine recombinante de façon claire. Si une légère différence est présente, il a été réalisé des western blots anti-étiquette *His*₆, avec l'utilisation d'anticorps commerciaux (si le vecteur correspond). En parallèle, il a été réalisé des tests d'activité lipase radioactifs sur ces échantillons d'intérêt.

Malgré l'utilisation de différentes souches, différentes constructions dans différents vecteurs d'expression et différentes conditions d'induction, il n'a jamais été mis en évidence une expression de protéine recombinante chez E Coli correspondante à AtTAGL. Ni les westerns blots, ni les tests d'activité lipase radioactifs ont été concluants. Il a été supposé que la protéine soit incluse dans des corps d'inclusion. Cependant, des tentatives de solubilisation d'éventuels corps d'inclusion n'ont pas abouti. La protéine semble simplement ne pas être exprimée.

Un système d'expression chez un hôte eucaryote a été utilisé. Il s'agit de la levure. La cassette permettant le clonage via l'utilisation du système Gateway a été inséré dans le vecteur d'Invitrogen pYES2. Les différentes constructions AtTAGL, AtTAGLshort et AtTAGLshorter ont ainsi été exprimées sous le contrôle du promoteur inductible GAL, dans la souche BY4741 de levure. Aucune activité lipase n'a été détectée chez les souches recombinantes.

Une explication possible et simple pour le manque de réussite dans l'expression en ces systèmes hétérologues pourrait être que la protéine recombinante produite serait toxique. Si on envisage que la spécificité de substrat est plus large qu'uniquement les TAGs, et que la protéine puisse hydrolyser les phospholipides, même avec une activité réduite, on peut imaginer un effet toxique pour la cellule hôte. Pour limiter ce phénomène, les cellules auraient tendance à éliminer le plasmide codant pour la protéine recombinante. On aurait une expression hétérologue proche de zéro, en tout cas, sous le seuil de détection dont on dispose, et qui ne permet pas une exploitation intéressante de ce type d'expression en système hétérologue.

Devant l'incapacité à produire une protéine recombinante, et donc l'incapacité de l'obtenir purifiée, il a été décidé, de commander des anti-corps polyclonaux anti-peptides désignés spécifiquement contre des peptides d'AtTAGL. Les peptides utilisés sont les suivants :

Peptide 1 : Porteur - CNSFNSLYKGKVRED

- Peptide 2 : RQMLRDKLGRNKNLKC - Porteur

Deux types d'IgG purifiées ont donc été reçues. Seul l'anticorps contre le peptide 1 présente un titre correct contre ce peptide qui a servi à l'immunisation (1 pour 300 000). Ce n'est donc que cet anticorps qui a été utilisé pour les western blots anti-AtTAGL réalisés.

Expression chez des plantes

Dans un premier temps, il a été réalisé des constructions permettant la surexpression de la protéine native chez les plantes, sous le contrôle du promoteur CaMV 35S. Ces constructions ont été utilisées pour générer des lignées transgéniques d'Arabidopsis.

Le niveau de surexpression de certaines lignées de ces plantes a été analysé par RT PCRq, au niveau des feuilles de la rosette. Le niveau général de surexpression dans ces plantes est relativement faible. Il y a cependant quelques lignées pour lesquelles la quantité de transcrits est 10 fois supérieure à celle de plantes de type sauvage. La Figure 3.11 page 89 présente les résultats des analyses en RT PCRq.

Le même type de construction a été utilisé pour générer des lignées de complémentation des plantes mutantes *attagl*.



Figure 3.10 – Représentation des constructions réalisées

Sur la première ligne, est représenté le modèle d'AtTAGL chez les plantes WT et qui a été cloné dans son intégralité pour les expériences d'expression en système hétérologue et homologue. Il est présenté à sa droite, les fragments short et shorter qui ont été cloné dans le but d'expression en système hétérologue, chez les microorganismes. Le premier a été cloné sans le segment d'adressage, tandis que le second a été cloné sans les segments d'adressage et transmembranaire.

Sur la deuxième ligne, AtTAGL cloné dans sa totalité a été inclus, grâce au système Gateway, dans 2 vecteurs qui permettent l'expression avec une étiquette YFP chez les plantes. Le premier est le vecteur pH7WGY2 qui permet l'expression avec l'étiquette YFP en Nter du gène cloné et le second, pH7YWG2 permet l'expression de la même étiquette YFP en Cter du gène cloné.

Sur la troisième ligne, sont présentées 3 constructions qui utilisent l'étiquette ECGFP. En effet, une publication localise AtTAGL *in vivo* au niveau du tonoplaste (Schoning et al. 2007). Les protéines fluorescentes classiques de type xFP ne sont plus fluorescentes dans un environnement acide tel que celui rencontré au niveau de la vacuole. Il est donc nécessaire d'utiliser une protéine xFP fluorescente adaptée. Dans ce cas, il a été utilisé ECGFP, qui a été clonée en Nter d'AtTAGL complète, ou au milieu, après le domaine de liaison et avant le domaine globulaire responsable de l'activité et enfin, ou en Cter d'AtTAGL. Ces différentes constructions ont ensuite été clonées grâce au système Gateway, dans un vecteur de surexpression pH2GW7, et dans le même vecteur dont le promoteur CaMV 35S a été remplacé par celui d'AtTAGL. La figure 3.10 représente schématiquement ces diverses constructions.

Les plantes surexpresseur d'AtTAGL ne présentent pas de phénotype (voir la sous-section 3.5.6 page 116). Elles n'ont jamais été exploitées en ce qui concerne la mesure de l'activité lipase ou la quantification des diverses familles de lipides. D'un point de vue stratégique, il a été décidé de travailler sur les plantes mutantes *attagl* en priorité afin de mettre en évidence un éventuel défaut, que l'on confirmerait, le cas échéant sur les plantes de type surexpresseur.



Figure 3.11 – Expression relative d'AtTAGL chez des plantes de types sauvages et chez des plantes surexprimant AtTAGL

La valeur de référence est de 1 pour le niveau d'expression d'AtTAGL au sein de feuilles de rosette d'une plante de type sauvage. Chaque analyse a été réalisée en triplicat sur une plante indépendante. La sélection des plantes a été réalisée sur milieu sélectif, et contrôlé visuellement pour la fluorescence pour les lignées transformées avec le vecteur pK7WG2D. Quelques plantes sélectionnées ne présentent pas de surexpression d'AtTAGL. Le niveau de surexpression s'étale entre 1 à 10 fois la valeur de la quantité de transcrits chez les plantes sauvages. L'expression relative est normalisée par rapport aux gènes ménagers Actine et Eif4A.

3.2.2 Expression hétérologue chez Nicotiana benthamiana

Les constructions qui ont servi à l'expression hétérologue chez *Nicotiana benthamiana* permettent l'expression de protéines de fusion avec des protéines xFP sous le contrôle du promoteur CaMV 35S. Ce sont aussi ces constructions qui ont été utilisées pour la microcopie confocale (voir la Section 3.4 page 102). Ces constructions sont décrites dans la Figure 3.10 page précédente.

Avec un système dans lequel la production de la protéine a pu être réalisée et démontrée en microscopie confocale (voir section 3.4 page 102), il a été utilisé *Nicotiana benthamiana* en tant qu'hôte pour l'expression en système hétérologue. Les constructions utilisées pour la localisation *in vivo* sont tout à fait envisageables pour la purification des protéines recombinantes, étant donné que ces protéines sont étiquettées xFP. En plus de ces constructions, des vecteurs permettant l'expression de la protéine native sous contrôle d'un promoteur fort CaMV 35S (voir page 87) ont été utilisés (vecteurs de surexpression).

Il a été réalisé un test lipase sur des feuilles 2 jours après infiltration par agrobactéries. Un homogénat est produit et la mesure de l'activité lipase est réalisée selon le même protocole que celui utilisé pour la mesure de l'activité lipase chez les plantules d'Arabidopsis. La Figure 3.12 page suivante présente les résultats obtenus.

Pour chacune des agroinfiltrations pour lesquelles il y a une construction rAtTAGL, l'activité lipase est sensiblement plus forte, jusqu'à 130 fois


Figure 3.12 – Activité lipase dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées avec des constructions surexprimant rAtTAGL.

Plusieurs feuilles ont été infiltrées avec des agrobactéries portant des constructions dont un contrôle négatif correspondant à la protéine Rémorine taguée YFP en Cter. L'agroinfiltration est réalisée selon le protocole utilisé pour la localisation *in vivo*. Un homogénat a été réalisé à partir des feuilles après 2 jours. L'activité lipase a été déterminée en utilisant de la trioléine radiomarquée.

plus que l'activité mesurée chez le contrôle négatif. A l'opposé, le contrôle négatif (construction surexprimant la rémorine) présente une activité lipase proche du bruit de fond.

On ne peut cependant pas réellement quantifier son activité de manière absolue. En effet, en pratique, l'agroinfiltration s'avère difficile à reproduire de feuille en feuille, même avec la même solution d'agroinfiltration : elle pénètre plus ou moins bien dans le tissus. Il faut ajouter à cela qu'*Agrobactérium tumefaciens* ne pénètre peut être pas de manière homogène dans chacune des cellules du tissus infiltré. Ces éléments peuvent expliquer les barres d'erreur importantes.

Il faut ajouter à cela la mort cellulaire dans les zones agroinfiltrées, qui bien que plus faible que dans le cas de *Nicotiana tabacum* (voir la sous section 3.4.2 page 102) est tout de même présente, mais n'est pas constante.

On peut définitivement conclure que chacune des constructions entraîne une augmentation sensible de l'activité lipase, allant de 8 à plus de 130 fois l'activité du contrôle négatif. Ces résultats suggèrent fortement qu'AtTAGL est une lipase.

La protéine AtTAGL, lorsqu'elle est exprimée chez *Nicotiana benthamiana* entraîne une augmentation considérable de l'activité lipase mesurable. On peut donc penser que ce gène code pour une TAG lipase. Puisque l'activité lipase est mesurée à partir d'un échantillon complexe de plante, et non à partir de protéine purifiée, on ne peut cependant pas exclure qu'AtTAGL soit un simple activateur de lipase.

3.2.3 Test de la présence de la protéine par western blot

La présence d'activité nous informe de la présence de la protéine. Il a été décidé de tester les anticorps, anti AtTAGL. Deux westerns blots ont

été réalisés en parallèles, à partir du même échantillon. L'échantillon suit le même traitement, depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse en western blot. Deux types d'anticorps ont été utilisés. Celui désigné contre des peptides d'AtTAGL, et le second, un anticorps commercial polyclonal contre les protéines fluorescentes de type GFP (cet anticorps a déjà été utilisé contre diverses protéines de type xFP avec succès). Dans le cas du western blot réalisé avec l'anticorps anti AtTAGL, aucun signal n'a jamais pu être mis en évidence. Dans le cas des anticorps anti GFP, seul le signal du contrôle positif Rem-YFP a pu être mis en évidence au poids moléculaire approprié classique pour cette construction.

Puisqu'il y a un signal pour Rem-YFP, avec l'anticorps anti GFP, on peut considérer que ce n'est pas l'expérience qui n'est pas correcte, en terme quantitatif au départ. Cependant, l'absence de signal pour toutes les constructions rAtTAGL nous informe que la quantité de protéine AtTAGL est réellement très faible. Les outils de prédictions informatiques donnent le niveau de traduction d'AtTAGL comme faible, et ici la preuve *in vivo* est présentée.

Cette expérience bien qu'infructueuse nous permet cependant d'établir un élément important. On est dans l'incapacité de détecter la protéine AtTAGL par l'utilisation d'anticorps, mais il est cependant relativement facile de mettre en évidence la protéine en réalisant un test d'activité lipase. Même si ce test ne nous permet pas de quantifier la quantité d'enzyme, il nous permet d'avancer que la valeur de l'activité spécifique de la protéine native AtTAGL est réellement élevée. On peut aussi dire que l'on a un test d'activité lipase qui est vraiment sensible vis-à-vis de l'activité lipase d'AtTAGL.

Conclusion de l'expression hétérologue

L'expression hétérologue chez différents microorganismes a été infructueuse. Il n'a pas été possible de purifier une protéine recombinante rAt-TAGL. L'activité lipase mesurée sur des feuilles de *Nicotiana benthamiana*, transformées de manière transitoire avec des constructions rAtTAGL est jusqu'à 130 fois plus forte que pour le contrôle négatif. Ces mesures laissent penser qu'AtTAGL est une lipase vraie. Cette enzyme paraît faiblement exprimée chez cet hôte, mais semble avoir une activité spécifique très élevée.

3.3 Profil d'expression des gènes de la famille d'At-TAGL

AtTAGL est un membre d'une famille multigénique de 5 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Le suivi des profils d'expression de ces membres peut nous aider à comprendre le rôle de chacun.

3.3.1 AtTAGL est le seul gène de la famille multigénique à être exprimé pendant la croissance post-germinative

Les gènes At1g56630 et At5g67050 semble être des pseudos-gènes : en effet, la base de données TAIR, et son outil "genome browser" ne montre aucune EST pour ces gènes. À l'opposé, At5g42930, At3g14360, et AtTAGL présentent respectivement 1, 10 et 92 ESTs détectables dans la même base de données. La couverture en EST d'At5g42930 est faible. Tout le transcrit prédit n'est pas couvert.

Afin de vérifier si les gènes d'intérêt AtTAGL, At3g14360 et At5g42930 sont exprimés au cours de la croissance post-germinative, il a été décidé d'établir expérimentalement leur profil d'expression. AtTAGL et At5g42930 ne sont pas présents sur les puces à ARN les plus utilisées à l'heure actuelle. Il a donc été nécessaire de réaliser un profil d'expression de ce gène par PCR quantitative en temps réel (RT-PCRQ). Une partie de ce travail a été réalisé par Fabien Moretto, durant son stage de Master 2.

Les niveaux d'expression de ces différents gènes ont été vérifiés tout au long du cycle de vie de la plante. En détail, le niveau des transcrits a été suivis dans les racines, tiges, feuilles à 23 jours, feuilles à 55 jours et fleurs. Il a été porté plus particulièrement attention aux moments de plus grand intérêt pour l'étude. Ce sont la mise en place des réserves dans la graine et les premiers jours après son imbibition, qui comprennent donc l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative. L'expression des différents gènes a été étudiée, tout au long de la maturation de la graine, dans les siliques, 4 jours après la floraison, dans les graines extraites des siliques à 4, 8, 12, 16, et 20 jours après l'anthèse. L'expression de ces gènes a été suivie pendant les 7 premiers jours après l'imbibition.

Les niveaux d'expression mesurés pour les transcrits d'At5g42930 sont nuls (CT le plus faible, dans les racines, de l'ordre de 33, donc considéré comme du bruit de fond) . La Figure 3.13 page ci-contre présente les résultats de la mesure relative des transcrits d'AtTAGL et d'At3g14360 par RT-PCRQ.

Au niveau des organes de la plante, AtTAGL est faiblement exprimé dans tous les organes sauf les feuilles à 23 jours. Il n'y a pas d'expression d'AtTAGL durant la maturation de la graine. Il y a une augmentation transitoire rapide et claire de l'abondance des transcrits d'AtTAGL durant les premiers jours de la croissance post-germinative, avec un pic 4 jours après imbibition. L'abondance relative des transcrits est alors de l'ordre de 35 fois supérieure à celle de 2 jours.

En ce qui concerne At3g14360 : il serait préférentiellement exprimé dans les fleurs, de l'ordre de 6 fois plus que dans l'ensemble des autres organes où son niveau parait relativement stable. At3g14360 est induit fortement au cours de la maturation de la graine, et en fin d'embryogenèse. Il y a un véritable pic d'expression entre les jours 12 et 20 après l'anthèse. Le niveau d'expression de ce gène demeure constant et faible sur toute la période post-germinative.

At1g56630, At5g67050 et At5g42930 ne sont pas exprimés. On ne peut cependant exclure une expression dans des organes non testés ou bien



Figure 3.13 – Expression d'AtTAGL et d'At3g14360 dans la plante, au cours de la maturation de la graine et de la croissance post-germinative

Les mesures des niveaux de transcrits des gènes AtTAGL et At3g14360 sont normalisés par rapport aux gènes ménagers Actine et Eif4A. L'abondance des transcrits est relative à celle du stade post-germination de 2 jours. S+E 4 D : siliques + embryons (siliques entières) 4 jours après l'anthèse. Les profils d'expression de ces deux gènes sont clairement différents. Les amorces utilisées pour le suivi des transcrits d'At1g45201 correspondent à ceux correspond la forme d'épissage longue At1g45201.1.

dans des conditions d'induction particulières. L'absence d'EST pour ces gènes (ou une EST unique pour At5g42930) pourrait laisser croire à des pseudo gènes plutôt que des gènes.

Le profil d'expression d'At3g14360 rappelle celui de SDP1. L'abondance relative des transcrits de ces gènes augmente pendant l'embryogenèse pour attendre un pic à 15 jours après anthèse et diminue lorsque la graine est mature. Il n'y que peu d'expression pendant la germination *sensu stricto*, et pas du tout pendant la croissance post-germinative. Cependant, SDP1 a été caractérisé comme agissant durant l'hydrolyse des TAG. Il ne faut donc pas exclure un éventuel rôle durant la croissance post-germinative d'At3g14360. Compte tenu de nos résultats, l'hypothèse la plus simple pour At3g14360 serait un rôle durant l'embryogenèse. Je rappelle qu'il existe une diminution de la quantité d'huile de réserve dans la graine, à la toute fin de sa maturation. Ce moment semble coïncider avec le pic d'expression d'At3g14360. Ce phénomène a été observé chez différentes espèces oléagineuses et cette diminution conduirait à une perte en TAG de près de 10 % du contenu de l'embryon mature. Le rôle physiologique d'une telle diminution est inconnu mais l'impact économique est conséquent. At3g14360 pourrait jouer un rôle dans cette dégradation, faisant de lui un sujet de travail à part entière.

Le profil d'expression d'AtTAGL, avec un pic entre les 3 à 5 après l'imbibition, coïncide parfaitement avec le profil de l'hydrolyse des AGs au cours de la croissance post germinative (voir les Figures 1.14 page 25, et 3.8 page 83). Le fait que ces 2 profils semblent superposable démontre clairement qu'AtTAGL, parmi les 5 membres de sa famille multigénique, est celui présente le meilleur profil en tant que lipase impliquée dans l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative.

De manière générale, le profil d'expression d'At3g14360 est différent de celui d'AtTAGL. Il semble que ces 2 gènes, présentent un profil d'expression complémentaire : lorsque AtTAGL est peu ou pas exprimé, At3g14360 l'est. On peut prendre l'exemple des racines, tiges et feuilles, dans lesquels AtTAGL est significativement exprimé, alors que At3g14360 ne l'est pas. L'inverse reste aussi vrai : At3g14360 est exprimé dans les fleurs alors que AtTAGL ne l'est pas. Si on met cela en parallèle au fait que ces 2 protéines sont dans 2 familles différentes, qui semblent posséder des caractéristiques opposées, on peut se poser la question de savoir si ces 2 gènes ont un rôle complémentaires, et spécialisés l'un à l'opposé de l'autre.

3.3.2 Étude *in vivo* du promoteur d'AtTAGL

L'activité du promoteur du gène AtTAGL a été analysée au moyen d'une stratégie de gène rapporteur β -glucuronidase (GUS). Le gène GUS étant sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt, en l'occurence, le promoteur d'AtTAGL, l'activité β -glucuronidase mesurée reflète indirectement l'activité du promoteur et permet d'étudier son expression chez des plantes transgéniques. Afin de visualiser l'activité du promoteur, ce sont les 2000 pb avant le site d'initiation de la traduction d'AtTAGL, qui ont été placées en amont du gène rapporteur. L'analyse de l'activité β glucuronidase a été réalisée par marquage histochimique des tissus végétaux de la descendance de 3 lignées sélectionnées pour le transgène *AtTA-GLpromoter*::GUS. La β -glucuronidase hydrolyse du X-Gluc produisant un précipité bleu.

Les observations de cette activité, directement liée à l'activité du promoteur d'AtTAGL, ont été suivies comme les tests réalisés en rt-PCRq au cours du développement de la plante, dans différents organes, et au cours de la croissance post-germinative. Les résultats observables pendant la croissance post-germinative sur les lignées GUS 1 et 2 sont présentés dans les Figures 3.14 page suivante et A.7 page vii (en annexe). La Figure 3.15 page 96 présente les résultats des observations dans les autres organes.

Il est a noter que la troisième lignée présente des résultats similaires. La localisation du marquage reste la même chez toutes les lignées. La différence entre les 3 lignées est minime, et seule l'intensité du marquage est modifiée. Il est possible que la variation de l'intensité soit due à des variations dans le site d'insertion de l'ADN-T au niveau de l'ADN génomique des plantes.



Figure 3.14 – Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-TAGL durant la croissance post-germinative (la lignée Gus1)

L'activité β -glucuronidase représente celle du promoteur d'AtTAGL. Les 7 premiers jours depuis l'imbibition sont présentés. Cette Figure présente les résultats observées pour la lignée Gus1. Les tissus de plantes sélectionnées porteuses du transgène *AtTAGLpromoter*:::GUS ont été colorés pendant une nuit, puis observés avec un stéréomicroscope LEICA MZ FL III équipé d'une caméra numérique LEICA (modèle DC 300F).

Il n'y a pas d'activité GUS chez la graine sèche, et la graine imbibée au premier jour. Il n'y a pas d'activité GUS dans l'endosperme des graines, ou dans le manteau de la graine. Le promoteur est majoritairement actif au cours de la croissance post-germinative, avec un pic entre les jours 3 et 5 après l'imbibition. Il y a une activité du promoteur au niveau des racines, et de l'initiation des racines secondaires (voir Figure 3.15 page suivante). Il n'y a pas d'activité au cours de la maturation de la graine, ni dans les siliques. Il n'a pas été mis en évidence d'activité GUS dans les feuilles.

Si on se focalise durant la croissance post-germinative, étape présentant la plus forte activité du promoteur d'AtTAGL, l'activité est, dans les premiers jours, localisée au niveau de l'hypocotyle. Cette activité augmente au cours du temps dans l'hypocotyle et s'étend ensuite à un premier cotylédon, puis au second. Elle diminue ensuite, au cours du temps, aussi bien au niveau de l'hypocotyle que dans les cotylédons. A la fin de la croissance post-germinative, lorsque la capacité photosynthétique est éta-



Figure 3.15 – Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-TAGL dans divers organes de la plante

Voir la légende de la Figure 3.14 page précédente. Ces données sont issues des trois lignées Gus1, 2 et 3. L'activité du promoteur est visualisé par coloration histochimique GUS, sur des (A) racines, (B) le point d'initiation de racines secondaires, mais jamais ni sur (C) l'inflorescence, (D) ni sur des siliques, (E) ni sur des graines en maturation dans des siliques, (F) ni sur les feuilles caulinaires et les tiges, (G) ni sur des bourgeons de tige secondaire, (H) ni sur des feuilles à 15 ou 20 jours et pas non plus sur des feuilles sénescentes (I). blie, on retrouve l'activité du promoteur quasiment uniquement au niveau des racines.

On voit dans certains cadres des Figures 3.14 page 95 et A.7 page vii, que l'activité du promoteur n'est pas uniforme : chez certaines (ou chez un groupe de) cellules il y a activité du promoteur alors que les cellules voisines semblent sans activité. On a donc un motif d'expression du promoteur "en pois".

Dans un premier temps, si on regarde de manière générale les résultats du suivi de l'activité du promoteur AtTAGL par la technique de suivi histochimique de l'activité GUS, on note que ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en RT PCRq (Partie A de la Figure 3.13 page 93). Un des points de divergence entre cette technique et la RT PCRq est l'absence d'activité du promoteur au niveau des feuilles. En effet, en RT PCRq, on note une expression faible mais significative au niveau des feuilles. Cette différence n'est pas expliquée. L'activité maximale du promoteur est donc superposable à l'hydrolyse maximum des AGs (voir Figure 3.9 page 85).

Le suivi de l'activité du promoteur nous apporte un plus par rapport aux résultats des expériences de RT PCRq. En RT PCRq, l'information est limitée à la totalité de l'échantillon : les plantules entières ont servis pour la purification des ARNs. La technique du gène rapporteur GUS nous apporte des informations intéressantes quant à la localisation de l'activité du promoteur au sein d'un tissu plutôt qu'au sein d'un organe, ou de la plantule entière. Il est important de noter que le maximum d'activité du promoteur est localisé dans les tissus qui contiennent les réserves de la graine sous forme de TAGs : l'hypocotyle et les cotylédons. Il n'y a cependant pas d'activité GUS dans l'endosperme, un tissu riche en réserves sous forme d'huile. Dans des conditions normales de lumière, les réserves de l'endosperme ne sont pas hydrolysées pour la croissance postgerminative.

Lorsque l'on regarde le profil de l'activité du promoteur au cours de la croissance post-germinative (Figures 3.14 page 95 et A.7 page vii), on se rend compte que ce profil est très similaire au profil présenté par le promoteur de la phosphoénolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1, voir la Figure 1.15 page 26). Pour rappel, la PCK1 est la première enzyme de la gluconéogenèse (voir Figure 1.11 page 21). Ces données mises en relation avec la présence de séquences au niveau du promoteur d'AtTAGL, permettant la liaison avec les facteurs de transcription de type Dof sont réellement intéressantes. Pour rappel, les facteurs de transcription de type Dof sont impliqués dans la régulation du métabolisme des carbohydrates. On pourrait envisager que l'activité du promoteur d'AtTAGL soit régulée de la même manière que celui de PCK1, et il serait intéressant d'en comparer les séquences promotrices.

Il existe une activité du promoteur au niveau de la zone de d'élongation cellulaire de la racine. Ce phénomène observé n'est pas expliqué. Il est néanmoins en accord avec les données de RT PCRq et l'existence d'ESTs provenant de banques de racine. Le profil général obtenu par ce suivi histochimique de l'activité GUS reste valable pour des graines mises à germer à l'obscurité. L'activité du promoteur possède la même localisation. Au jour 4, l'activité du promoteur est forte dans les cotylédons. L'hypocotyle est par contre beaucoup plus allongé que dans le cas des plantes mises à pousser à la lumière, et l'activité GUS à ce niveau semble beaucoup plus diffuse (voir la Figure A.8 page vii en annexe). Il ne me semble pas anormal d'avoir une activité d'intensité plus faible que dans l'hypocotyle de plantes mises à pousser à la lumière, puisque l'hypocotyle s'allonge à l'obscurité. La même quantité de réserves au départ est donc beaucoup plus étalée sur un volume plus grand ; et la même chose se produit pour l'activité GUS du promoteur. Il y a une localisation au niveau de l'hypocotyle, mais faiblement intense.

Les résultats de l'analyse de l'activité du promoteur sont en accord (quasiment complètement) avec ceux obtenus par RT PCRq.

La construction *AtTAGLpromoter*::GUSv a été réalisée avec les 2000 pb avant le site d'initiation de la traduction, en tant que promoteur d'At-TAGL. On peut donc penser que le promoteur complet du gène *in vivo* est compris dans ces 2000 pb. Il serait intéressant de réaliser des constructions avec ce promoteur tronqué de divers éléments, dans le but d'identifier les régions promotrices indispensables pour l'expression durant la croissance post-germinative.

Il est envisageable qu'il existe un contrôle de la voie complète du catabolisme des TAGs, depuis l'activité lipase, jusqu'à la synthèse des sucres à partir des produits du catabolisme des TAGs. Il serait intéressant d'étudier les promoteurs de différentes enzymes clés de la voie du catabolisme des TAGs, pour identifier des séquences régulatrices conservées. Dans l'absolu, ces séquences pourraient permettre l'identification d'un facteur de transcription qui régulerait la voie complète.

Motif "en pois" de l'expression d'AtTAGL

Le motif histochimique "en pois" ressemble au motif d'expression de protéines reliées au cycle cellulaire. Aucune expérience n'a été réalisée pour confirmer ou infirmer l'implication du cycle cellulaire dans l'expression d'AtTAGL. Il a cependant récemment été publié un modèle de division cellulaire entraînant l'expansion des cotylédons chez Arabidopsis (Stoynova-Bakalova et al. 2004). Selon ce modèle, le motif de division serait un motif "en pois". Ce modèle de division et les données obtenues par le marquage histochimique semblent relativement proche. On ne peut pas exclure un rôle d'AtTAGL dans l'expansion des cotylédons, voir dans l'expansion de la racine, en liaison avec le cycle cellulaire.

La mesure de l'activité du promoteur à l'aide de l'activité β glucuronidase est une méthode destructrice, qui emploie de l'acétone pour décolorer des tissus, avant la réaction enzymatique rapportrice. Il n'est donc pas possible de corréler cette activité GUS avec la quantité de lipides, ou de corps lipidiques dans une cellule. Il est donc nécessaire de visualiser et/ou quantifier les lipides de manière indépendante. J'ai donc tenté de traiter des plantules avec un colorant spécifique des lipides qu'est le Fat Red B et de réaliser une observation à la loupe binoculaire, afin de mettre en évidence une répartition des réserves correspondant à l'activité en pois du promoteur d'AtTAGL. Cette technique de coloration utilise des lavages avec un système de PEG et glycérol et n'est pas destructive (Brundrett et al. 1991). La Figure 3.16 illustre le résultat obtenu.



Figure 3.16 – Coloration au Fat red B illustrant la distribution des réserves au sein d'une plantule 4 jours après l'imbibition

Un plantule de type sauvages est traité au jours 4 l'imbibition au Fat Red B. Le Fat red B est un colorant lipophile. Les éléments colorés en rouges sont des éléments lipophiles. On peut apercevoir dans certaines cellules, une coloration pourrait correspondre à des corps lipidiques. A : détail d'un cotylédon, B : détail de l'hypocotyle

La coloration au Fat red B met en évidence des structures globulaires dans les cellules qui pourraient être des corps lipidiques. Cette coloration n'est pas uniforme dans la plantule. Au niveau de la feuille, il y a des zones très localisées qui sont colorées. On retrouve un motif en pois. La coloration au niveau de l'hypocotyle semble plus uniforme : toutes les cellules sembles être colorées.

Il semble que la coloration avec le colorant lipophile Fat Red B soit similaire à la coloration bleue due à l'activité GUS obtenue en histochimie. On peut penser que l'activité GUS serait localisée dans des zones ou il y a des structures qui pourraient être des corps lipidiques. Il est cependant difficile de corréler ces 2 éléments. Il serait intéressant de réaliser une étude détaillée de la localisation au sein des tissus, des réserves lipidiques dans les graines, et les cotylédons au cours de la croissance germinative. En effet, la répartition des réserves lipidiques au sein de ces tissus n'est peut être pas aussi uniforme que ce qui a été décrit. Il est possible que ce soit la dégradation de ces réserves qui ne soit pas uniforme.

Je peux néanmoins émettre un modèle quant à ce motif. Ce modèle correspondrait à une régulation de proche en proche de l'activité du promoteur. Considérons qu'AtTAGL code pour une TAG-lipase responsable de l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative. Son activité lipase est forte. Si toutes les cellules produisent au même moment la lipase, que cette lipase a accès à son substrat, la totalité du substrat va très vite être hydrolysé. Il y a alors un afflux d'acides gras dans la β oxydation tellement important qu'elle est saturée qu'elle ne peut prendre en charge la totalité de ces éléments. Si la β -oxydation est capable de traiter cette forte demande, l'afflux ponctuel d'énergie et de sucres permet-il à la plante d'acquérir d'un seul coup la photosynthèse? L'idée simple pour éviter ces problèmes est alors de réguler l'activité lipase de proche en proche. Une cellule (ou zone de cellule) produit la lipase, et les voies enzymatiques activées produisent les sucres nécessaires au métabolisme des cellules qui l'entourent. Une fois les réserves de cette cellule (ou de ce groupe) hydrolysées, ces cellules deviennent à leur tour dépendantes de leurs voisines. Dans ce cas, la régulation est réalisée au niveau transcriptionnelle plutôt que post-traductionnelle, puisque c'est le suivi de l'activité du promoteur qui est visualisé (et non pas le suivi de l'activité protéique). La Figure 3.17 page ci-contre illustre le modèle que je propose.

CONCLUSION QUANT AU PROFIL D'EXPRESSION D'ATTAGL

Parmi les membres de la famille multigénique, seul AtTAGL est exprimé selon un profil temporel et spatial qui correspond à celui de l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative. En effet, AtTAGL présente un pic d'expression clair entre les jours 3 à 5 après l'imbibition. Le promoteur d'AtTAGL est actif au niveau des cotylédons et de l'hypocotyle, les tissus de réserves de l'huile.

L'expression hétérologue démontre qu'AtTAGL est une lipase. Le gène AtTAGL est exprimé pendant et au lieu de l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative. Ces éléments en font un bon candidats en tant que lipase impliquée dans l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative.



Figure 3.17 – Modèle comparatif entre une hydrolyse complète des TAGs, et une hydrolyse régulée de proche en proche

Dans ce modèle, il y a régulation de proche en proche. Elle permet d'étaler dans le temps l'hydrolyse des TAGs, afin de ne pas avoir un tissu complètement vidé de TAGs, et ne pouvant plus évoluer. Si le signal négatif d'inhibition est réalisé au niveau transcriptionnel, il y a alors un motif d'expression du promoteur "en pois", étalé au niveau de l'ensemble du tissu.

3.4 LOCALISATION SUB-CELLULAIRE

Cette section présente les expériences que j'ai réalisées pour localiser AtTAGL par microscopie confocale.

3.4.1 Constructions

La protéine AtTAGL a été identifiée par protéomique au niveau du tonoplaste, la membrane de la vacuole. Dans un environnement vacuolaire où le pH est acide, les protéines fluorescente de type xFP ne fluorescent pas. Cela est expliqué par l'importance du pKa de certains résidus indispensables à la fluorescence (Tamura et al. 2003). Il est alors nécessaire d'utiliser un type de protéine fluorescente qui n'est pas sensible au pH.

Sawano et Miyawaki (2000) ont généré, par mutagenèse aléatoire, des protéines de type xFP qui sont capables de fluorescer à pH acide. La protéine ECGFP pour "enhanced cyan green fluorescent protein" présente l'intérêt de conserver à quasiment 100 % l'intensité de sa fluorescence, quelques soient les conditions du pH du milieu environnant. J'ai donc utilisé l'ECGFP pour générer généré 3 constructions de fusion AtTAGL ECGFP décrites à ligne 3 de la Figure 3.10 page 88. La protéine ECGFP a été placée en Nter (ECGFP-AtTAGL), entre le domaine transmembranaire et le domaine lipase (At-ECGFP-TAGL) et en C-terminal (AtTAGL-ECGFP). J'ai également réalisé des constructions avec la protéine YFP fusionnée avec AtTAGL en Nter ou en Cter (voir la ligne 2 de la Figure 3.10 page 88).

Une protéine de fusion en Nter d'AtTAGL peut possiblement être clivé, entraînant un signal fluorescent correspondant à une localisation cytosolique mais qui ne correspond pas à la réalité *in vivo*. La position en Cter pourrait perturber d'éventuels signaux d'adressage. C'est pour ces raisons qu'il a été décidé de réaliser une construction avec ECGFP au sein de la protéine.

3.4.2 L'agroinfiltration avec les constructions contenant AtTAGL entraîne de la mort cellulaire chez *Nicotiana tabacum*

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* porteuse des vecteurs décrits dans le paragraphe précédent a été inoculée à une densité optique de 0,05 sur des feuilles de la plante *Nicotiana tabacum*. Ces constructions, contrairement aux contrôles positifs et négatifs (sans AtTAGL), se sont avérées entraîner, à des niveaux variables, de la mort cellulaire (voir les Figures 3.18 page suivante et en annexe A.4 page iv). Ce résultat pourrait suggérer que la protéine AtTAGL est toxique pour les cellules de tabac. J'ai utilisé par la suite *Nicotiana benthamiana*, réputé être moins sensible aux agrobactéries.



ECGFP-At1g45201

At1g45201-ECGFP

YFP-Rem

Figure 3.18 – Mort cellulaire liée à l'expression de formes recombinantes d'AtTAGL chez *Nicotiana tabacum*

Il y a de la mort cellulaire chez toutes les feuilles pour lesquelles a été agroinfiltré une souche d'agrobactérie porteuse d'un vecteur contenant une construction permettant l'expression de rAtTAGL. Dans le cas des cellules inoculées avec le tampon seul ou avec une construction contrôle négatif (vecteur codant pour la protéine recombinante YFP-rémorine fournie par Artémis Perraki), il n'y a pas de mort cellulaire. Les zones de mort cellulaire sont présentées par des flèches. Les traces rondes visibles dans tous les cas sont liées au procédé d'infiltration. Ces photos ont été prises 2 jours après l'agroinfiltration. Seuls les côtés adaxiaux sont détaillés. Complément à la Figure en annexe A.4 page iv.

3.4.3 AtTAGL est co-localisée avec un marqueur du peroxysome chez Nicotiana benthamiana

Nicotiana benthamiana a été agroinfiltrée avec les fusions At- ECGFP-TAGL et AtTAGL-ECGFP. Seule cette dernière construction a donné un signal mobile suggérant une localisation dans un organite. Peu de cellules ont été transformées. Il semble que lorsque des cellules sont transformées, au final, il y a lyse de ces cellules : autour des cellules qui présentent un signal fluorescent correspondant à l'ECGFP, il y a un nombre important de cellules lysées. Il est possible que l?observation de la fluorescence correspondant au fusions ECGFP AtTAGL soit possible uniquement dans un laps de temps réduit, avant la lyse complète des cellules.

Quoi qu'il en soit, cette localisation ne correspondait pas avec l'autofluorescence des plastes. La co-expression avec PEX2, un marqueur des peroxysomes (Sparkes et al. 2005), a montré une co-localisation (voir la Figure 3.19 page ci-contre).

Ces résultats demandent à être confirmés. Nous avons donc cherché à transformer de façon transitoire des plantules d'arabidopsis qui semblaient être un meilleur modèle physiologique. En parallèle, des plantes stables ont été générées avec ces constructions. A l'heure actuelle, il n'a pas été possible de les exploiter.



AtTAGL-ECGFP



PEX2-YFP



MERGE

Figure 3.19 – Microscopie confocale permettant de mettre en évidence la colocalisation entre AtTAGL-ECGFP et PEX2-ECGFP dans les cellules épidermiques de *Nicotiana benthamiana*

Les observations ont été effectuées sous microscope confocal à 488 nm et 514 nm avec l'aide de Patrick Moreau. En haut, ECGFP est en Cter d'AtTAGL. Au milieu, YFP et en Cter de PEX2. En bas est présenté les 2 première images fusionnées. La coloration blanche sur cette image indique une colocalisation. La barre sur les images représente 10 μ m.

3.4.4 Localisation in vivo chez des plantules d'Arabidopsis thaliana

Aucune des 2 constructions dont la protéine fluorescente est l'YFP ne présente de fluorescence. Chacune des 3 constructions réalisées codant pour des protéines de fusion AtTAGL avec ECGFP présentent de la fluorescence, bien que l'efficacité de transformation soit faible et que peu de cellules soient transformées. Dans le cas de la protéine dont ECGFP est placée en Nter (ECGFP-AtTAGL), la fluorescence semble diffuse et cytosolique. Dans le cas des constructions avec ECGFP située dans AtTAGL et ECGFP située en Cter d'AtTAGL (respectivement At-ECGFP-TAGL et AtTAGL-ECGFP), le signal de fluorescence semble être localisé dans des compartiments similaires, qui ne correspondent pas à l'autofluorescence des chloroplastes. La Figure 3.20 page suivante présente des images de la fluorescence observée.

Sans la présence de marqueur qui peuvent confirmer la localisation, il n'a pas été possible de définir ces éléments. Il se pourrait qu'il s'agisse de glyoxysomes mais cela reste à démontrer en utilisant un marqueur approprié.



ECGFP-AtTAGL



At-ECGFP-TAGL



AtTAGL-ECGFP

Figure 3.20 – Microscopie confocale permettant de mettre en évidence la fluorescence des constructions contenant ECGFP

Les observations ont été effectuées sous microscope confocal avec l'aide de Patrick Moreau. En haut, ECGFP est en Nter d'AtTAGL. Les 2 images au centre présentent une suite d'images correspondant à la construction At-ECGFP-TAGL. La suite d'image permet de mettre en évidence que certains points de fluorescence sont très concentrés et mobiles dans la cellule. En bas, la localisation de la construction AtTAGL-ECGFP ressemble fortement à celle de la construction At-ECGFP-TAGL. Les barres représentent 10 μ m sur chaque image.

CONCLUSION

Je suis conscient que les expériences ci-dessus doivent être répétées et confirmées par l'étude de transformants stables. Néanmoins, ces résultats suggèrent qu'AtTAGL correspondrait à la lipase glyoxysomale mise en évidence dans le ricin et le colza (Maeshima et Beevers 1985, Hills et Beevers 1987, Murphy et al. 1989). Alors, quel rôle pourrait jouer cette lipase ? Comment pourrait elle accéder à son substrat, situé dans un autre compartiment sub-cellulaire ?

La microscopie optique a mis en évidence des accolements entre les glyoxysomes et les corps lipidiques qui pourraient répondre à cette question. Ces accolements seraient-ils le fruit du hasard, purement et simplement à la chance d'une collision due au mouvement brownien. Est il possible que suite à une collision, il y ai un mécanisme de liaison irréversible entre les glyoxysomes et les corps lipidiques, qui permettrait de les garder en contact? Peut-on envisager qu'il existe un mécanisme actif du mouvement des ces organites pour qu'une rencontre soit organisée? Pour répondre à ces questions, il est nécessaire de réaliser cette étude dans le contexte d'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative, à l'aide de plantules transformées de façon stable. Les corps lipidiques peuvent être visualisés avec du rouge de Nile (voir la Figure A.11 page x en annexe).

Au niveau biochimique, l'activité lipase liée aux glyoxysomes a été mis en évidence depuis longtemps. Cependant, dans de nombreux modèles proposés la lipolyse dépend d'une lipase localisée dans les corps lipidiques, comme SDP1. Qu'elle pourrait être la fonction d'une lipase glyoxysomale?

Quoi qu'il en soit, contrairement aux données de protéomique publiées, l'étude de la localisation sub-cellulaire d'AtTAGL, grâce à des protéine de fusion fluorecentes suggère une localisation peroxysomale. Une activité lipase glyoxysomale a été déjà décrite dans la bibliographie (Maeshima et Beevers 1985, Hills et Beevers 1987, Murphy et al. 1989). Cependant, l'identification du gène responsable de cette activité serait une première.

3.5 FONCTION PHYSIOLOGIQUE ET RÔLE *in vivo*

3.5.1 Mutant attagl d'Arabidopsis

Au locus At1g45201, il existe deux lignées qui portent un ADN-T qui pourraient impacter le gène correspondant. La première lignée, est de type SALK (Alonso et al. 2003) dans le fond génétique Col:o, et son identifiant est le suivant : SALK_145591.48.50.x. Le transgène correspondant est inséré dans le promoteur d'AtTAGL. La seconde lignée est de type GABI-Kat (Li et al. 2003), elle aussi dans le fond génétique Col:o. Le transgène correspondant est inséré au niveau du 5^{ème} intron de la forme longue d'épissage alternatif. Sa référence est : GK-752B08-023800.

Dans chacune de ces 2 lignées, le transgène n'est pas inséré dans une partie codante du locus At1g45201. Il a été décidé de travailler uniquement avec la lignée SALK_145591.48.50.x, lignée avec l'insertion située dans le promoteur. Cette localisation au niveau du promoteur permet d'espérer une expression réduite du gène AtTAGL, mais on ne peut exclure une expression minimale, et entraînant donc surtout un transcrit complet, codant pour une protéine fonctionnelle.

Il est intéressant de noter que le génome, et les gènes qui entourent le locus At1g45201 sont criblés d'inserts, alors que ce locus présente des inserts uniquement dans des régions non codantes. Bien qu'il existe des "hots spots" et des "colds spots" pour l'insertion des transgènes dans le génome, il est inévitable de penser, en regardant les locus à proximité immédiate que ce locus présente une anormalité.

3.5.2 Contrôle quant-à la lignée SALK_145591

La lignée SALK_145591.48.50 commandée au "Nottingham Arabidopsis Stock Centre" (NASC) est une lignée présentée comme étant hétérozygote. Il a donc été dans un premier temps nécessaire d'identifier des plantes homozygotes pour le transgène inséré. Cette étape a été réalisée par PCR, selon le protocole proposé sur le site "T-DNA Primer Design" du SALK. La Figure 3.21 page suivante présente un résultat permettant d'identifier une plante homozygote.

Afin de correctement localiser le site d'insertion du transgène au niveau du promoteur d'AtTAGL, les amplicons obtenus par PCR, et qui ont permis l'identification de plantes homozygotes mutantes, ont été séquencés. La Figure 3.22 page 111 fait la synthèse des informations apportées par ce séquençage.

En ce qui concerne la lignée SALK_145591, l'ADN-T est inséré exactement au site d'initiation de la transcription en position 17 123 820 du chromosome 1 d'*Arabidopsis thaliana*. La position de l'insert entre la boîte TATA et le site d'initiation de la transcription indique *a priori* que les plantes mutantes homozygotes ne devraient pas être capable de synthétiser l'enzyme AtTAGL. Il faut cependant garder à l'esprit que le transgène n'est pas dans un exon. On ne peut exclure l'hypothèse de la synthèse, même à un niveau minimal de transcrits codant pour AtTAGL, et donc la synthèse de l'enzyme correspondante, même en quantité infime.

Afin de vérifier que l'expression est bien minimale dans les lignées mutantes, des analyse de l'expression d'AtTAGL ont été réalisées par RT PCRq. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.23 page 111.

La Figure 3.23 page 111 démontre clairement qu'il n'y pas de synthèse de transcrit AtTAGL détectable au cours de la croissance post-germinative chez les plantes mutantes *attagl*, comparée aux plantes sauvages.

Même si on ne peut pas exclure une expression infime du gène, on peut considérer l'expression comme étant quasiment nulle, compte tenu de la sensibilité de la technique de PCR. Comme l'insert n'est pas situé dans un exon, on ne peut considérer ce mutant comme étant un mutant "knock out" (KO). Il est donc décrit étant un mutant "knock down" (KD).

Il existe donc un mutant KD appelé attagl d'insertion de type SALK,



Figure 3.21 – Identification d'une plante homozygote porteuse d'un transgène dans le promoteur d'AtTAGL

Le système d'amorces utilisé pour mettre en évidence par PCR une plante de type homozygote mutante présentant le transgène inséré, hétérozygote ou homozygote sauvage est indiqué en A. La sous Figure B présente le type de résultat obtenu pour une plante sauvage à gauche, et une plante homozygote mutante, à droite.

dont la référence est SALK_145591. Des plantes mutantes homozygotes pour le transgène ont été sélectionnées. Chez cette lignée, le transgène est inséré entre la boîte TATA et le site d'initiation de la transcription et il n' a pas été possible de détecter des transcrits pendant la croissance postgerminative. On peut donc supposer que chez ces plantes mutantes *attagl*, il n'y a pas d'enzyme AtTAGL produite.

3.5.3 Nécessité d'autres lignées mutantes attagl

Il est préférable de disposer de plusieurs allèles indépendants pour étudier un phénotype. En effet, l'utilisation de lignées mutantes indépendantes pour un même gène, permet de valider que le rôle démontré est bien lié à la mutation considérée.

Dans le but d'avoir une seconde lignée indépendante utilisable afin de confirmer un rôle éventuel du gène AtTAGL, il a été décidé de générer des plantes de type aMiRNA pour AtTAGL (Schwab et al. 2006). Le principe est basé sur l'insertion dans le génome de la plante d'un transgène qui permet l'expression d'un microARN artificiel (aMiRNA) et permet d'obtenir des mutants KD. Les miRNA sont des ARNs simple brin qui participent

Position du site d'insertion du transgène dans le génome d'une plante sauvage

TATTACTAG CTCTATAAAT ACGTAGCCACTCTCTAGGTTGCATGACT CA CAAA TCAACCATTTCTCCTTTCTTCTTATTTCTGAGCAAAGTTTTTTCTTCCTTTCATA TTGTGAGGATGTCCA

Légende :

CTCTATAAAT = Boîte TATA

CA = C'est entre ces deux bases qu'est inséré le transgène, et la première lettre grise est le site d'initiation de la transcription

ATGC = 5' UTR

ATG = Site d'initiation de la traduction

Figure 3.22 – Site exact de l'insertion du transgène dans le promoteur d'AtTAGL

Chez les plantes mutantes, le transgène est inséré entre la boîte TATA, et le site d'initiation de la transcription. La position du transgène est exactement 1 base avant le site d'initiation de la transcription (première base en gris dans la figure). L'insertion a induit des remaniements de la zone, avec une séquence répétée en amont de l'insertion, et le remplacement de 14 bases du 5' UTR d'AtTAGL par une séquence inconnue en aval du site d'insertion. La position de l'insertion du transgène sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis thaliana* est donc la suivante : 17123820. Un complément de ces données est présenté en annexe. Voir Figure A.9 page viii.



Figure 3.23 – Mesure de l'expression d'AtTAGL chez des plantes sauvages et mutantes *attagl*

L'expression d'AtTAGL a été réalisée au cours de la croissance post-germinative chez des plantes sauvages et des plantes mutantes pour AtTAGL. Aucune expression significative n'a été détectée chez les plantes mutantes *attagl*. Les mesures des niveaux de transcrits sont normalisés par rapport aux gènes ménagers Actine et Eif4A. L'abondance des transcrits est relative à celle du stade 2 jours après l'imbibition.

à la régulation négative de l'expression des gènes. L'expression à un niveau relativement élevé d'un aMiRNA (MiRNA artificiel), tout du moins supérieure à l'expression du gène ciblé, permet donc de réduire l'expression de celui-ci. Nous avons choisi de placer cet aMiRNA sous le contrôle du promoteur de PCK1, dont on sait qu'il s'exprime fortement pendant la croissance post-germinative. Une partie du travail pour générer cette construction a été réalisé par Fabien Moretto au cours de son stage de Master 2. Des plantes ont été transformées de manière stable par "floral dipping" et plusieurs lignées ont été sélectionnées. Ces lignées n'ont pour l'heure pas été exploitées : il a été décidé d'utiliser ce type de plante uniquement en complément des plantes mutantes *attagl* afin de confirmer un éventuel phénotype.

3.5.4 L'activité lipase est affectée dans le mutant d'insertion

L'activité TAG lipase a été mesurée à différent stades, depuis la graine sèche, jusqu'à 7 jours après l'imbibition. Les graines sont placées sur des boîtes de culture *in vitro*, puis placées au réfrigérateur pendant 4 jours afin que la levée de dormance soit synchronisée. Les plantules sont récoltées à intervalles réguliers de 24 heures, congelées dans de l'azote liquide et conservées à -80 °c avant leur utilisation qui doit être simultanée pour permettre une comparaison fiable.

L'activité lipase a été mesurée à pH 7,5, sur une émulsion de trioléine tritiée (marquée ³H au niveau des acides gras). L'extrait protéique testé correspond à la fraction soluble, c'est-à-dire un surnageant post 1000 g dont la couche huileuse (les corps lipidiques) est exclue.

L'activité lipase mesurée en parallèle chez des plantes sauvages et mutantes *attagl* au cours du temps est présentée dans la figure 3.24. Cette activité est normalisée par rapport à la quantité de protéine contenue dans les extraits.



Figure 3.24 – Activité lipase de la fraction soluble au cours du temps chez des plantes de type sauvage et mutantes pour AtTAGL

L'activité lipase dans les fractions solubles des deux types de plantes à été mesurée sur une émulsion de trioléine, à pH 7,5, et est normalisée par rapport à la quantité de protéines totale des extraits. Pour chaque point de mesure, les extraits ont été préparés à partir de plantules différents (n=3). Chaque réplicat biologique est la moyenne de 3 comptages.

Chez les plantes de type sauvage, l'activité lipase de cette fraction soluble est nulle pour des graines sèches, et à 1 jour après l'imbibition. L'activité augmente alors au jour 2, puis beaucoup plus fortement jusqu'au jour 4 et 5 après l'imbibition. L'activité est alors maximale à ce stade, avec une valeur de 9 mU.min⁻¹.mg de protéine⁻¹. L'activité lipase diminue ensuite progressivement les jours suivants.

Chez les plantes mutantes *attagl*, l'activité lipase est fortement réduite. Au jour 3, elle représente 12 % de l'activité mesurée sur les extraits de plantes sauvages, au jour 4,18 %, au jour 5, 23 %, au jour 6, 27 %, et enfin, au jour 7, 24 %.

Ce résultat indique que l'enzyme AtTAGL semble être responsable de 75 % de l'activité lipase soluble mesurée à pH 7,5 au cours de la croissance post-germinative.

Lorsque l'on regarde l'activité lipase chez la plante sauvage, elle est superposable à la vitesse de dégradation des acides gras au cours du temps (voir Figure 3.9 page 85). Elle est aussi superposable au profil d'expression d'AtTAGL (voir Figure A.5 page v). Il existe cependant des différences, dans les deux cas, au jours 5, 6 et 7 : après que la majorité des TAGs ont été hydrolysés. Alors que le profil de la vitesse de dégradation des TAGs diminue clairement à partir du jour 5, l'activité lipase reste élevée chez les plantes de type sauvage. L'activité lipase mesurée pourrait être liée à la présence de l'enzyme, qui aurait une durée de demi-vie de l'ordre de 1 à 2 jours. Néanmoins, l'analyse du mutant montre qu'il y a mise en place tardive d'une autre activité lipase soluble, indépendante d'AtTAGL. Il est possible que cette activité lipase soit attribuable à At3g14360. Cependant, nous avons vu précédemment que le gène At3g14630 n'est exprimé que faiblement et de manière constante tout au long de la croissance post germinative ; son expression est bien plus faible que pendant l'embryogénèse. Un autre candidat possible pourrait être AtLip1 (El-Kouhen et al. 2005), dont le profil d'expression serait tout à fait compatible.

L'activité lipase soluble mesurée à pH 7,5 sur des plantes de type sauvage semble coordonnée avec l'hydrolyse de TAGs au cours du temps. Le maximum d'activité lipase chez les plantes de type sauvage est situé 4 à 5 jours après l'imbibition et de l'ordre de 9 mU.min⁻¹.mg de protéine⁻¹. Rapportée à une plantule, cette activité mesurée est de l'ordre de 12 pmol.min⁻¹. Ces 12 pmol d'AGs libérés par minute représentent après approximation, 3,248 ng d'AG libérés par **minute** (masse molaire de l'acide linoléïque : 280 g.mol⁻¹) soit 4,8 μ g d'AGs libérés par jour. Cette information est à mettre en parallèle avec celle issue de la Figure 3.9 page 85, qui nous donne un maximum d'hydrolyse d'AG mesuré *in vivo* de 2 μ g d'AG par **jour**. L'activité lipase soluble mesurée *in vitro* est donc clairement en excès par rapport à l'activité lipase réelle *in vivo* : il faudrait moins de 2 jours pour hydrolyser la totalité des acides gras de la graines à cette vitesse.

La différence entre l'activité lipase réelle totale *in vivo*, et l'activité lipase mesurée *in vitro* est importante. Quels pourraient-être les éléments responsables d'une telle différence? Il faut tout d'abord considérer que l'activité mesurée *in vitro* est réalisée dans les meilleures conditions possibles, et en quantité de substrat non limitante. *In vivo*, il est possible que l'enzyme AtTAGL agisse dans un environnement beaucoup moins favorable (pH, qualité de l'interface, présence de protéines à l'interface) ou

qu'elle ait accès à une quantité limitée de substrat. Ceci pourrait être lié à une localisation spatialement distincte, dans les glyoxysomes par exemple. On peut aussi imaginer que la lipase soit à proximité de son substrat, dans ces structures membranaires de contact entre glyoxysomes et corps lipidiques. La limitation de l'accès à son substrat pourrait être dû à l'hémimembrane recouvrant les corps lipidiques.

3.5.5 L'activité lipase soluble d'Arabidopsis est sensible à la THL, tout comme celle du colza

De la THL a été incubée en excès molaire de l'ordre de 100 par rapport à la quantité de lipase estimée, pendant 30 minutes sur des aliquots d'extraits de jour 4 après l'imbibition, obtenus à partir de plantes sauvages ou mutantes *attagl*. Les activités lipases ont été comparées à celles d'aliquots issus des mêmes extraits, n'ayant pas reçu de traitement, ou ayant été bouillis pendant 10 minutes. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.25.



Figure 3.25 – Sensibilité de l'activité lipase mesurée à la THL

Pour chacune des deux types de plantes, un aliquot des extraits solubles au jour 4 après l'imbibition a été préincubé avec de la THL, sur glace pendant 30 minutes avant la mesure de l'activité lipase. On estime que la THL est présente dans un rapport 100 fois supérieur à celui de la protéine responsable de l'activité lipase (si l'activité spécifique est de 3000 Ui). La même quantité d'aliquot est testée telle quelle afin de servir de référence et une autre est bouillie avant la mesure pour servir de contrôle négatif.

Ces résultats montrent que la lipase AtTAGL est, comme BnTAGL, sensible à la THL.

Il faut y ajouter qu'il existe au moins une autre lipase, que l'on retrouve dans la fraction soluble et qui est elle aussi sensible à la THL. Cette enzyme est donc probablement elle aussi une enzyme à sérine catalytique.

Conclusion

AtTAGL est la lipase responsable de la majeure partie de l'activité lipase détectée dans des plantules d'Arabidopsis. Elle représente à elle seule 75 % de l'activité lipase soluble dans nos conditions de mesure de l'activité. La question qui se pose maintenant est de savoir quelle peut être sa fonction physiologique.

3.5.6 Les mutants *attagl* présentent un léger retard de germination mais ne présentent pas de différence avec le type sauvage pour la croissance post-germinative

Comme présenté dans la Section 1.3 page 15, il faut distinguer germination et croissance germinative. Un contrôle indispensable à réaliser lorsque l'on veut étudier l'hydrolyse des réserves pour la croissance postgerminative est que la germination aboutisse normalement.

Des graines issues de plantes ayant poussé dans les mêmes conditions sont mises à germer après que leur dormance ai été levée (en les plaçant 4 jours au froid). La germination des graines est ensuite déterminée visuellement en suivant l'émergence de la radicule. La Figure 3.26 illustre les résultats obtenus.



Figure 3.26 – Germination des plantes sauvages et mutantes attagl

La germination est évaluée visuellement chaque jour. C'est l'émergence du radicule qui permet de considérer qu'une graine est germée. Elle a été calculée sur 3 répétitions de 200 graines. * indique que la fréquence de germination des plantes mutantes *attagl* au jours 1, 2 et 3 après la croissance post-germinative est significativement plus faible que celle des plantes sauvages (test du χ^2).

La fréquence de germination des plantes de type sauvages et des plantes mutantes *attagl* est proche de 100 %. Il n'y a pas de défaut dans la germination pour ces deux types de plantes. Il faut cependant noter qu'il existe un retard significatif pour la germination des graines mutantes *attagl*. Au jour 1 après l'imbibition, 56 % des plantes mutantes ont germé contre 71 % pour les plantes sauvages. Au jour 2, les scores respectifs sont de 84 % contre 94 %, et au jour 3 de 89 % contre 96 %.

Puisqu'il n'y a pas de défaut majeur dans la germination des plantes sauvages et mutantes *attagl*, il est possible d'étudier l'hydrolyse de leurs réserves pour leur croissance post-germinative. Il faut cependant noter qu'il existe un léger retard, mais significatif pour les plantes mutantes pour AtTAGL. En cas de différence dans l'hydrolyse des réserves, il faudra prendre en compte ce retard. L'inspection visuelle des plantes mutantes et sauvage n'a pas permis de mettre en évidence la moindre différence au cours de la croissance post germinative, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Tout au plus a-t-il été noté, dans certains cas, un peu plus de plantes de faible taille chez le mutant *attagl* que chez le sauvage en fin de croissance post-germinative. Néanmoins, ce phénotype n'a pas été reproduit avec tous les couples mutants-sauvages indépendants de graines.

Les graines issues des plantes sauvages et mutantes ont été mises à germer en parallèle dans de la terre, pour mimer le milieu naturel. Ces graines ont été placées à différentes profondeurs (o à 25 mm de profondeur, par paliers de 5 mm), dans un même bac repli d'un mélange standard servant à la culture d'Arabidopsis. Les plantes sauvages et mutantes se sont comportées de façon identique. Seules les plantes à la surface du sol ou enterrées jusqu'à 10 mm de profondeur se sont établies.

Des lignées surexprimant AtTAGL dans le fond génétique sauvage ont été générées (voir la sous-section 3.2.1 page 87). Les plantes correspondant à ces lignées ne présentent pas non plus un quelconque phénotype.

Les mêmes constructions ont été utilisées pour complémenter les plantes mutantes *attagl*. Il a été généré des lignées de complémentation pour lesquelles c'est le promoteur d'AtTAGL qui contrôle l'expression des protéines recombinantes AtTAGL. A l'heure actuelle, ces lignées n'ont pas été exploitées.

3.5.7 Le profil d'hydrolyse de l'huile est similaire chez les plantes sauvages et mutantes *attagl*

J'ai tout d'abord réalisé une analyse qualitative de l'évolution du contenu en lipides neutres par chromatographie sur couche mince pendant la croissance post-germinative. Les résultats, présentés dans la Figure 3.27 page ci-contre ne montrent pas de différence notable entre mutant et sauvage. Il n'y a pas de différence apparente dans la vitesse d'évolution des TAGs au cours de la croissance post-germinative entre les plantes sauvages et mutantes *attagl*. Il n'y a pas non plus de différence dans l'évolution des DAGs et des MAGs, ce qui ne nous permet pas de mettre en évidence un rôle d'AtTAGL en tant que DAG lipase ou MAG lipase au cours de la croissance post-germinative.

Des analyses quantitatives ont alors été réalisées. Les résultats d'une expérience typique réalisée avec un couple de lot de graines est montrée dans la Figure 3.28 page 118.

Les profils de disparition des acides gras totaux sont très similaires entre les plantes de type sauvage et les plantes mutantes *attagl*. Cette similarité se retrouve également dans l'évolution de l'acide éïcosanoïque, marqueur spécifique des TAGs. En réalité, il s'avère qu'il n'y a pas de différence statistiquement détectable. Cette expérience a été réalisée plusieurs fois, avec différents lots de graines et une résolution temporelle allant jusqu'à la demi journée. Même s'il semble, comme on peut le voir sur la Figure 3.28 page 118, qu'il pourrait y avoir un léger retard de l'hydrolyse des réserves lipidiques, cette différence n'est pas statistiquement significative car nous n'avons pas pu réduire les écarts types en dessous de 6 à 7 %.



Figure 3.27 – Évolution comparée des lipides neutres

Les lipides sont extraits à partir de plantules entre les jours 2 à 6 après l'imbibition. La migration est réalisée avec un système de solvant qui permet la séparation des lipides neutres (TAG, DAG, MAG et Acides gras libres). STD = standards

Alors que cette protéine a tout pour être une TAG lipase impliquée dans l'hydrolyse des réserves, il n'a pas été possible de démontrer une différence dans la vitesse d'hydrolyse des réserves chez les plantes mutantes *attagl* par rapport aux plantes sauvages qui permettrait de démontrer ce rôle. Pourquoi n'est-il pas possible de démontrer ce rôle d'AtTAGL? Diverses hypothèses peuvent être émises pour répondre à cette question.

La plus évidente serait qu'AtTAGL n'intervienne simplement pas dans l'hydrolyse des réserves, mais dans ce cas, quel serait le rôle biologique d'une TAG lipase si elle n'agit pas sur les TAGs?

Il est possible qu'il existe des mécanismes de compensation par les autres lipases, à l'absence d'AtTAGL. Notamment, les lipases SDP1 et SDP1-like pourraient compenser cette absence, ainsi peut être que At3g14360 qui est exprimé, même si ce niveau est faible, pendant la croissance post-germinative. J'ai donc étudié l'expression de ces gènes dans le mutant AtTAGL pendant la croissance post-germinative.

3.5.8 Compensation possible à l'absence d'AtTAGL par une modification du profil d'expression d'autres lipases

Des couples d'amorces spécifiques ont été utilisés pour étudier l'expression des gènes codant pour SDP1, SDP1-like et At3g14360, ceci par RT-PCR quantitative. Pour ce faire, des ARNs ont été extraits de plantules de o à 7 jours après imbibition, chez le type sauvage et le mutant *attagl*. La Figure 3.29 page 119 présente les résultats obtenus.

Il faut dans un premier temps considérer les profils d'expression de ces gènes chez les plantes sauvages. En ce qui concerne SDP1, son profil



Figure 3.28 – Évolution comparée des acides gras totaux et de l'acide éïcosanoïque au cours de la croissance post-germinative

Le graphique A présente l'évolution générale de l'ensemble des acides gras au cours de la croissance post-germinative, tandis que le graphique B présente l'évolution de l'acide éïcosanoïque (20:1), acide gras représentant l'évolution spécifique des TAGs.

d'expression complet, au cours de la maturation de la graine puis des premiers jours après l'imbibition, est présenté dans la Figure 1.28 page 56. Le profil mesuré dans nos conditions semble correspondre en partie à celui décrit par Eastmond (2006) : l'expression diminue légèrement entre les jours 1 à 3 puis réaugmente ensuite. Le profil d'expression d'At3g14360 est lui aussi en accord avec les données présentées dans la Figure 3.13 page 93. L'ensemble de ces données est en accord avec des données publiées ou précédemment décrite.

Lorque l'on regarde l'expression des gènes SDP1, SDP1-like et At3g14360 chez les plantes mutantes *attagl*, seule une différence peut être notée au jour 1 mais celle-ci devra être confirmée car les barres d'erreur se chevauchent. Par contre, il apparaît très clairement une différence significative dans le cas de SDP1-like. En effet, en comparaison directe des niveaux de trancrits correspondants au gène SDP1-like, ce gène est clairement fortement surexprimé chez les plantes mutantes *attagl*. Au jour 1 après l'imbibition, la surexpression est 18 fois supérieure par rapport au même transcrit chez des plantes de type sauvage. Aux jours suivants, elle est 13, puis 9, puis 20, puis 7, puis 1 et enfin 16 fois le niveau d'expression est forte avant même qu'AtTAGL soit normalement exprimé 3.13 page 93.



Figure 3.29 – Évolution comparée des niveaux d'expression de différents gènes codant pour des lipases au cours de la croissance post-germinative

Le graphique A présente l'évolution comparée chez les plantes sauvages et mutantes de l'expression de SDP1. Les graphiques B, et C, de manière similaire, respectivement l'évolution de l'expression des gènes SDP1-Like et At3g14360.

Alors que chez des plantes sauvages, des transcrits AtTAGL ne sont pas détectables au jour 1, SDP1-like est déjà surexprimé à cette période chez les plantes mutantes *attagl*. Cet élément nous laisse penser qu'il pourrait exister une régulation épigénétique de l'expression de SDP1-like : si l'activité lipase est compensée avant l'apparition théorique d'AtTAGL, une liaison épigénétique antagoniste entre ces 2 gènes est envisageable. Pour les autres lipases, SDP1 et At3g14360, il semble qu'il existe des variations, mais elles doivent être confirmées.

Les activités lipases associées aux corps lipidiques, aussi bien pour les plantes sauvages que mutantes *attagl*, n'ont pas été testées à l'heure actuelle. Il est nécessaire de réaliser ce type d'expérience, afin de confirmer qu'il y a bien compensation de l'absence d'activité lipase AtTAGL par celle de SDP1-like. On peut espérer que le profil de l'activité lipase associée aux corps lipidiques suive celui des transcrits surexprimés de SDP1-like. Si cette compensation s'avère démontrée par ces tests d'activité lipase, on peut avoir une explication quant à l'absence de ralentissement de l'hydrolyse des TAGs chez les plantes mutantes *attagl*.

L'absence de différence d'hydrolyse des TAGs au cours de la croissance post germinative chez les plantes sauvages et mutantes *attagl* est donc peut être due à une compensation du manque de l'activité d'AtTAGL par SDP1-Like. Il est possible que l'expression de ces deux enzymes soit régulée de manière antagoniste par un mécanisme épigénétique. Il serait utile de générer des plantes double mutantes à la fois pour AtTAGL et pour SDP1like, dans le but de mettre en évidence un possible rôle d'AtTAGL pour la croissance post-germinative.

Conclusion

Bien qu'un ensemble d'éléments laisse penser qu'AtTAGL pourrait jouer un rôle majeur dans l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative, il n'a pas été mis en évidence de diminution de la vitesse d'hydrolyse chez les plantes mutantes par rapport aux plantes sauvages. Par ailleurs, aucune donnée ne permet de supposer qu'AtTAGL puisse jouer un rôle de DAG ou MAG lipase pendant la croissance postgerminative. Il est possible qu'il existe une compensation de l'absence d'AtTAGL chez les mutants *attagl* par d'autres lipases, notamment SDP1like qui est fortement surexprimée chez le mutant *attagl*. Cette compensation serait alors responsable de l'absence de phénotype des plantes mutantes *attagl*.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Sommaire

4.1	Conclusions		122
	4.1.1	AtTAGL est-elle une TAG lipase?	122
	4.1.2	AtTAGL intervient-elle dans l'hydrolyse de l'huile de ré- serve?	122
	4.1.3	Comment AtTAGL pourrait-elle intervenir dans l'hydro- lyse de l'huile de réserve?	123
	4.1.4	Si AtTAGL ne joue aucun rôle dans l'hydrolyse des lipides de réserve, à quoi pourrait-elle servir?	124
4.2	Perspectives		124
	4.2.1	Perspectives évidentes immédiates	124
	4.2.2	Perspectives à plus long terme	125
4.3	Нурот	rhèse	126

DANS ce chapitre, sont présentées les conclusions majeures de mon travail de thèse, suivies de perspectives à court et plus long terme. À la toute fin, une hypothèse particulièrement intéressante d'hydrolyse de l'huile de réserve en 2 temps pour la croissance post-germinative est présentée.

4.1 CONCLUSIONS

4.1.1 AtTAGL est-elle une TAG lipase?

Un ensemble de données laissent penser qu'AtTAGL code pour une TAG lipase. Ces éléments sont listés ci-dessous.

- AtTAGL est l'orthologue de la seule protéine d'un extrait de plantules de colza qui est capable de fixer de façon covalente un inhibiteur de lipases.
- L'activité attribuable à AtTAGL est sensible à la THL.
- AtTAGL présente une homologie forte avec des lipases identifiées : respectivement 52,1 % et 61,3 % de similarité avec RcOBL1, et CpLIP1.
- L'expression hétérologue de protéines recombinantes rAtTAGL chez Nicotiana benthamiana entraîne une activité lipase jusqu'à 130 fois supérieure à l'activité du contrôle négatif.
- L'activité lipase mesurée est réduite de 75 % chez les plantes mutantes *attagl* par rapport aux plantes sauvages, durant la croissance post-germinative.

Bien qu'une preuve absolue manque, c'est-à-dire la mesure de l'activité lipase à partir d'une protéine recombinante purifiée, les données résumées ci-dessus devraient être suffisantes pour démontrer qu'AtTAGL est une lipase. On ne peut cependant pas écarter l'hypothèse qu'AtTAGL soit un activateur d'une lipase préexistante à l'état inactif.

Chez les mammifères, ce type d'activateur est connue : CGI58 est un activateur de la lipase responsable de l'hydrolyse des TAGs intracellulaires. La mutation au locus de CGI58 entraîne un phénotype d'accumulation de l'huile (Lass et al. 2006). L'orthologue de CGI58 chez Arabidopsis présente l'élément manquant : une sérine catalytique, et est capable d'hydrolyser des TAGs (James et al. 2010).

L'utilisation de l'hôte *Nicotiana benthamiana* en tant que système d'expression hétérologue pourrait permettre l'expression puis la purification d'AtTAGL. L'étude *in vitro* de la protéine purifiée pourrait permettre de valider définitivement qu'AtTAGL est une TAG lipase.

4.1.2 AtTAGL intervient-elle dans l'hydrolyse de l'huile de réserve?

Différents éléments tendent à démontrer qu'AtTAGL est une TAG lipase impliquée dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance postgerminative. Ces éléments sont présentés ci-dessous :

- AtTAGL n'est exprimé fortement qu'au cours de la croissance postgerminative.
- Son profil d'expression est quasiment superposable au profil de la dégradation des TAGs au cours de la croissance post-germinative.
- Le promoteur d'AtTAGL est actif dans des zones qui contiennent des TAGs, et son activité correspond, au niveau temporel, à la dégradation des TAGs pour la croissance post-germinative.
- L'activité lipase majoritaire attribuable à AtTAGL est mesurée au cours de la croissance post-germinative, entre les jours 2 à 5 après

l'imbibition, moment ou la vitesse d'hydrolyse des acides gras est la plus élevée.

 AtTAGL est localisée au niveau des glyoxysomes, organites de la β-oxydation, de dégradation des acides gras libérés.

Non seulement ces éléments tendent à démontrer qu'AtTAGL est une TAG lipase, mais de plus, cette lipase possède toutes les caractéristiques pour être impliquée dans l'hydrolyse des réserves au cours de la croissance post-germinative.

Il n'a cependant pas été mis en évidence chez le mutant *attagl*, une vitesse d'hydrolyse des acides gras diminuée en comparaison avec les plantes sauvages. Il est probable qu'il existe une compensation au manque d'AtTAGL par la surexpression d'autres lipases.

Des données démontrent qu'il existe des mécanismes de compensation totale d'un gène par un autre. Par exemple, la phospholipide:DAG acyltransférase 1(PDAT1) participe à la synthèse de l'huile chez Arabidopsis mais son mutant contient autant d'huile que le type sauvage (Mhaske et al. 2005). En réalité, PDAT1 est essentielle pour la biosynthèse des TAGs, mais cela ne peut être mis en évidence que dans un mutant affectant la DAG:acyl-CoA acyltransferase 1 (DGAT1). Un double mutant *pdat1 dgat1* contient beaucoup moins d'huile que le simple mutant *dgat1*. DGAT1 est donc capable de compenser entièrement l'absence de PDAT1 dans le simple mutant *pdat1* (Zhang et al. 2009).

On ne peut exclure un cas similaire en ce qui concerne la mutation *attagl*.

4.1.3 Comment AtTAGL pourrait-elle intervenir dans l'hydrolyse de l'huile de réserve?

Si on compare l'activité lipase mesurée *in vitro* et la vitesse réelle d'hydrolyse des lipides et qu'on admette qu'AtTAGL est impliquée dans l'hydrolyse de l'huile, il est clair que l'activité attribuable seulement à AtTAGL est en excès par rapport à la lipolyse telle qu'elle se déroule *in vivo*.

On peut penser que les conditions *in situ* sont moins favorables à l'activité lipase que celles utilisées dans notre test et donc que l'activité spécifique réelle d'AtTAGL *in vivo* est nettement inférieure à celle que nous mesurons *in vitro*.

Une autre hypothèse serait que l'enzyme ait un accès limité à son substrat *in vivo*. Contrairement à SDP1 qui est localisée sur les corps lipidiques, nos résultats suggèrent qu'AtTAGL est localisée au niveau des glyoxysomes. L'existence d'accolements corps lipidiques-glyoxysomes peut expliquer l'hydrolyse. Néanmoins, on peut imaginer que seule une fraction d'AtTAGL est localisée au niveau de ces accolements et donc que seulement cette fraction peut avoir accès au substrat. Il est aussi possible que l'hémi-membrane qui recouvre l'huile soit une barrière freinant l'accès de l'enzyme à son substrat.

Malgré le fait qu'AtTAGL représente l'activité lipase majeure dans les jeunes plantules, elle est incapable de compenser la mutation *sdp1*. La notion d'accès d'AtTAGL à son substrat *in vivo* est donc une question cruciale pour comprendre sa fonction.

4.1.4 Si AtTAGL ne joue aucun rôle dans l'hydrolyse des lipides de réserve, à quoi pourrait-elle servir?

Les TAG lipases sont parfois capables d'hydrolyser d'autres substrats. Il est probable que les lipases de palme EgTAGL et de papaye CpLIP1 possèdent une activité phospholipase secondaire. Dans le cas de la lipase du latex de papaye CpLIP1, une fonction physiologique de phospholipase est plus plausible que celle d'une TAG lipase. AtTAGL pourrait alors avoir une fonction physiologique non liée à l'hydrolyse des lipides de réserve; il faut noter qu'il n'existe aucune piste quant à un autre rôle d'AtTAGL.

AtTAGL étant capable d'hydrolyser l'huile, une absence de fonction physiologique dans l'hydrolyse de l'huile implique une localisation distincte de celle de l'huile.

Afin d'identifier une activité *in vivo* qui n'est pas une activité lipase, la meilleure solution reste une étude exhaustive des lipides (possiblement via les techniques récentes de lipidomique) en comparant pour chaque espèce de lipide, leur quantité chez des plantes mutantes *attagl* et sauvages. L'exploitation de plantes surexpresseur peut s'avérer utile, tout comme les plantes aMiRNA qui pourraient confirmer l'éventuel phénotype. Les plantes de complémentation permettant de vérifier que la fonction biologique hypothétique *in vivo* est la bonne.

4.2 **PERSPECTIVES**

Un nombre important d'expériences peuvent être réalisées afin d'apporter des éléments de réponse aux questions précédemment posées.

4.2.1 Perspectives évidentes immédiates

La première chose à faire est à mon sens de vérifier la localisation glyoxysomale d'AtTAGL, via l'utilisation des lignées transformées de manière stable avec les constructions appropriées. Cette vérification peut aussi être réalisée par du fractionnement cellulaire. En effet, il est possible de "purifier" des glyoxysomes, et de vérifier si l'activité lipase leur est associée. La comparaison entre les plantes sauvages et mutantes *attagl* (voire surexpresseur) permettrait de distinguer des activités lipase dont AtTAGL n'est pas responsable. Il est possible de vérifier l'orientation d'At-TAGL dans la membrane des glyoxysomes "purifiés", par l'utilisation de protéases sur des glyoxysomes intacts, puis de réaliser des mesures de l'activité lipase.

Il serait intéressant de vérifier l'hypothèse selon laquelle des corps lipidiques purifiés de plantes au jour o ou 1 après imbibition ne sont pas hydrolysable par l'activité lipase soluble du jour 4 après imbibition. Cette expérience permettrait de valider l'hypothèse d'une hydrolyse en 2 temps : nécessité d'avoir hydrolyse par SDP1 (et SDP1 like) avant qu'AtTAGL ne puisse jouer son rôle.

L'utilisation de *Nicotiana benthamiana* en tant que système d'expression hétérologue peut permettre de produire des protéines recombinantes avec des étiquettes permettant sa purification (His₆ par exemple). Le but serait donc de caractériser en détail les propriétés biochimiques d'AtTAGL une fois sa purification réalisée. Il sera possible, par la même occasion de démontrer qu'AtTAGL est réellement une TAG lipase, via la création d'enzymes possiblement inactives via mutagenèse dirigée au niveau des acides aminés intervenants dans la triade site catalytique de cette enzyme. L'utilisation de la protéine P19 (supresseur de silencing) pourrait permettre d'augmenter la production de la protéine par rapport au système utilisé dans ces travaux (Voinnet et al. 2003).

Il y a nécessité de confirmer que l'absence d'activité lipase chez les plantes *attagl*, est bien due à l'insertion de l'ADN-T au niveau du promoteur de ce gène. L'utilisation des lignées aMiRNA s'avérerait utile. A l'opposé, l'utilisation des plantes mutantes surexpresseur permettrait de mettre en évidence une activité lipase augmentée, au niveau des feuilles par exemple. Il serait aussi utile de mesurer l'activité lipase dans les lignées de complémentation, pour confirmer que le défaut des mutant *attagl* dans l'activité lipase est réversible via l'expression d'AtTAGL dans ces lignées.

Dans le but de mettre en évidence une possible activité biologique autre que celle supposée dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post germinative, une analyse exhaustive de l'ensemble des lipides doit être réalisée au cours de la croissance post-germinative, en comparaison chez les plantes mutantes *attagl*, et les plantes sauvages. Si un élément nouveau est mis en évidence, il y a nécessité de le vérifié chez les différentes lignées générées.

Il est nécessaire de vérifier l'activité lipase associée aux corps lipidiques chez les plantes mutantes *attagl*, afin de confirmer au niveau de l'activité lipase, les mesures réalisées en RT PCRq, expliquant une possible compensation par SDP1 Like chez le mutant *attagl*. De plus, il y a nécessité de vérifier l'évolution des TAGs au cours de la croissance postgerminative chez des plantes mutantes doublement pour SDP1 Like et AtTAGL. En effet, l'absence de SDP1 Like pourrait mettre en évidence qu'il existe réellement une compensation chez les plantes *attagl*.

4.2.2 Perspectives à plus long terme

Il serait intéressant d'étudier plus en détail le promoteur d'AtTAGL pour mettre en évidence une régulation possible de l'expression de ce gène en rapport avec le métabolisme des sucres. Il est possible d'étudier *in silico* les promoteurs de l'ensemble des enzymes de la voie du catabolisme des TAGs, afin de mettre en évidence des séquences communes possibles de fixation à des facteurs de transcriptions.

Il serait possible, via l'utilisation de *Nicotiana benthamiana* en tant que système de production d'enzymes, de réaliser une expression, puis purification de l'ensemble des protéines de la famille élargie d'AtTAGL, afin de comprendre quels sont les éléments de ces lipases qui permettent leur adressage au corps lipidique, ou au glyoxysome, et quels sont les éléments qui définissent le pH optimum de ces lipases.
4.3 Hypothèse

Rôles respectifs de SDP1 et d'AtTAGL dans l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative

Si l'on considère que le profil de l'activité lipase est semblable à celui de la Figure 3.9 page 85, on peut donc estimer que les 2 premiers jours, il n'y a pas d'activité lipase. SDP1 est décrite dans la littérature comme étant la lipase qui contrôle l'hydrolyse des TAGs pour la croissance post-germinative. En effet, chez les mutants *sdp1*, l'hydrolyse des TAGs au cours de la croissance post-germinative est significativement réduite. Lorsque le profil d'expression de SDP1 est présenté, on se rend compte que cette lipase est majoritairement exprimée pendant la mise en place des réserves, la maturation de la graine et dans la graine sèche. L'expression de ce gène ne fait que diminuer à partir de ce point, et le niveau de ses transcrits semble nul pendant l'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative (voir Figure 1.28 page 56). Le profil d'expression de SDP1 ne correspond donc pas à celui de l'hydrolyse des TAGs au cours de la croissance post-germinative.

Comment est-il possible qu'une enzyme qui n'est pas exprimée pendant l'hydrolyse des réserves ait un impact aussi important sur l'hydrolyse des réserves ? La réponse à cette question n'est pas clairement définie, mais on peut cependant émettre quelques hypothèses. Le temps de demivie de SDP1 n'est pas connu. Il est envisageable de penser que l'enzyme SDP1 est synthétisée pendant la maturation de la graine. Dans ce cas, elle doit être localisée dans un compartiment qui n'est pas celui du stockage des réserves, ou elle doit être stockée sous forme inactive. En effet, il serait dommage d'hydrolyser les réserves pendant que la graine est en dormance. Au moment de la germination, il y a aurait un signal qui permettrait à SDP1 d'aller agir sur son substrat : les corps lipidiques. Dans ce cas, il n'y a pas nécessité de néosynthèse d'une lipase. Elle est déjà présente, et dès les premiers jours ou il y a nécessité d'hydrolyser les réserves, la lipase qui en est capable peut le faire. Il n'y a pas de latence à la demande. En réalité, en plus de SDP1, il existe son homologue SDP1-like qui agit de concert avec elle. Toujours est-il, bien que cette hypothèse soit réaliste, l'activité lipase liée à SDP1 et SDP1-Like ne semble pas correspondre au pic d'activité nécessaire pour la croissance post-germinative.

Le rôle de SDP1 et SDP1-like est cependant très clair et indiscutable. Ce sont des lipases qui agissent directement sur les corps lipidiques. On peut considérer qu'elles sont responsables d'environ 90 % de l'activité lipase associée à des corps lipidiques purifiés. Chez le double mutant de ces lipases, il n'y a quasiment pas d'hydrolyse des réserves pour la croissance post-germinative. Aussi importante qu'elles soient, en réalité, ces lipases ne sont responsables que d'une part très limitée de l'activité lipase totale, de l'ordre de 20 à 25 % environ. En effet, chez ces mutants, il existe toujours une activité lipase importante qui n'est pas associée aux corps lipidiques.

L'hydrolyse des réserves en 2 temps pour la croissance postgerminative

Le rôle tel que je l'imagine pour les lipases SDP1 et SDP1-Like est le suivant : on peut penser que ces lipases interviendraient dans un premier temps au niveau des corps lipidiques afin d'hydrolyser une première part des TAGs. Ce faisant, elles ouvriraient une voie, un trou, un accès, au niveau du corps lipidique qui permettrait ensuite à d'autres TAGlipases d'accéder à leur substrat. Cette hypothèse permettrait d'expliquer que SDP1 et SDP1-like soient les première lipases à devoir être présentes. Elle permettrait aussi d'expliquer pourquoi chez ces mutants, il n'y a pas d'hydrolyse ensuite (ou de compensation) : si elle ne sont pas présentes, ce passage vers le substrat dans les corps lipidiques ne peut pas être percé et dans ce cas, il n'y a simplement pas d'hydrolyse possible par les autres lipases qui n'ont pas accès à leur substrat. Il y a donc un phénotype d'arrêt de croissance post-germinative. SDP1 et SDP1-Like seraient donc des enzymes indispensables à la croissance post-germinative, et seraient des enzymes clé du contrôle de l'hydrolyse des réserves. Il est envisageable qu'un contrôle actif de leur activité entraîne un contrôle général de la voie du catabolisme des TAGs. Il est possible qu'il existe une interaction nécessaire entre SDP1 (ou SDP1-Like) et les protéines de surface des corps lipidiques (oléosines, caléosines, stéroléosines, ...), ou que ce type d'interaction permette un contrôle de l'hydrolyse ou de l'ouverture de la voie.

Il est possible de démontrer que cette hypothèse peut être vraie. Si on purifie des corps lipidiques de graines sèches, et en parallèle l'activité lipase de plantes au jours 4 après imbibition (correspondant en majorité à AtTAGL), il est possible de tester l'activité lipase sur ce substrat. Si l'activité lipase est nulle, des corps lipidiques intacts ne peuvent être un substrat pour la lipase AtTAGL. Dans ce cas, il y a nécessité d'avoir des corps lipidiques ayant été déjà modifiés. On peut réaliser la même expérience avec des corps lipidiques issus de 2 jours après l'imbibition (SDP1 a été démontrée présente est active sur les corps lipidiques dans ce cas), et si dans ce cas l'activité lipase de AtTAGL est plus rapide qu'un contrôle sans AtTAGL, il est probable qu'il existe la nécessité d'une activité lipase de SDP1 avant celle d'AtTAGL soit nécessaire pour qu'AtTAGL intervienne dans l'hydrolyse des réserves.

5

Matériel et Méthodes

Sommaire

= 4	É			
5.1	ETUDE	DE BIOINFORMATIQUE		
5.2	IVIATE.		132	
	5.2.1	Matériel végétal et conditions de culture	132	
	5.2.2	Souches bactériennes et milieux de culture	134	
	5.2.3	Souche de levure et milieu de culture	135	
5.3	Méth	ODES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	136	
	5.3.1	Extraction des acide nucléiques	136	
	5.3.2	Amplification d'acides nucléiques	137	
	5.3.3	RT-PCR quantitative	137	
	5.3.4	Clonages	139	
	5.3.5	Constructions moléculaires réalisées	142	
5.4	Méth	ODES D'ANALYSE DES LIPIDES	146	
	5.4.1	Matériel utilisé pour les extractions et analyses de lipides	146	
	5.4.2	Extraction de lipides de plantules d'Arabidopsis	146	
	5.4.3	Analyse globale de la quantité en acides gras	147	
	5.4.4	Séparation en chromatographie sur couche mince des es-		
		pèces moléculaires de lipides neutres	147	
5.5	Méth	ODES D'ANALYSE DES PROTÉINES	148	
	5.5.1	Quantification	148	
	5.5.2	Électrophorèse en conditions dénaturantes	148	
	5.5.3	Western Blot	149	
5.6	Mesu	RE DE L'ACTIVITÉ LIPASE	149	
0	5.6.1	Principe	149	
	5.6.2	Purification de la trioléine radiomarquée	150	
	5.6.3	Préparation de l'extrait pour la mesure de l'activité lipase	150	
	5.6.4	Mesure de l'activité lipase	150	
5.7	м́етн	ODE DE TRANSFORMATION DES PLANTES	151	
51	5.7.1	Transformation stable d'Arabidopsis thaliana par Agrobacte-	5	
	<i>J.</i> 7	rium tumefaciens	151	
	5.7.2	Transformation pour l'expression transitoire chez Arabi-	5	
	5.	dopsis thaliana	152	
	5.7.3	Transformation pour l'expression transitoire chez Nico-		
	-	tiana tabacum et Nicotiana benthamiana	152	
5.8	Obser	RVATIONS	152	
	5.8.1	Microscopie confocale	152	

CE chapitre présente le matériel et les méthodes utilisées pour mener à bien mon travail de recherche.

5.1 Étude bioinformatique

Le TAIR (The Arabidopsis Information Resource) est une ressource importante, et un grand nombre de données informatiques présentées en sont issues, soit directement, soit à partir des hyperliens présents sur son site internet. Le TAIR est accessible à l'adresse suivante : http://www.arabidopsis.org/. Les bases de données et sites internet utilisés sont accessibles aux adresses ci-dessous. Tous ces logiciels ont été utilisés avec leurs paramètres par défaut, sauf mention contraire.

- "TAIR GBrowse" accessible à l'adresse suivante :
 - http://gbrowse.arabidopsis.org/
- "TAIR SeqViewer Whole Genome View" accessible à l'adresse suivante :
 - http://www.arabidopsis.org/servlets/sv?action=closeup
- TAIR WuBLAST 2 :
- http://www.arabidopsis.org/wublast/index2.jsp
- Clustal W2 :
 - http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
- Aramemnon :
- http://aramemnon.uni-koeln.de/
- "Massively Parallel Signature Sequencing" accessible par ce lien : http://mpss.udel.edu/at/)
- "AtProteome" accessible à l'adresse suivante : http://fgcz-atproteome.unizh.ch/
- "Plant Promoter DB" accessible à l'adresse suivante : http://133.66.216.33/ppdb/cgi-bin/index.cgi
- "AthaMAP" accessible à l'adresse suivante :
- http://www.athamap.de/ Ici, le paramètre "Restriction to highly conserved binding sites (0-100)" est déclaré à 100 : uniquement les séquences 100 % homologues aux séquences connues sont mises en évidence. Le lien ci-dessus amène directement aux résultats associés.
 Description des facteurs de transcription :
- bZIP http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/family.php? fam=bZIP#family_intro
- et Dof http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/family.php? fam=Dof#family_intro
- Recueil de base de donnée des éléments en cis : http://www.arabidopsis.org/... tools/cis_element.jsp.
- Expasy :
- http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam.
 Phyre2:
 - http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi? id=index.
- 3DLigandSite :
 - http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite/.
- ProP :
- http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/
- "T-DNA Primer Design" : SALK.

5.2 MATERIELS BIOLOGIQUE

5.2.1 Matériel végétal et conditions de culture

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana, écotype Columbia-o (Col:o) a été utilisée pour cette étude en tant que plante sauvage. La lignée mutante *attagl* SALK_145591.48.50 dans le fond génétique Col:o, a été obtenue auprès du NASC (Alonso et al. 2003). Cette lignée, est une lignée de 3 ^{ème} génération issue de la transformation d'*Arabidopsis thaliana,* écotype Col:o, par *Agrobacterium tumefaciens* transformée avec le vecteur pROK2.

Identification d'une lignée homozygote pour l'insertion de l'ADN-T chez les plantes mutantes SALK_145591.48.50 Les amorces de PCR ont été choisies à l'aide de l'outil de design d'amorces "T-DNA Primer Design" du SALK.

3 PCRs sont réalisées sur de l'ADN génomique extrait des plantes à tester : une avec les amorces For/Rev, une avec For/LB et une avec RB/Rev. Un seul produit de PCR est obtenu avec le couple d'amorces For/Rev dans le cas des lignées homozygotes sauvages. C'est la même chose avec les couples For/LB et RB/Rev si les plantes sont homozygotes mutantes *attagl*. Pour les lignées hétérozygotes, tous les amplicons possibles sont produits.

Une fois les lignées mutantes homozygotes sélectionnées, les produits des réactions de PCR réalisées sont séquencés pour préciser le site exact d'insertion de l'ADN-T. Le nombre d'insertions indépendantes d'ADN-T n'a pas été vérifié dans la lignée *attagl*.

Amorce	Orientation	Séquence	Spécifique
For	sens	TTGATGTAACGCGGTGATCGAAT	génome plante
Rev	antisens	GACGGAAGTGATGTAAGGT	génome plante
LB	antisens	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	T-DNA
RB	sens	TTCCAAGATTGCCGTACGAT	T-DNA

Tableau 5.1 – Amorces utilisées pour identifier les plantes homozygotes mutantes *attagl*

Lignées générées En plus de ces 2 lignées sauvage et mutante de référence, différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* ont été générées dans le fond génétique Col:o.

Des plantes *AtTAGLpromoter*::GUS (promoteur du gène AtTAGL fusionné à la séquence codante de la β -glucuronidase dans le vecteur pKGWFS7) ont été générées pour les expériences de localisation tissulaire de l'activité du promoteur du gène AtTAGL (Karimi et al. 2002).

Des plantes surexpresseurs d'AtTAGL, grâce à l'utilisation du promoteur fort de type CaMV 35S, ont été générées par l'utilisation des vecteurs Gateway pK2GW7, et pK7WG2D (Karimi et al. 2002) par transformation par "floral dipping". Ces vecteurs ont aussi été utilisés pour générer des lignées de complémentation, en transformant des plantes mutantes *attagl*. Ces vecteurs ont été utilisés pour l'expression transitoire chez les plantes du genre Nicotiana.

Des plantes permettant l'expression de protéines recombinantes rAt-TAGL fusionnées à l'YFP (yellow fluorescent protein), en Cter et Nter, ont été générées par transformation avec agrobactéries contenant les vecteurs pH7WGY2 et pH7YWG2 (Karimi et al. 2002). L'expression de ces protéines est contrôlée par un promoteur fort de type CaMV 35S. Ces vecteurs ont aussi été utilisés pour générer des lignées de complémentation, en transformant des plantes mutantes *attagl*. Ces vecteurs ont été utilisés pour l'expression transitoire chez les plantes du genre Nicotiana.

Des plantes permettant l'expression de protéines recombinantes rAt-TAGL fusionnées à l'ECGFP (Enhanced cyan green fluorescent protein), en Cter, au milieu et en Nter ont été générées par transformation avec les vecteurs pH2GW7 (Karimi et al. 2002). À partir de ce vecteur contenant le promoteur fort CaMV 35S, a été réalisé une substitution de ce promoteur avec celui d'AtTAGL. Des plantes sauvages ont été transformées avec ces 6 vecteurs. Des plantes mutantes *attagl* ont aussi été transformées dans le but d'avoir des lignées de complémentation. Ces vecteurs ont été utilisés pour l'expression transitoire chez les plantes du genre Nicotiana.

Ces différentes lignées ont été sélectionnées pour leur résistance à l'antibiotique contenu dans la section du transgène inséré. Les études ont été réalisées des plantes de 3 ^{ème} génération.

Pour les expériences d'expression transitoire, des plants de tabac (*Ni-cotiana tabacum L.*) et *Nicotina benthamiana* de 3 à 4 semaines, cultivés à 22-24 °C, ont été utilisés.

Stérilisation des graines

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont systématiquement décontaminées en surface pendant 30 minutes en présence de 1 mL de chlore actif 2,5 % (v/v) et de Triton X-100 0,002 % (v/v). Elles sont ensuite rincées 3 fois dans un grand volume d'eau stérile avant d'être semées.

Milieux et conditions de culture

Les graines stérilisées sont semées dans des boites de Pétri contenant un milieu gélosé composé de 4,4 g.L ⁻¹ de milieu MS (Murashige et Skoog 1962), o,5 g.L ⁻¹ de 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) et 7 g.L ⁻¹ d'agar. Le milieu est tamponné à pH 5,8. Pour certaines expériences, 10 g.L ⁻¹ de saccharose a été ajouté au milieu. Une concentration variable d'antibiotique est ajoutée au milieu pour réaliser la sélection des différentes lignées transgéniques. Pour des plantes résistantes à la kanamycine, sa concentration finale dans le milieu de culture est de 35 μ g.mL ⁻¹. Pour les plantes résistantes à l'hydromycine, sa concentration finale dans le milieu de culture est de 20 μ g.mL ⁻¹.

Les boîtes sont ensuite placées au réfrigérateur à 4 °C pendant 4 jours afin de synchroniser la germination des graines et de lever leur dormance. La culture est ensuite effectuée dans une enceinte phytotronique à température, humidité et luminosité contrôlées : 21 °C, 60 % d'humidité, photopériode de 16 h / 8 h (jour/nuit) et 150 μ mol de photons.m²⁻¹.sec⁻¹. Alternativement, pour les premiers tests visant à vérifier les conditions de cultures, les conditions sont de 20 à 21 °C, 35 % d'humidité, photopériode de 16 h / 8 h (jour/nuit) et 100 μ mol de photons.m²⁻¹.sec⁻¹. Pour les plantules étiolés, les conditions sont exactement les mêmes que cette dernière, mais dans une boîte permettant l'obscurité totale.

Les plantes âgées d'environ 20 jours sont transférées en terre (mélange de tourbe blonde, vermiculite et perlite dans des proportions égales. Un dôme plastique est alors placé quelques jours au dessus des pots, pour maintenir une forte humidité.

Lorsque les siliques sont complètement sèches, les graines sont récoltées. Elles sont filtrées sur 2 tamis de taille différentes permettant d'éliminer les débris non désirés. Elles sont ensuite conservées dans des microtubes, percés à l'extrémité supérieure, qui sont placé dans des enceintes hermétiques en présence de dessiccant après avoir été annotés.

5.2.2 Souches bactériennes et milieux de culture

Souches d'Escherichia coli utilisées

Diverses souches ont été utilisées en tant que souches intermédiaires pour le clonage et l'amplification des plasmides. Il s'agit des souches suivantes :

- Top 10 (Invitrogen) de génotype F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^r) endA1 λ -
- XL1 blue MRF' (Stratagène) de génotype Δ(mcrA)183 Δ(mcrCBhsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]
- DH5α (Invitrogen) de génotype F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ8odlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_{K} - m_{K} +), λ -

Diverses souches ont été utilisées en tant que souches d'expression. Il s'agit des souches suivantes :

- BL21 (Stratagen) de génotype : B F- dcm ompT hsdS(r_B m_B -) gal [malB⁺]_{K-12}(λ^{s})
- BL21DE3 (Novagen) de génotype : F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
- BL21 (DE3) pLysS de génotype : F- ompT gal dcm lon hsd $S_B(r_B^- m_B^-)$ λ (DE3) pLysS(cm^r)
- BL21 (DE3) pLysE de génotype : F- ompT gal dcm lon hsd $S_B(r_B^- m_B^-)$ λ (DE3) pLysE(cm^r)
- BL21 Star(DE3) (aussi dénommée BL21*) de génotype : F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm rne131 (DE3)
- C41(DE3) (Avidis) de génotype : F- ompT gal hsdSB (r_B m_B -) dcm lon λ DE3 pLysS.

Souche d'Agrobacterium tumefaciens

La souche GV3101 C58C1 Rif^r a été utilisée comme vecteur de transformation pour générer des plantes *Arabidopsis thaliana* transgéniques, et pour la transformation en vue de l'expression transitoire chez les plantes *Nicotiana tabacum L.* et *Nicotiana benthamiana*. Elle possède le plasmide pM90RK qui contient les gènes de virulence Vir permettant l'insertion d'un ADN de transfert (ADN-T) dans le noyau des cellules végétales (Koncz et Schell 1986).

Milieu de culture

Toutes les souches bactériennes ont été cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB (Sigma)) (Bactotryptone 1 % (p/v), extrait de levure 0,5 % (p/v), NaCl 1 % (p/v)) en présence ou non d'antibiotiques à une température appropriée (37 °C pour E coli et 30 °C pour A tumefaciens) et sous agitation (220 rpm). Pour les milieux solides, 1,5 % (p/v) d'agar bactériologique a été ajouté. Les milieux sont stérilisés sans antibiotique à 121 °C pendant 20 minutes. Les antibiotiques sont stérilisés par filtration (0,20 μ m) et ajoutés au milieu adéquat à une température inférieure à 55 °C. Un document en annexe présente les méthodes de préparation des antibiotiques et les concentrations utilisées (voir A.3 page xii).

5.2.3 Souche de levure et milieu de culture

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est BY4741 (Brachmann et al. 1998). Son génotype est le suivant : MATa his $_{3\Delta 0}$ leu $_{2\Delta 0}$ met $_{5\Delta 0}$ ura $_{3\Delta 0}$.

Milieux de culture non inductible et inductible

Les levures sont cultivées à 30 °C sous agitation permanente (200 rpm), soit dans des milieux riches, soit dans des milieux synthétiques. Les milieux riches sont composés d'extraits de levure à 1 % (p/v) et de bactopeptone à 2 % (p/v) auxquels est ajoutée une source de carbone : glucose à 2 % (p/v) pour le milieu YPD.

Les milieux synthétiques sont composés de base azotée de levure sans acide aminé à 0,67 % (p/v), d'une source de carbone (sous forme de sucres variables 2 % (p/v)) et supplémentés avec les acides aminés essentiels exceptés ceux correspondant aux marqueurs d'auxotrophie. La concentration finale en acides aminés est de 100 mg.L⁻¹. 2 % (p/v) d'agar est ajouté pour les milieux solides. Les milieux sont stérilisés à 110 °C pendant 30 minutes.

Les levures transformées avec un plasmide contenant une construction ou le gène d'intérêt est sous contrôle d'un promoteur inductible au galactose (pYES2), sont cultivées dans des milieux non inductible et inductible. Pour le milieu non inductible, la source de carbone provient de raffinose à 2 % (p/v) et pour le milieu inductible, elle provient de galactose à 2 % (p/v).

Les levures transformées sont sélectionnées sur boîte ne contenant pas l'acide aminé dans le milieu, correspondant ua marqueur de sélection porté par le plasmide.

5.3 Méthodes de biologie moléculaire

5.3.1 Extraction des acide nucléiques

Extraction des ARNs totaux d'Arabidopsis thaliana

Les ARNs totaux d'*Arabidopsis thaliana* sont extraits à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen), selon les instructions du fabricant, sauf pour un élément : dans le tampon de resuspension RLC, 2 % (p/v) de PVPP insoluble a été ajouté. Les homogénats sont obtenus par broyage des extraits prélevés dans de l'azote liquide. Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique , les ARNs totaux ont été traités à la DNase I en utilisant le kit DNA-free (Ambion) selon les recommandations du fabricant. La quantité et la qualité des ARNs totaux extraits sont déterminées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm à l'aide d'un NanoDrop (Thermo).

Extraction d'ADN génomique d'Arabidopsis thaliana

L'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* est extrait selon une méthode adaptée d'Edwards et al. (1991). Une feuille est prélevée et plongée dans de l'azote liquide puis broyée pendant quelques secondes avec un micropilon dans un microtube. À ce broyat, 200 μ L de tampon d'extraction (Tris-HCl à 0,2 M pH 7,5; NaCl 0,25 M; EDTA 25 mM; SDS 0,5 % (p/v)) sont ajoutés. Après homogénéisation, l'échantillon est centrifugé 5 minutes à 17 000 g à température ambiante, puis 170 μ L de surnageant sont prélevés. Après ajout de 170 μ L d'isopropanol, l'échantillon est doucement mélangé à la main par inversements répétés du microtube. Il est laissé 5 minutes à température ambiante puis centrifugé pendant 5 minutes à 17 000g. Le surnageant est éliminé. Le culot est rincé à l'éthanol 80 %, puis séché à l'air, et enfin repris dans 50 μ L d'eau stérile.

Extraction d'ADN plasmidique d'Escherichia coli

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 2 à 5 mL de culture bactérienne en utilisant le kit « GenElute Plasmid Miniprep Kit » (Sigma) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique est élué dans 50 μ L d'eau stérile et dosé à l'aide d'un NanoDrop (Thermo).

Purification des fragments d'ADN obtenus par PCR ou par digestion

Les produits de PCR pour lesquels il y utilisation ensuite (ligation, séquençage) sont purifiés sur gel d'agarose. Les bandes contenants les fragments d'intérêt, sont découpés du gel. La purification des fragments d'ADN contenus dans ces portions de gel est réalisée à l'aide du kit « Quiaquick purification kit » (Qiagen) selon le protocole indiqué par le fabricant.

Electrophorèse des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est composé en général de 1 % (p/v) d'agarose dissous dans

du tampon TAE 1X (40 mM Tris ; 20 mM acétate de sodium pH 8,3 ; 1 mM EDTA) et aussi du bromure d'éthidium (BET) à 3 % (v/v) afin de visualiser les acides nucléiques sous UV. On ajoute 1 μ L de tampon de charge (0,05 % bleu de bromophénol ; 10 % glycérol) est ajouté à 5 μ L d'échantillon et le mélange est déposé dans un puits du gel d'agarose. Un marqueur de taille est toujours déposé sur le gel. Ces marqueurs permettent d'estimer par analogie, la taille des fragments d'intérêts.

Pour les ARNs, afin de vérifier leur qualité après extraction, 4 μ g d'ARNs totaux sont mélangés à 4 volumes de tampon de charge. Les migrations sont effectuées à 80 V dans du tampon TAE 1X. Les images des gels sont enregistrées et analysées (estimations des tailles des bandes d'intérêt) à l'aide de l'appareil d'acquisition d'image Image Quant 300 (GE Healthcare).

5.3.2 Amplification d'acides nucléiques

Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les amplifications d'ADN par PCR sont réalisées dans un thermocycleur Piko Thermal Cycler (Finnzyme). L'enzyme est choisie en fonction du devenir des amplicons.

Pour amplifier des fragments dans le but de les cloner, ou de les séquencer, une polymérase haute fidélité est utilisée : Phusion High-Fidelity DNA polymérase (Finnzymes). Pour les PCRs de contrôle (pour confirmer la présence des gènes cibles dans différentes constructions, pour la sélection de lignées de plantes ou de bactéries), une polymérase commerciale simple est utilisée : Phire II (Finnzymes).

Les amplifications sont réalisées selon les recommandations des fabricants des enzymes et avec les tampons fournis, aussi bien au niveau des concentrations en amorce, matrice, et autres tampons qu'au niveau des températures utilisées. Les éléments qui différent sont la température d'hybridation visée, spécifique à chaque couple d'amorces. Toutes les amorces sont conçues dans la mesure du possible pour être utilisable à une température d'hybridation de 58 à 60 °C, pour des raisons pratiques.

Synthèse d'ADNc à partir d'ARN totaux par transcription inverse

Les ADNc sont synthétisés à partir d'1 μ g d'ARNs totaux extraits. La synthèse est réalisée à l'aide du kit « SuperScript II Reverse Transcriptase » (Invitrogen) selon les recommandations du fabricants, avec les tampons associés et à partir d'amorces oligo dT.

5.3.3 RT-PCR quantitative

La mesure de la quantité des transcrits de différents gènes a été réalisée en essayant de suivre au maximum les recommandations publiées par Nolan et al. (2006).

Principe

La technique de RT-PCR quantitative (RT, transcription inverse) permet la quantification en temps réel du produit d'amplification PCR à partir d'une matrice constituée par des ADNc, représentants directs des transcrits au moment du prélèvement. Pour chaque réaction, un « cycle seuil » (Ct ou cycle Threshold) est déterminé. Il est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc cible présent dans l'échantillon avant amplification.

Conception des amorces utilisées en RT-PCRq

Il a été nécessaire, pour mesurer l'expression de certains gènes, de concevoir des amorces utilisable en RT PCRq. Pour certains autres gènes, des amorces utilisées dans des études ont parfois déjà été rendues publiques. Dans ce cas, ce sont ces amorces qui ont été utilisées.

Les séquences ayant servi de matrices à la sélection des amorces ont été obtenues sur le TAIR, et correspondent aux ADNc transcrits *in silico*. Les amorces sont conçues à l'aide du programme "Beacon Designer 7.70". Les paramètres sélectionnés pour définir les amorces sont la longueur du produit d'amplification (de 100 à 150 pb), la taille des amorces (de 18 à 27 bases), la température d'hybridation (allant de 58 à 62 °C), et le pourcentage en guanine et cytosine (de 50 à 80 %). Les amorces sont préférentiellement choisies pour générer des amplicons à cheval sur 2 introns afin d'éliminer un possible signal correspondant à l'ADN génomique. Les produits d'amplification proposés sont contrôlés *in silico* afin de vérifier l'absence de motifs susceptibles de se replier lors de la PCR quantitative. Le programme utilisé est accessible à l'adresse suivante : http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form.

Amorces utilisées pour la RT PCRq

Les différentes amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitative sont présentées dans le tableau 5.2 page ci-contre.

Ces amorces sont vérifiées avant leur utilisation, par mesure de la réponse face à une dilution sériée de matrice. En effet, pour une interprétation correcte des résultats, il est indispensable qu'elles suivent une réponse linéaire à la quantité de matrice.

Mélange réactionnel

Les réactions sont effectuées dans un volume final de 25 μ L. Le détail est le suivant : 12,5 μ L de mélange iQ SYBR green Supermix (Biorad), 0,25 μ M de chaque amorce et 2 μ L d'ADNc obtenus par transcription inverse dilués au 10ème.

Cycle de PCR

Les analyses sont été réalisées sur des triplicats. Le programme débute par une étape de 3 minutes à 95 °C pour l'activation de la TAQ polymérase. Viennent ensuite 40 cycles d'amplification de 30 secondes à 95 °C suivies de 30 secondes à 58 °C. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque

Gène	Orientation	Séquence	Publication
AtTAGL At1g45201	sens	TTTTGGAAAGGCGACGAGTA	Schoning et al. (2007)
0.10	antisens	TTTAACCGTCATTAGGGCAGA	Schoning et al. (2007)
AtTAGL (long)	Sens	GGAAAGGCGACGAGTACAAA	0
-	Antisens	AGAGTTCAAGCAATGAGGGC	
AtTAGL (court)	Sens	GACTTTGGTGAGTTTATGAAGGGT	
	Antisens	CCCAATAATTAGATAGAGGCTGATT	
At3g14360	sens	AACCCTTACGGTCTGCGTTA	
	antisens	CATTATCGGGTCCAAGCCTA	
SDP1 At5g04040	sens	AAATGGCTTACCGGAGGAAGTT	Eastmond (2006)
	antisens	TGAGCCCATTCCTCATAAGTCA	Eastmond (2006)
SDP1-like At3g57140	sens	GCTGAAGATTGGACTAGAT	
	antisens	GTGACAGTGATGCTATGA	
PP2AA3 At1g13320	sens	GCGGTTGTGGAGAACATGATACG	Hong et al. (2010)
	antisens	GAACCAAACACAATTCGTTGCTG	Hong et al. (2010)
eIF4A At3g13920	sens	CTGATTTTGACCCGTCGTCT	Bourdenx et al. (2011)
	antisens	AAGACAAACAACAAAGCCGAAT	Bourdenx et al. (2011)
ACTINE At1g49240	sens	CCGAGCAGCATGAAGATTAAG	Bourdenx et al. (2011)
	antisens	CATACTCTGCCTTAGAGATCCACA	Bourdenx et al. (2011)
At5g42930	sens	GAATGCACTGTGGGAGTTGA	
	antisens	CACCTACATCACCGAAACGA	
At1g56630	sens	ATTGCAACGACATGGTTCCT	
	antisens	GGAATCAACAATGCGACAAG	
At5g67050	sens	TTCCAAGATTGCCGTACGAT	
	antisens	CACCCTTCAACAACCATCCT	

Tableau 5.2 – Amorces utilisées pour les quantifications de l'expression des gènes en RT PCRq

Les amorces qui ne portent pas de référence bibliographique ont été conçue.

étape d'amplification. À la fin des cycles d'amplification, une courbe de fusion est réalisée : la température du milieu réactionnel est augmentée progressivement de 55 °C à 95 °C par palier de 0,5 °C. A chaque palier, la fluorescence est mesurée afin de vérifier notamment la présence de différents amplicons, mettant en évidence d'éventuelles contaminations.

Normalisation des résultats

Les résultats ont été traités et normalisés selon la méthode de « ge-Norm » (Vandesompele et al. 2002). Une feuille excel dédiée à cela mise en ligne par BioRad et nommée "Gene Expression Analysis for iCycler iQ Real-Time PCR Detection System" est utilisée. Les quantités relatives des échantillons sont normalisées à partir des quantités relatives des gènes constitutifs Actine et Eif4 (et PP2AA selon les cas). Pour une meilleure lisibilité des résultats, l'abondance relative des transcrits des différents échantillons est rapportée à une valeur arbitrairement fixé à 1 (de manière générale, la valeur la plus faible pour un gène).

5.3.4 Clonages

La portion d'ADN à cloner est amplifiée par PCR, soit à partir d'ADN génomique, soit à partir d'ADNc obtenus après transcription inverse.

Utilisation du système Gateway d'Invitrogen

La technologie GATEWAY permet le transfert rapide de séquences d'ADN dans de multiples vecteurs en les maintenant orientés dans le bon cadre de lecture. Cette technologie est basée sur les propriétés de recombinaison « site spécifique » du phage λ . Les fragments d'ADN d'intérêt bordés par les sites de recombinaison sont insérés dans des vecteurs contenant des sites de recombinaison compatibles par une réaction catalysée par les enzymes BP clonase ou LR clonase (Invitrogen).

La réaction de BP clonase est une recombinaison entre les sites attB bordant les fragments d'ADN amplifiés au préalable avec des amorces adéquates et les sites attP contenus dans le vecteur d'entrée pDONR221. Les amplicons obtenus par PCR et utilisés pour cette recombinaison sont purifiés sur gel avant leur utilisation.

Par la suite, le fragment d'intérêt présent dans le vecteur d'entrée pDONR221 peut être transféré dans n'importe quel vecteur de destination contenant les sites de recombinaison adéquats en mélangeant les deux plasmides en présence de LR clonase.

Les réactions de BP clonases et de LR clonases sont réalisées selon les recommandations du fournisseur, notamment en ce qui concerne les temps de réaction et les quantités de plasmide.

Amorces utilisées pour le clonage dans le système Gateway

Les amorces utilisées pour amplifier les fragments d'intérêt sont répertoriées dans le Tableau 5.3 page suivante.

Clonage sans utilisation du système Gateway

Insertion du gène d'intérêt dans un vecteur Le vecteur et l'insert sont digérés séquentiellement par les enzymes de restrictions appropriées selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs). Les digestions sont réalisées dans un mélange réactionnel de 50 μ L final composé de 1 à 3 μ g d'ADN, 5 U d'enzyme de restriction par μ g de vecteur, 1 X de tampon adéquat, et si nécessaire, de la BSA en quantité adéquat. Le mélange est incubé 1 h à 37 °C, puis les enzymes de restrictions sont inactivées à 65 °C pendant 20 minutes. La première digestion est contrôlée sur gel, puis la seconde, si nécessaire est réalisée selon le même processus.

Les extrémités 5' du vecteur sont ensuite déphosphorylées par action de la phosphatase alcaline (Biolabs) 0,05 U par μ g de vecteur pendant 1 heure à 37 °C. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 5 mM d'EDTA. Les fragments sont ensuite purifiés sur gel d'agarose et la quantité d'ADN ainsi que sa pureté ont été déterminées à l'aide d'un Nano Drop.

Les ligations sont réalisées dans un mélange réactionnel de 10 μ L. Le rapport entre les quantités d'insert et le vecteur de destination sont calculées en fonction des tailles de fragments, pour avoir un rapport molaire de l'ordre de 1 (si l'insert mesure 1000 pb et le vecteur ouvert 4500 pb, on mettre 4,5 fois plus de vecteur que d'insert en masse). C'est la quantité totale d'ADN utilisée qui permet de définir la quantité de ligase à utiliser. Le mélange réactionnel est réalisé selon les recommandations du fabricant et incubé 1 h à 37 °C. La ligation est utilisée pour la transformation des cellules par électroporation.

Cible	Orientation	Séquence	Remarque
AtTAGL promoteur AtTAGL promoteur	sens antisens sens antisens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGACCTGATTAGAAGCTTG GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCCTCACAATATGAAAGGAAGAA GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgagctcCGATGACCTGATTAGAAGCTTG GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTactagtATCCTCACAATATGAAAGGAAGAA	Sacl Spel
AtTAGL AtTAGLshort AtTAGLshorter AtTAGL AtTAGL	sens sens sens antisens antisens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGTCCAAAACCAATATGAAATTTT GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATCTTAAGTAAACCTTTTGC GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCAGGAAAGCTGGTCAA GGGGACCACTTTGTACAAAAAGCAGGGTTCAAGCAATGAGGGCAAG GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGCAATGAGGGCAAG GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGCAATGAGGGCAAG	sans codon stop, pour fusion Cter
ECGFP	sens antisens	ATGGACGAGCTGTACAAGCCACCGATGTCCAAAACCAATATG AAACTTGCCCTCATTGCTCCGGTCGCCACCATGGTG	
PCK1 promoteur	sens antisens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTctgcagGACTGTGAATTGAGATATCCAAG GGGGACCACTTTGTACAAGAAGCTGGGTaagcttCTCTTAACATAACCGGTGG I	Pstl (aMiRNA) HinDIII (aMiRNA)
Tableau 5.3 – Am Les séquences spéc CAAGAAAGCTG es vecteur utilisés. Les portions en m utilisées pour un cl	orces utilisée cifiques au syst GGT pour les a inuscules corre lonage "classiqu	s pour la réalisation des constructions dans le système Gateway ème Gateway sont : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT pour les amorces sens, et GG morces en antisens. Il y a nécessité d'ajouter 1 ou 2 bases dans certains cas pour que le cadre de lec spondent à des sites de restriction. Une fois amplifié puis cloné dans PDONR221, ces constructi ae".	GGACCACTTTGTA- cture soit correct avec tions sont digérées et

5.3.5 Constructions moléculaires réalisées

Vecteurs Gateway utilisés

La liste des vecteurs Gateway utilisés et la suivante :

- PDONR221, en tant que vecteur d'entrée. Chaque construction moléculaire générée a été cloné dans ce vecteur d'entrée à partir d'amplicons obtenus par PCR. Les amorces utilisées sont spécifiques de la portion d'ADN à cloner, et une section est ajouté en 5', spécifique et nécessaire à la recombinaison utilisée pour la réaction de BP clonase.
- pKGWFS7, en tant que vecteur de destination (Karimi et al. 2002). Dans ce vecteur a été cloné le promoteur d'AtTAGL, constitué des 2000 pb avant le site d'initiation de la traduction. Cette construction permet de mettre en évidence l'activité du promoteur. En aval du promoteur cloné, il y a sur ce vecteur, un gène codant pour la β-glucuronidase. Ce vecteur permet une transformation stable d'Arbidopsis avec la construction rapportrice de l'activité du promoteur (via floral dipping à partir d'Agrobacterium). L'activité du promoteur est suivie en histochimie par la mesure l'activité β-glucuronidase, chez les lignées d'Arabidopsis sélectionnées.
- pH7WGY2 et pH7YWG2, en tant que vecteurs de destination (Karimi et al. 2002). Ces vecteurs permettent l'expression avec un TAG YFP chez les plantes après transformation avec Agrobacterium. Le premier est le vecteur pH7WGY2 qui permet l'expression avec le TAG YFP en Nter du gène cloné et le second, pH7YWG2 l'expression du même TAG YFP en Cter du gène cloné. Le gène complet AtTAGL a été cloné dans ces vecteurs, et ces constructions ont été utilisée pour de la localisation *in vivo*. Différentes plantes ont été transformées, de manière transitoire : *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*. Différents génotypes d'Arabidopsis ont été transformés de manière stable : le fond génétique sauvage Col :o, et le fond génétique mutant *attagl*, dans un but de réaliser des lignées de complémentation.
- pH2GW7, en tant que vecteur de destination (Karimi et al. 2002). Il a été réalisé des fusions ECGFP-AtTAGL. Différentes constructions ont été réalisées : en Nter d'AtTAGL complète, ou au milieu, après le domaine linker et avant le domaine globulaire responsable de l'activité et enfin, ou en Cter d'AtTAGL. Ces différentes constructions ont ensuite été clonées dans ce vecteur de surexpression, ainsi que dans ce vecteur modifié dans lequel le promoteur 35s a été remplacé avec le promoteur d'AtTAGL(nommé pH2GW7promattagl). Ces 6 vecteurs ont servi, à de la localisation *in vivo*, et à générer des lignées mutantes stables d'Arabidopsis, de la même manière que pour les vecteurs pH7WGY2 et pH7YWG2.
- pHGW, en tant que vecteur de destination (Karimi et al. 2002). Ce vecteur ne contient pas de promoteur. Il a été utilisé pour permettre la transformation stable d'Arabidopsis avec la construction Promoteur PCK1-aMiRNA-terminateur NOS, au préalable cloné dans le vecteur PDONR221.
- pK2GW7 et pK7WG2D, en tant que vecteurs de destination (Karimi et al. 2002). Ces vecteurs sont des vecteurs qui permettent la surex-

pression chez les plantes. Ils ont été utilisés pour réaliser des lignées surexpresseur d'AtTAGL, et des lignées de complémentation pour les mutants *attagl* chez Arabidopsis par transformation stable. Ils ont aussi été utilisés pour de l'expression transitoire chez *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana*.

- PYES2GW, en tant que vecteur de destination. Ce vecteur est un vecteur pYES2 (Invitrogen) original modifié par l'insertion, dans le multisite de clonage, de la cassette Gateway permettant la recombinaison. Cette cassette en fait donc un vecteur de destination. Le vecteur PYES2 est un vecteur d'expression inductible au galactose pour la levure. Dans ce vecteur a été cloné, le gène complet AtTAGL, mais aussi les versions tronquées plus courte AtTAGLshort et AtTAGLshorter. AtTAGLshort est raccourcie des 70 premiers acides aminés. On élimine ainsi le segment qui correspondrait à l'adressage de la protéine. AtTAGLshorter est amputée des 104 premiers acides aminés d'AtTAGL, et dans ce cas, la protéine recombinante ne porterait plus, ni le segment d'adressage, ni le segment transmembranaire, responsable de l'ancrage de cette protéine.
- PDEST17 (Invitrogen) et Pet160-DEST (Invitrogen), en tant que vecteurs de destination. Ces vecteurs sont des vecteurs d'expression inductible à l'IPTG, chez *Escherichia coli*. Le premier permet l'expression du gène fusionné à un TAG *His*₆ en Nter, et le second selon un principe similaire, l'expression de plusieurs TAGs dont un *His*₆ en Nter du gène cloné. Les 3 fragments clonés sont AtTAGL complet, AtTAGLshort et AtTAGLshorter.

Création du aMiRNA

Ce travail de création du aMiRNA par PCR a été réalisé par Fabien Moretto durant son stage de Master 2. Des amorces spécifiques pour la réalisation du aMiRNA contre AtTAGL, ont été conçue par un outil bioinformatique en ligne dédié : http://wmd2.weigelworld.org/cgi-bin/ mirnatools.pl. Ces amorces sont présentées dans le tableau 5.4 page suivante. La matrice utilisée contient un miRNA endogène d'Arabidopsis : MIR319a. Le aMiRNA contre AtTAGL est réalisé en substituant la séquence de reconnaissance de MIR319a par la séquence dirigée contre AtTAGL. Cette substitution se fait par une succession de PCR, dont 2 étapes d'overlap PCR (voir Tableau 5.5 page suivante). La matrice pour les premières PCR est le plasmide pRS300 qui contient le miR319a dans un pBSK (cloné au site SmaI). La construction obtenue a été séquencée pour vérifier que la séquence réelle correspond à la séquence désirée.

L'aMiRNA a été cloné dans un vecteur pBluescript II KS+. Le terminateur est cloné aux sites SpeI/SacI. L'aMiRNA a été cloné ensuite aux sites BamHI/SaII. Ce le segement aMiRNA+terminateur a lui même été ensuite cloné dans le vecteur PDONR 221 contenant le promoteur PCK1, avec en Cter de cette séquence, un site de restriction adapté HindIII. L'orientation du aMiRNA a été contrôlée par PCR, et les souches présentant une orientation correcte ont été sélectionnées. Ce vecteur PDONR221 est considéré comme vecteur d'entré, et une réaction de LR a permis de cloner l'ensemble (promoteurPCK1+aMiRNA+terminateur) dans le vecteur pHGW.

Nom	Туре	séquence
А	Weigel	TATAATGAGAGTTCAAGCGAT
В	Weigel	GCGGAAACAATTTCACACAGGAAACAG
Ι	miR-sens	GATATAATGAGAGTTCAAGCGATTCTCTCTTTTGTATTCC
II	miR-antisens	GAATCGCTTGAACTCTCATTATATCAAAGAGAATCAATGA
III	miR*sens	GAATAGCTTGAACTCACATTATTTCACAGGTCGTGATATG
IV	miR*antisens	GAAATAATGTGAGTTCAAGCTATTCTACATATATATTCCT

Tableau 5.4 – Amorces utilisées pour la création du aMiRNA contre At-TAGL

PCR étape	Produit	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide antisens	Matrice
1	(a)	А	II	pRS300
2	(b)	Ι	В	pRS300
3	(c)	А	В	(a)+(b)
4	(d)	А	IV	(c)
5	(e)	III	В	(c)
finale	(f)	А	В	(d)+(e)

Tableau 5.5 – Principe des PCR successives pour la réalisation du aMiRNA

Fusion ECGFP AtTAGL

Les fusions ECGFP ont été réalisées par PCR chevauchantes. Les amorces utilisées, en plus de celles déjà décrites dans le Tableau 5.3 page 141 sont présentées dans le Tableau 5.6.

Nom	Туре	Orientation	Séquence
linker A	gène ECGFP	sens	ggaaagctggtcaagcctGTCGCCACCATGGTGAGC
linker B	gène ECGFP	antisens	gctcaccatggtggcgacaggcttgaccagctttcc
linker C	ECGFP gène	sens	ATGGACGAGCTGTACAAGcctgacaaatcttcggcg
linker D	ECGFP gène	antisens	cgccgaagatttgtcaggcttgtacagctcgtccat
linker 1	ECGFP stop gw	sens	aaacttgccctcattgctCCGGTCGCCACCATGGTG
linker 2	ECGFP stop gw	antisens	caccatggtggcgaccggagcaatgagggcaagttt
linker 3	start ECGFP	sens	ATGGACGAGCTGTACAAGccaccgatgtccaaaaccaatatg
linker 4	start ECGFP	antisens	catattggttttggacatcggtggcttgtacagctcgtccat

Tableau 5.6 – Amorces utilisées pour la création des fusions ECGFP At-TAGL

Les différentes PCRs ont été réalisées selon ce schéma : – gw - ECGFP AtTAGL - gw

1 ère PCR A ECGFP start GW + Linker 4 772 pb matrice : ECGFP B Linker 3 + stop at1g4501 gw 1493 pb matrice : AtTAGL 2 ème PCR C ECGFP start GW + stop AtTAGL gw 2223 pb matrice : mélange A+B

- gw - AtTAGL ECGFP - gw

1 ère PCR D start AtTAGL gw + Linker 2 1486 pb matrice : AtTAGL

```
E Linker 1 + ECGFP stop gw 780 pb matrice : ECGFP

2 ème PCR

F Start AtTAGL gw + Stop ECGFP gw 2230 pb matrice : mélange

D+E

- gw - At ECGFP TAGL - gw

1 ème PCR

G start AtTAGL gw + Linker B 386 pb matrice : AtTAGL

H Linker A + Linker D 762 pb matrice : ECGFP

J Linker C + stop AtTAGL stop gw 1154 pb matrice : AtTAGL

2 ème PCR

K start AtTAGL gw + Linker D 1111 pb matrice : G + H

M Linker A + Stop at1g4501 1880 pb matrice : H + J
```

```
3 ème PCR
```

```
Q start AtTAGL gw + Stop at1g4501 2229 pb matrice : K + M
```

Ces constructions ont été clonées dans le système Gateway puisqu'elles ont été réalisées avec les amorces adéquates.

Transformation de bactéries

Préparation de bactéries puis transformation par électroporation Cette technique est utiliser lorsque la quantité de plasmide est faible, par exemple après une ligation.

Pour obtenir des bactéries électrocompétentes, une préculture est réalisée dans 5 mL de milieu LB pendant une nuit sous agitation (200 rpm, avec antibiotique si nécessaire). Cinq cent mL de milieu LB sont ensemencés avec cette préculture et cultivés sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO mesurée à 600 nm de 0,6 pour *Escherichia coli* et 1,2 pour *Agrobacterium tumefaciens*. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées à 4 °C. Il s'agit d'une série de lavages du culot bactérien dans une solution de glycérol 10 % v/v (ou avec le dernier rinçage dans du DMSO 15 % dans le cas des agrobactéries) avec des volumes de solutions allant décroissants : 300, 100, 50 pour finalement obtenir 2 mL final. Ces bactéries sont aliquotées et immédiatement congelés à -80 °C.

La transformation des bactéries par électroporation est effectuée en utilisant l'appareil Gene Pulser II System (Bio-Rad). 40 μ L de bactéries électrocompétentes sont décongelés sur glace et une fraction de plasmide à transférer est ajouté. Le mélange est placé dans une cuve à électroporation (électrodes distantes de 0,1 cm). Le générateur a été réglé pour délivrer un pulse de 1250 V pendant quelques millisecondes (réglage à 25 μ F et 200 ohms). Après l'impulsion électrique, les bactéries sont immédiatement transférées dans 1 ml de milieu LB et ont été cultivées 1 heure sous agitation, à température adéquate.

Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte avec un antibiotique adapté pour sélectionner les transformants. L'efficacité de transformation des bactéries est mesurée en transformant les cellules avec 1 ng de vecteur pBluescrip SK II + et en étalant sur boîte une série de dilution. L'efficacité est de l'ordre de 10⁸ à 10⁹ transformants par μ g de plasmide. **Préparation de bactéries puis transformation par choc thermique** Cette technique est utilisée avec des plasmides issus de minipreps, et donc en quantité importante.

Pour obtenir des bactéries thermocompétentes, une précultureest réalisée dans 5 ml de milieu LB pendant une nuit sous agitation (200 rpm, avec antibiotique si nécessaire). La préculture permet d'ensemencer 500 mL de culture jusqu'à l'obtention d'une DO600nm de 0,6. Toutes les étapes ultérieures ont été réalisées à 4°C. Une série de lavages du culot bactérien dans une solution adaptée (PIPES 0,1 M; pH 6,7; MnCl₂ 1M; CaCl₂ 1M; KCl 1M) est réalisée. Les volumes vont en décroissant pour atteindre 4 mL final. Les bactéries sont aliquotées et immédiatement congelées à -80 °C.

La transformation a été effectuée en incubant la totalité du milieu réactionnel de ligation avec 70 μ L de bactéries thermocompétentes sur glace pendant 30 minutes. Les bactéries subissent alors un choc thermique pendant 1 minute à 37 °C. Après une incubation sur glace de 15 minutes, les bactéries sont reprises dans 1 mL de LB 1h à 37 °C sous agitation (200 rpm).

Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte avec un antibiotique adapté pour sélectionner les transformants. L'efficacité de transformation des bactéries est mesurée en transformant les cellules avec 1 ng de vecteur pBluescrip SK II + et en étalant sur boîte une série de dilution.

Stockage et conservation des souches bactériennes Les souches d'*Escherichia coli* sont stockées à forte densité cellulaire, à partir d'une culture liquide, dans du glycérol 10 % à -80 °C. Les souches d'*Agrobactérium tumefaciens* sont stockées de manière similaire, mais dans du DMSO 15 % à -80 °C.

Transformation de levure

Le protocole de transformation de levures est décrit en annexe : A.3 page xiii (Chen et al. 1992).

5.4 Méthodes d'analyse des lipides

5.4.1 Matériel utilisé pour les extractions et analyses de lipides

Le matériel utilisé pour les extractions et analyses de lipides (tubes, bouchons, cuves pour migration en CCM) est rincé 2 fois au chloroforme / méthanol (2 :1), dans le but d'éliminer toutes traces de lipides et d'éventuels contaminants. Il en est de même pour les bouteilles utilisées pour le stockage transitoire des solvants qui sont utilisés ensuite. Les plaques CCM sont pré-migrées avec un mélange chloroforme / méthanol (2 :1) afin d'éliminer toute trace d'éventuel contaminant. Il a toujours été utilisé du verre et jamais du plastique.

5.4.2 Extraction de lipides de plantules d'Arabidopsis

Les échantillons sont lyophilisés. Les plantules sont bouillies dans 1 mL de méthanol durant 10 min (65 °C). Deux mL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est alors broyé 3 fois 10 sec à l'ultraTurrax à 8000

rpm. Le fait de bouillir les plantules dans le méthanol permet l'inactivation des enzymes susceptible de cliver les lipides (lipases, phospholipases essentiellement). L'ajout de chloroforme permet une extraction classique selon Folch (Folch et al. 1957). Les tubes sont laissés une nuit à -20 °c, ce qui permet aux lipides de diffuser dans le solvant. On a ainsi une extraction totale des lipides même ceux restant dans les débris. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 15 min à 2200 rpm à 20 °c afin de culotter ces débris. La totalité est filtré sur de la laine de verre (préalablement lavée au chloroforme / méthanol 2 :1) et on leur ajoute un quart de volume de KCl 0,88 %. Une nouvelle centrifugation est réalisée afin d'accélérer le déphasage. La phase supérieure est éliminée, et la phase inférieure prélevée puis évaporée sous flux d'azote, à 50 °C. Les lipides sont repris dans 50 μ L de chloroforme et stockés à -20 °C. Cette fraction est appelée «extrait total lipidique».

5.4.3 Analyse globale de la quantité en acides gras

Cinq μ L de l'extrait total lipidique sont utilisés pour réaliser une transestérification. Cinq μ L correspondent à 1/10^{ème} de la totalité de l'extrait, soit l'équivalent de 2 graines analysées. Est ajouté, en tant que marqueur interne, une quantité connue d'acide margarinique C17, non naturellement présent chez Arabidopsis. Cette quantité est variable, en fonction des quantités attendues en AG dans les échantillons. L'objectif de cet ajout est de corriger des pertes éventuelles ainsi qu'une efficacité d'estérification inférieure à 100 %. Raisonnablement, l'ajout d'entre 10 % à 50 % en C 17 de la quantité d'AG estimés permet cette quantification de façon correcte, 25 % étant un choix arbitraire.

La trans-estérification est réalisée mL dans 1 de Méthanol/Toluène/Acide sulfurique (1 :0,3 :0,025 v :v :v). Le mélange est incubé 1 h à 80 °C dans un bain à sec puis après le refroidissement, on ajoute 1 mL d'hexane puis 1 ml de NaCl (0.9 %). Après agitation et centrifugation brève à basse vitesse qui accélère la décantation et la séparation des phases, la phase supérieure (hexane) est transférée dans un nouveau tube et est évaporée sous flux d'azote, à 50 °C. Les lipides sont repris dans 100 μ L d'hexane. Les échantillons sont alors analysés par chromatographie en phase gazeuse. On injecte 1 μ L d'échantillon sur la colonne (15 m, 0,53 mm de diamètre « carbowax » d'altech) utilisant de l'hélium comme gaz porteur à un débit de 9 mL.min⁻¹. La température du four est à 160 °C 1 min, puis monte à 190 °C à raison de 20 °C.min⁻¹ puis à 210 °C à 5 °C.min⁻¹. La détection des esters méthyliques en sortie de colonne est réalisée grâce à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Afin de repérer le temps de rétention des acides gras, un standard commercial est injecté au préalable.

5.4.4 Séparation en chromatographie sur couche mince des espèces moléculaires de lipides neutres

Les extraits lipidiques sont séparés et purifiés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice (HPTLC silica gel 60 F254, Merck). Pour cela, les extraits sont évaporés sous azote et repris dans 100 μ L de

chloroforme/méthanol (2/1; v/v). Ils sont ensuite déposés à l'aide d'un appareil de dépôt semi-automatique (Linomat IV, CAMAG).

La migration s'effecture avec un système de solvant approprié : Heptane / Ether / Acide Acétique (44 :36 :0,8 v :v :v) pour séparer les lipides neutres. Sur chaque plaque de CCM, des standards permettant l'identification des différentes espèces de lipides attendue sont déposés. Après migration et séchage, les plaques sont traitées pour une visualisation des lipides. Plusieurs sont possibilités sont offertes : Les plaques sont immergées dans une solution de primuline 0,01 % (p/v) dans une solution acétone/eau (8/2, v/v). Les lipides sont ensuite visualisés par exposition des plaques à 366nm.

Les plaques sont ensuite imprégnées d'une solution d'acétate de cuivre 3 % et d'acide phosphorique 8 %, et chauffées 30 minutes à 80 °C (Macala et al. 1983). La quantification des espèces lipidiques se fait par mesure de la densitométrie des pistes correspondantes.

Alternativement, les plaques peuvent être placées en présence de vapeurs d'iode dans une chambre hermétique.

5.5 Méthodes d'analyse des protéines

5.5.1 Quantification

La mesure de la quantité de protéine est établie selon la méthode utilisant le BCA (bicinchoninic acid). La mesure est réalisée selon le protocole du fabriquant du kit utilisé (Pierce). La concentration dans les extraits est évaluée par rapport à une gamme de concentration connue en BSA (albumine de sérum bovin).

5.5.2 Électrophorèse en conditions dénaturantes

La séparation des polypeptides en fonction de leur masse moléculaire est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS; technique SDS-PAGE (Laemmli et al. 1970).

Un cinquième de volume de tampon de charge 5X (Tris-HCl 150mM; pH 6,8; DTT 500mM; SDS 10 % (p/v); bleu de bromophénol 0,5 % (p/v); glycérol 60 % (v/v)) est ajouté aux échantillons à analyser. Les protéines sont dénaturées par chauffage à 90 °C pendant 5 minutes.

Le gel est composé de deux parties : un gel de séparation (Tris-HCl 375 mM; pH 8,8; acrylamide : N,N'-méthylène bisacrylamide (29 :1) 12 % (p/v); SDS 0,1 % (p/v)) surmonté d'un gel de concentration (Tris-HCl 125mM; pH 6,8; acrylamide : N,N'-méthylène bisacrylamide (29 :1) 4 % (p/v); SDS 0,1 % (p/v)). La polymérisation des gels est induite par l'ajout de 0,05 % (v/v) de TEMED et de 0,05 % (v/v) de persulfate d'ammonium. L'électrophorèse est effectuée à ampérage constant (10 à 30 mV par plaque selon l'épaisseur) pendant environ 1 heure dans un tampon Tris-HCl 25 mM; pH 8,3; glycine 192 mM et SDS 0,1 % (p/v).

Après migration, le gel est rincé 2 fois 3 min à l'eau ultrapure. Les polypeptides sont transférés sur membranes pour un Western Blot ou révélés en colorant le gel pendant une heure avec une solution composée de 0,04 % (p/v) de bleu de Coomassie R250, de 45 % (v/v) de méthanol et de 9 % (v/v) d'acide acétique puis en le décolorant une nuit dans une solution de décoloration (Ethanol 30 % (v/v), acide acétique 5 % (v/v)).

5.5.3 Western Blot

Un gel SDS-PAGE est réalisé. Après migration, le gel est rincé 2 fois 3 min à l'eau ultrapure. Le tampon de transfert est préparé pendant la migration des protéines dans le gel. Sa composition est la suivante : 100 mL de tampon de transfert 10X (Tris-base 250 mM, glycine 1,92M), 200 mL d'éthanol et 700 mL d'eau ultrapure. La membrane qui va recevoir les protéines est activée au Méthanol 1 min puis rincée à l'eau. Elle est ensuite placée quelques minutes dans le tampon de transfert, avec l'équipement nécessaire (feuilles, éponges, et casier d'assemblage). Le gel est placé sur la membrane. Les bulles entre gel et membrane sont éliminées en faisant pression sur l'ensemble avec une pipette pasteur. Le transfert est effectué à 4 °C. Le voltage utilisée pour le transfert est variable et est fonction du temps. L'intensité maximale est invariable et fixée à 90 mA. Si le transfert s'effectue sur la nuit les paramètres choisis sont les suivants : 30 v, 90 mA. Si le transfert s'effectue en 100 minutes, les paramètres sont les suivants : 90 v, 90 mA. Après le transfert, la membrane est rincée 1 h dans du TBS BSA 1 %. On effectue ensuite 4 rinçages dans du TBS Tween 0,05 %. L'anticorps primaire est ensuite appliqué 90 min dans du TBS (sa concentration varie selon son titre). On effectue un nouveau rinçage de 15 min dans du TBS Tween 0,05 %, puis 4 successifs de 5 min. L'anticorps secondaire est appliqué 30 min dans du TBS (sa concentration varie elle aussi selon son titre). On effectue un nouveau rinçage de 15 min dans du TBS Tween 0,05 %, puis 4 successifs de 5 min.

La révélation s'effectue en utilisant le kit ECL + (GE Healthcare). La membrane est placée une minute dans 5 mL de chacun des 2 réactifs, puis est rincée 1 min à l'eau ultrapure. Un film photographique est placé sur la membrane, selon un temps variable en fonction de l'intensité des bandes qui apparaissent. Le film est placé dans du révélateur, puis lorsqu'il a changé de couleur, est rincé à l'eau puis passe dans du fixateur et est de nouveau rincé à l'eau. Le film peut ensuite être étudié et permet de valider ou non le résultat attendu.

5.6 Mesure de l'activité lipase

5.6.1 Principe

C'est la trioléine marquée au ³H au niveau des acides gras qui est utilisée comme substrat. La réaction enzymatique est mesurée suivant un protocole qui ressemble à celui utilisé pour la mesure de l'activité lipase de colza. De la trioléine radiomarquée est d'abord diluée dans de la trioléine froide, afin que le substrat soit en large excès. L'ensemble est dissous dans de l'alcool, à la limite de solubilité. Une émulsion est réalisé en injectant à la seringue, un volume donné de la trioléine dissoute dans l'éthanol (1,5 % d'huile), en vortexant : une émulsion est formée. C'est sur cette émulsion, qu'est ajoutée l'extrait dont on veut mesurer l'activité (Belfrage et Vaughan 1969). Il est prélevé un aliquot à différents temps. Cet aliquot est placé dans un système de solvant, ce qui va stopper la réaction et permettre de séparer les acides gras libérés des TAGs non hydrolysés. La phase contenant les acides gras libéré est dissoute dans du liquide de scintillation et les fioles placées à compter dans un compter à scintillation. On mesure donc les mols d'acide gras libérées à différents temps. On peut ainsi calculer la vitesse d'activité lipase maximale à pH 7,5, dans l'extrait testé.

5.6.2 Purification de la trioléine radiomarquée

Afin de limiter le bruit de fond lors des mesures, la ³H trioléine est purifiée. Effet, il est possible que les conditions de stockage amènent à une hydrolyse spontanée des acides gras, générant donc du bruit de fond (ce sont les les acides gras libérés qui sont quantifiés). La trioléine tritiée est préalablement purifiée par chromatographie sur couche mince de silice en utilisant le système de solvant Heptane / Ether / Acide Acétique (44 :36 :0,8 v :v :v). Elle est ensuite solubilisée et stockée au congélateur avant utilisation.

5.6.3 Préparation de l'extrait pour la mesure de l'activité lipase

Le matériel biologique est broyé dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est homogénéisée. La suite de la manipulation est réalisée à entre o et 4 °C. Cet homogénat est repris dans un tampon 40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl à pH 7,5 (10 ml de solution par gramme de tissu). Une première centrifugation à basse vitesse est réalisée pour éliminer les débris cellulaires. Une seconde à 15 000 g pendant 30 minutes suit. On prélève alors la phase inférieure, en évitant la couche huileuse (dans le cas des graines et plantules). C'est cette phase, qui ne correspond donc pas aux corps lipidiques qui est testée. La concentration en protéines dan cet extrait est mesurée.

5.6.4 Mesure de l'activité lipase

Le substrat radioactif est dispersé dans le milieu d'incubation qui contient 40 mM Tris-HCl pH7,5, CaCl₂ 20mM, Taurodéoxycholate de sodium 4 mM, BSA100 μ g.mL⁻¹. Cette étape se fait en vortexant, dans le but de créer une émulsion. La quantité finale en trioléine est de 300 μ M à une radioactivité spécifique de 0,1 à 0,5 mCi/mmol. La concentration finale de protéines (extrait à tester) dans le test est d'environ 50 μ g.mL⁻¹. Le mélange est incubé à température ambiante et des aliquots sont prélevés à différents temps (toutes les 5 minutes pendant 30 minutes). Un aliquot de 60 μ L est mélangé avec 107 μ L d'une solution de 150 mM NaOH et 150 mM NaCl et avec 1 ml de solvant (méthanol/heptane/chloroforme, 1, 41/1/1, 25). Dans ces conditions, la totalité des TAGs reste dans la phase organique tandis que 80 % des acides gras libérés sont dans la phase aqueuse. Après séparation des phases par centrifugation, on prélève alors des aliquots de la phase aqueuse. Il sont dans des fioles à scintillation contenant 3 mL de mélange scintillant Hionic Fluor (Packard) et la radioactivité déterminée dans un compteur à scintillation Beckman LS1801. L'activité spécifique est exprimée en unités internationales (1 UI = 1 μ mole d'acides gras libérée

par minute). Les cinétiques sont linéaires dans le cas des mesures faites à partir d'extraits d'arabidopsis, et de nicotania pendant au moins trente minutes. Les activités sont toujours calculées à partir des vitesses initiales. A chaque mesure d'activité, une mesure sur contrôle positif (lipase commerciale de *Candida rugosa* afin de s'assurer que la mesure est correcte.

Enrichissement de l'activité de la fraction soluble par centrifugation

Afin de vérifier que l'activité lipase mesurée chez Arabidopsis présente un comportement similaire à celle de BnTAGL, un extrait de 4 jours a été soumis au même traitement en terme de centrifugation. Il s'agit de d'une ultracentrifugation d'1 heure à 339 ooog (rotor S100-AT6, le facteur de centrifugation K est alors de : K = 32,9). Cette centrifugation ne correspond pas à la fraction dite microsomale.

Inhibition de la THL

La quantité molaire de lipase dans l'extrait a été grossièrement estimée en considérant une taille de 50 kDa et une activité spécifique de la protéine pure de 3000 μ mol.min⁻¹.mg⁻¹, pour un extrait d'Arabidopsis sauvage au jour 4. Il a été incubé sur glace pendant 30 minutes, cet extrait avec de la THL en rapport molaire supérieur de 100 (équivalent à 4 μ M final dans le tampon d'inhibition). L'activité lipase a ensuite été mesuré en parallèle.

5.7 Méthode de transformation des plantes

5.7.1 Transformation stable d'Arabidopsis thaliana par Agrobacterium tumefaciens

La transformation stable des plantes d'Arabidopsis thaliana est réalisée par « Floral dipping » (Clough et Bent 1998). Une préculture de 2 mL d'une souche d'Agrobacterium tumefaciens sélectionnée et porteuse d'un plasmide d'intérêt pour la transformation est réalisée sur une nuit, à 30 °C, sous agitation à 180 rpm. Le lendemain, 40 mL d'une solution d'infiltration (saccharose 10 % (p/v), Silwett L77 à 0,05 % (v/v)) sont ajoutés à la culture. Les parties aériennes des plantes d'Arabidopsis thaliana (non arrosée depuis quelques jours) présentant des bourgeons floraux, sont immergées 30 secondes à 1 minute dans la solution d'infiltration contenant les agrobactéries. Un film plastique est placé autour des plantes pendant 24 heures pour maintenir un taux d'humidité élevé. Cette opération a été réitérée une seconde fois à 2 semaines d'intervalle afin d'augmenter la quantité de graines transformées. Les plantes ont été ensuite cultivées jusqu'à la formation des graines. Les graines issues des plantes transformées sont récoltées et les lignées transformées sont sélectionnées sur milieu gélosé contenant l'antibiotique approprié.

Sélection des plantes transformées par « floral dipping »

Les plantes sont sélectionnées sur milieu contenant l'antibiotique approprié. Les graines de chaque plante indépendante sont récoltées séparément et mise à pousser sur un milieu de culture classique (1/2 MS) additionné de saccharose 1 % et d'antibiotique approprié pour la sélection. Les nouvelles générations sont également semées sur un milieu de sélection jusqu'à l'obtention d'une lignée homozygote, c'est à- dire d'une lignée dont 100 % de la descendance est résistante.

5.7.2 Transformation pour l'expression transitoire chez Arabidopsis thaliana

La méthode est celle publiée par Marion et al. (2008). Cette méthode utilise des plantules à 7 jours après imbibition, mis en présence d'agrobactéries contenant la construction à insérer puis est soumis à un vide. Les plantules sont ensuite mis à pousser en conditions normales puis l'observation au microscope confocal est réalisé 4 jours après.

5.7.3 Transformation pour l'expression transitoire chez *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana*

L'agro-infiltration dans des feuilles de *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* est réalisée selon la méthode (Batoko et al. 2000). Le protocole utilisé est présenté en annexe A.3 page xiv. Les *agrobactéries* transformées avec les plasmides utilisés sont cultivées jusqu'en fin de phase exponentielle et sont resuspendues dans un volume de tampon d'infiltration (MES 50 mM; Na₃PO₄ 2 mM; glucose 0,5 % (p/v); acétosyringone 100 μ M; pH 5,6) jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,1 dans le cas de *Nicotiana benthamiana* et 0,05 dans le cas de *Nicotiana tabacum*. Chaque suspension bactérienne a été infiltrée sur la face inférieure de différentes feuilles matures (au stade 6-8 feuilles matures) à l'aide d'une seringue sans aiguille. Des zones infiltrées de 3 à 6 cm² ont été obtenues et repérées à l'aide d'un marqueur.

5.8 **Observations**

5.8.1 Microscopie confocale

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal LEICA TCS SP2 avec AOBS (laser Argon : 458, 476, 488, 514 nm, He-Ne vert : 543 nm, He-Ne rouge : 633 nm, diode UV : 405 nm), équipé d'une caméra SPOT RT-KE SLIDER. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Leica LAS AF Lite.

ECGFP et YFP

L'observation simultanée des sondes fluorescentes ECGFP et YFP nécessite une sélection rigoureuse des filtres pour discriminer les deux signaux de fluorescence lors de l'observation au microscope confocal. Effectivement, les spectres d'émission et d'excitation de ces deux chromophores sont très proches. L'YFP est excitée à 514 nm et la fenêtre de détection de son émission de fluorescence est entre 530 et 550 nm. Pour l'ECGFP, l'excitation est réalisée à 488 nm et la fenêtre de détection est plus étroite entre 490 et 500 nm. Il est contrôlé manuellement, en excitant séquentiellement les fluorophores l'un après l'autre, que l'émission de l'ECGFP n'excite pas l'YFP. Toutes les prises de vue sont réalisées uniquement lorsque ce la est vérifié.

Rouge de nile

Le rouge de Nile (Nile red, Nile Blue A Oxazone) est un colorant fluorescent utilisé pour visualiser les lipides neutres et polaires. Il permet de mettre en évidence les corps lipidiques. Il est dissous à 1 mg par mL dans du DMSO et est conservé à l'abri de la lumière.

Il est dillué à 1 à 5 ng par mL dans de l'eau dans laquelle sont placées les plantules (dans un microtube). Le temps d'incubation est de 15 minutes, et les plantules sont rincées par plusieurs passages dans de l'eau distillée. Pour visualiser les lipides non polaires, l'excitation se fait à 460 nm et la visualisation vers 535 nm (Li-Beisson et al. 2010).

5.8.2 Loupe binoculaire

Marquage histochimique GUS (β -glucuronidase)

Afin de déterminer le profil d'expression du promoteur du gène d'intérêt At1g78690 chez *Arabidopsis thaliana*, des tests histochimique GUS ont été réalisés sur différents organes de plantes transgéniques transformées par « floral dipping » via *Agrobacterium tumefaciens* porteur du plasmide pKGWFS7 contenant le promoteur du gène d'intérêt AtTAGL. Dans ce promoteur ont été clonées les 2 000 pb avant le site d'initiation de la traduction, correspondant de ce fait au promoteur d'AtTAGL.

Les tissus à analyser sont incubés 20 minutes à 4 °C dans de l'acétone 90 % (v/v) puis rincés par 3 lavages successifs avec du tampon phosphate 100 mM (Na₂HPO₄,12H₂O 170mM; NaH₂PO₄ 30 mM; pH 7). 1 mL de tampon de réaction (phosphate 100 mM; X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide) 1 mM; potassium ferricyanide 0,5 mM; potassium ferrocyanide 0,5 mM; Triton X-100 0,5 % (v/v)) a été ajouté. La réaction a été effectuée à 37 °C jusqu'à la coloration des tissus (environ 24 heures). La réaction est stopée en rinçant les échantillons avec une solution de tampon phosphate 100 mM 3 fois. Les tissus sont ensuite traités avec une solution d'éthanol à 70 % pour éliminer la chlorophylle potentiellement présente dans nos échantillons. Les tissus sont conservés à 4 °C dans de l'éthanol 70 % si l'observation n'est pas immédiate. L'observation des tissus et l'acquisition des images ont été effectuées avec un stéréomicroscope LEICA MZ FL III équipé d'une caméra numérique LEICA (model DC 300F).

Marquage histochimique au Fat red B

Le colorant Fat red B (Sudan Red 7B) est un colorant lipophile qui peut être utilisé pour mettre en évidence les corps lipidiques en utilisant un système aqueux (Brundrett et al. 1991).

La solution de coloration est au final constituée à 0,1 % (p/v) de Fat red B. La procédure pour l'obtenir est la suivante : dissoudre 50 mg de colorant dans 25 mL de PEG-300. Incuber 1 heure à 90 °C et laisser refroidir. Les tissus à colorer sont noyés dans cette solution pendant 1 h à une nuit. Il y a nécessité de rincer les tissus avant de les observer à la loupe binoculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- S. Abdelkafi, H. Ogata, N. Barouh, B. Fouquet, R. Lebrun, M. Pina, F. Scheirlinckx, P. Villeneuve, et F. Carrière. Identification and biochemical characterization of a gdsl-motif carboxylester hydrolase from carica papaya latex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(11) :1048–1056, 2009. (Cité pages 39 et 51.)
- C.C. Akoh, G.C. Lee, Y.C. Liaw, T.H. Huang, et J.F. Shaw. Gdsl family of serine esterases/lipases. *Progress in lipid research*, 43(6):534–552, 2004. (Cité page 51.)
- J.M. Alonso, A.N. Stepanova, T.J. Leisse, C.J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D.K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of arabidopsis thaliana. *Science*, 301(5633) :653, 2003. (Cité pages 6, 54, 108 et 132.)
- S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, et D.J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3) :403–410, 1990. (Cité page 71.)
- G.I. Arabidopsis. Analysis of the genome sequence of the flowering plant arabidopsis thaliana. *Nature*, 408(6814):796, 2000. (Cité page 6.)
- K. Baerenfaller, J. Grossmann, M.A. Grobei, R. Hull, M. Hirsch-Hoffmann, S. Yalovsky, P. Zimmermann, U. Grossniklaus, W. Gruissem, et S. Baginsky. Genome-scale proteomics reveals arabidopsis thaliana gene models and proteome dynamics. *Science*, 320 (5878):938, 2008. (Cité page 74.)
- P. Barbier et F. Schneider. Syntheses of tetrahydrolipstatin and absolute configuration of tetrahydrolipstatin and lipstatin. *Helvetica chimica acta*, 70(1):196–202, 1987. (Cité page 39.)
- H. Batoko, H.Q. Zheng, C. Hawes, et I. Moore. A rab1 gtpase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *The Plant Cell Online*, 12(11) :2201, 2000. (Cité page 152.)
- S. Baud, B. Dubreucq, M. Miquel, C. Rochat, et L. Lepiniec. Storage reserve accumulation in arabidopsis : metabolic and developmental control of seed filling. *The Arabidopsis Book*, 6(1) :1–24, 2008. (Cité pages XIII, 7 et 8.)
- S. Baud et L. Lepiniec. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research*, 49(3) :235–249, 2010. (Cité pages XIII, 8 et 12.)
- S. Baulande et C. Langlois. Les proteines a domaine patatine. *medecine/sciences*, 26(2) : 177–184, 2010. (Cité page 35.)
- T. Beeckman, R. Rycke, R. Viane, et D. Inzé. Histological study of seed coat development in arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Research*, 113(1110) :139–148, 2000. (Cité page 15.)
- HD Beer, G. Wohlfahrt, JEG McCarthy, D. Schomburg, et RD Schmid. Analysis of the catalyic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein engineering*, 9(6) :507, 1996. (Cité pages XIV, 35 et 36.)
- F. Beisson, N. Ferté, S. Bruley, R. Voultoury, R. Verger, et V. Arondel. Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1531(1-2) :47–58, 2001. (Cité page 50.)
- F. Beisson, A. Tiss, C. Rivière, et R. Verger. Methods for lipase detection and assay : a critical review. *European journal of lipid science and technology*, 102(2):133–153, 2000. (Cité page 37.)

- E. Beitz. Texshade : shading and labeling of multiple sequence alignments using latex2e. *Bioinformatics*, 16(2) :135, 2000a. (Cité pages 64, 65, 66, 71 et 72.)
- E. Beitz. Textopo : shaded membrane protein topology plots in latex2*ɛ*. *Bioinformatics*, 16 (11) :1050, 2000b. (Cité page 79.)
- P. Belfrage et M. Vaughan. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *Journal of Lipid Research*, 10(3):341, 1969. (Cité pages 37 et 149.)
- L. Bentsink et M. Koornneef. Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book*, 6(1) : 1–18, 2008. (Cité pages XIII, 15, 16 et 17.)
- G. Benzonana et P. Desnuelle. Etude cinetique de l'action de la lipase pancreatique sur des triglycerides en emulsion. essai d'une enzymologie en milieu heterogene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 105(1) :121–136, 1965. (Cité page 32.)
- J.D. Bewley. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9(7):1055, 1997. (Cité page 15.)
- B. Borgstrom. Mode of action of tetrahydrolipstatin : a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 962(3) :308–316, 1988. (Cité pages 38 et 39.)
- B. Borgstrom et C. Erlanson. Pancreatic lipase and co-lipase. *European Journal of Biochemistry*, 37(1):60–68, 1973. (Cité page 38.)
- B. Bourdenx, A. Bernard, F. Domergue, S. Pascal, A. Léger, D. Roby, M. Pervent, D. Vile, R.P. Haslam, J.A. Napier, et al. Overexpression of arabidopsis eceriferum1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 156(1):29, 2011. (Cité page 139.)
- C.B. Brachmann, A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, et JD Boeke. Designer deletion strains derived from saccharomyces cerevisiae s288c : a useful set of strains and plasmids for pcr-mediated gene disruption and other applications. *YEAST-CHICHESTER-*, 14 :115–132, 1998. (Cité page 135.)
- L. Brady, A.M. Brzozowski, Z.S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J.P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. 1990. (Cité page 32.)
- C. Bréhélin, F. Kessler, et K.J. Van Wijk. Plastoglobules : versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in plant science*, 12(6) :260–266, 2007. (Cité page 45.)
- D.J. Brick, M.J. Brumlik, J.T. Buckley, J.X. Cao, P.C. Davies, S. Misra, T.J. Tranbarger, et C. Upton. A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize. *FEBS letters*, 377(3) :475–480, 1995. (Cité page 51.)
- H. L. Brockman. Triglyceride lipase from porcine pancreas : Ec 3.1.1.3 triacylglycerol acylhydrolase. *Methods in Enzymology*, 71 :619 – 627, 1981. (Cité page 37.)
- M.C. Brundrett, B. Kendrick, et C.A. Peterson. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7b or fluoral yellow o88 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, 66(3) :111–116, 1991. (Cité pages 99 et 153.)
- AM Brzozowski, U. Derewenda, ZS Derewenda, GG Dodson, DM Lawson, JP Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, SA Patkar, et L. Thim. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351(6326) : 491–494, 1991. (Cité page 35.)
- A.M. Brzozowski, H. Savage, C.S. Verma, J.P. Turkenburg, D.M. Lawson, A. Svendsen, et S. Patkar. Structural origins of the interfacial activation in thermomyces (humicola) lanuginosa lipase. *Biochemistry*, 39(49) :15071–15082, 2000. (Cité pages 76 et 77.)

- L. Bulow, Y. Brill, et R. Hehl. Athamap-assisted transcription factor target gene identification in arabidopsis thaliana. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2010, 2010. (Cité page 74.)
- F. Carrière. Soixante ans de recherche sur la lipolyse enzymatique des corps gras à marseille. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 15(3):196–207, 2008. (Cité pages XIII, 33 et 35.)
- C. Carter, S. Pan, J. Zouhar, E.L. Avila, T. Girke, et N.V. Raikhel. The vegetative vacuole proteome of arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell Online*, 16(12) :3285, 2004. (Cité pages 81 et 83.)
- H. Chahinian, T. Snabe, C. Attias, P. Fojan, S.B. Petersen, et F. Carrière. How gastric lipase, an interfacial enzyme with a ser-his-asp catalytic triad, acts optimally at acidic ph. *Biochemistry*, 45(3):993–1001, 2006. (Cité page 31.)
- K.D. Chapman et R.N. Trelease. Acquisition of membrane lipids by differentiating glyoxysomes : role of lipid bodies. *The Journal of cell biology*, 115(4):995, 1991. (Cité page 49.)
- D.C. Chen, B.C. Yang, et T.T. Kuo. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Current genetics*, 21(1):83–84, 1992. (Cité page 146.)
- S.J. Clough et A.F. Bent. Floral dip : a simplified method foragrobacterium-mediated transformation of arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 16(6) :735–743, 1998. (Cité pages 6 et 151.)
- A. Dave, M.L. Hernández, Z. He, V.M.E. Andriotis, F.E. Vaistij, T.R. Larson, et I.A. Graham. 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 2011. (Cité page 20.)
- C. Delker, B.K. Zolman, O. Miersch, et C. Wasternack. Jasmonate biosynthesis in arabidopsis thaliana requires peroxisomal [beta]-oxidation enzymes - additional proof by properties of pex6 and aim1. *Phytochemistry*, 68(12) :1642 – 1650, 2007. ISSN 0031-9422. (Cité page 20.)
- P. Desnuelle, M. J. Constantin, et J. Baldy. Technique potentiométrique pour la mesure de l?activité de la lipase panréatique. *Bull. Sté. Chim. Biol.*, 37 :285–290, 1955. (Cité page 37.)
- R. Dhouib, J. Laroche-Traineau, R. Shaha, D. Lapaillerie, E. Solier, J. Rualès, M. Pina, P. Villeneuve, F. Carrière, M. Bonneu, et V. Arondel. Identification of a putative triacylglycerol lipase from papaya latex by functional proteomics. *FEBS Journal*, 278(1):97–110, 2011. ISSN 1742-4658. (Cité pages 39, 46, 64 et 82.)
- B.W. Dijkstra et M. Nardini. α/β hydrolase fold enzymes : the family keeps growing. 1999. (Cité pages XIV et 34.)
- P. Dominguez de Maria, J.M. Sanchez-Montero, J.V. Sinisterra, et A.R. Alcantara. Understanding candida rugosa lipases : An overview. *Biotechnology advances*, 24(2) :180–196, 2006. (Cité page 30.)
- P.J. Eastmond. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. *Journal* of *Biological Chemistry*, 279(44) :45540, 2004a. (Cité pages 46, 62, 66 et 71.)
- P.J. Eastmond. Glycerol-insensitive arabidopsis mutants : gli1 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. *The Plant Journal*, 37 (4):617–625, 2004b. (Cité page 19.)
- P.J. Eastmond. Sugar-dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating arabidopsis seeds. *The Plant Cell Online*, 18(3):665, 2006. (Cité pages XIV, 37, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 118 et 139.)
- P.J. Eastmond. Monodehyroascorbate reductase4 is required for seed storage oil hydrolysis and postgerminative growth in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 19(4) :1376, 2007. (Cité page 20.)

- P.J. Eastmond, V. Germain, P.R. Lange, J.H. Bryce, S.M. Smith, et I.A. Graham. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10) :5669, 2000. (Cité page 28.)
- K. Edwards, C. Johnstone, et C. Thompson. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic dna for pcr analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6) :1349, 1991. (Cité page 136.)
- MP Egloff, S. Ransac, F. Marguet, E. Rogalska, H. Van Tilbeurgh, G. Buono, C. Cambillau, et R. Verger. Enzymes lipolytiques et lipolyse. *Les lipases : cinétiques, spécificités et aspect structuraux. OCL*, 2 :52–67, 1995. (Cité page 35.)
- K. El-Kouhen, S. Blangy, E. Ortiz, A.M. Gardies, N. Ferté, et V. Arondel. Identification and characterization of a triacylglycerol lipase in arabidopsis homologous to mammalian acid lipases. *FEBS letters*, 579(27) :6067–6073, 2005. (Cité pages 24, 51 et 113.)
- K.A. Feldmann, M.D. Marks, M.L. Christianson, et R.S. Quatrano. A dwarf mutant of arabidopsis generated by t-dna insertion mutagenesis. *Science*, 243(4896) :1351, 1989. (Cité page 6.)
- P. Fickers, J. Destain, et P. Thonart. Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* [= BASE], 12(2), 2008. (Cité pages 30 et 34.)
- J. Folch, M. Lees, et G. Stanley. A simple method for total lipid-extraction and purification. *J Biol Chem*, 226 :497–509, 1957. (Cité page 147.)
- S. Footitt, D. Dietrich, A. Fait, A.R. Fernie, M.J. Holdsworth, A. Baker, et F.L. Theodoulou. The comatose atp-binding cassette transporter is required for full fertility in arabidopsis. *Plant physiology*, 144(3) :1467, 2007. (Cité page 45.)
- S. Footitt, S.P. Slocombe, V. Larner, S. Kurup, Y. Wu, T. Larson, I. Graham, A. Baker, et M. Holdsworth. Control of germination and lipid mobilization by comatose, the arabidopsis homologue of human aldp. *The EMBO Journal*, 21(12):2912–2922, 2002. (Cité page 18.)
- C. Fuchs et G. Hansen. Partial purification and some properties of brassica napus lipase. *Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences*, 49(5-6) :293–301, 1994. (Cité page 48.)
- M. Fulda, J. Schnurr, A. Abbadi, et E. Heinz. Peroxisomal acyl-coa synthetase activity is essential for seedling development in arabidopsis thaliana. *The Plant Cell Online*, 16(2) : 394, 2004. (Cité page 18.)
- Y. Gargouri, H. Chahinian, H. Moreau, S. Ransac, et R. Verger. Inactivation of pancreatic and gastric lipases by thl and c12 : o-tnb : a kinetic study with emulsified tributyrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1085(3) :322–328, 1991. (Cité pages 38 et 39.)
- E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, et A. Bairoch. Protein identification and analysis tools on the expasy server. *The proteomics protocols handbook*, pages 571–607, 2005. (Cité page 75.)
- A.K. Ghosh, N. Chauhan, S. Rajakumari, G. Daum, et R. Rajasekharan. At4g24160, a soluble acyl-coenzyme a-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase. *Plant phy*siology, 151(2):869, 2009. (Cité page 57.)
- A.K. Ghosh, G. Ramakrishnan, et R. Rajasekharan. Ylro99c (ict1) encodes a soluble acylcoa-dependent lysophosphatidic acid acyltransferase responsible for enhanced phospholipid synthesis on organic solvent stress in saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry*, 283(15):9768, 2008. (Cité page 57.)
- I.A. Graham. Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:115–142, 2008. (Cité pages XIII, XVI, 19, 21, 22, 23 et 28.)

- P. Hadváry, H. Lengsfeld, et H. Wolfer. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochemical Journal*, 256(2):357, 1988. (Cité page 39.)
- Y. Hayashi, M. Hayashi, H. Hayashi, I. Hara-Nishimura, et M. Nishimura. Direct interaction between glyoxysomes and lipid bodies in cotyledons of thearabidopsis thaliana ped1 mutant. *Protoplasma*, 218(1):83–94, 2001. (Cité page 23.)
- M.J. Hills et H. Beevers. An antibody to the castor bean glyoxysomal lipase (62 kd) also binds to a 62 kd protein in extracts from many young oilseed plants. *Plant physiology*, 85(4):1084, 1987. (Cité page 108.)
- M.J. Hills et K.D. Mukherjee. Triacylglycerol lipase from rape (brassica napus l.) suitable for biotechnological purposes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 26(1) :1–10, 1990. (Cité page 48.)
- MJ Hills et DJ Murphy. Characterization of lipases from the lipid bodies and microsomal membranes of erucic acid-free oilseed-rape (brassica napus) cotyledons. *Biochemical Journal*, 249(3):687, 1988. (Cité page 48.)
- Sung Myun Hong, Sung Chul Bahn, Aram Lyu, Hye Seung Jung, et Ji Hoon Ahn. Identification and testing of superior reference genes for a starting pool of transcript normalization in arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 51(10):1694–1706, 2010. (Cité page 139.)
- M.A. Hooks, E. Allen, et JA Wattis. Modelling the peroxisomal carbon leak during lipid mobilization in arabidopsis. *Biochemical Society transactions*, 38(5) :1230, 2010. (Cité pages XIII et 25.)
- A. Hoppe et RR Theimer. Degradation of oil bodies isolated from cotyledons during germination of rapeseed seedlings. *Journal of plant physiology*, 151(4):471–478, 1997a. (Cité pages 48 et 49.)
- A. Hoppe et RR Theimer. Rapeseed lipase-ph dependent specificity for native lipid body autolysis and lipolysis of artifical oil droplets. *Journal of plant physiology*, 151(4):390–398, 1997b. (Cité page 48.)
- T Hotelier, L Renault, X Cousin, V Negre, P Marchot, et A Chatonnet. Esther, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins. *Nucleic Acids Res*, 32 Database issue :D145–7, 2004. (Cité page 32.)
- AH Huang. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiology*, 110(4) : 1055, 1996. (Cité pages 23 et 81.)
- AHC Huang. Lipases. 1993. (Cité pages 38 et 47.)
- C.N. James, P.J. Horn, C.R. Case, S.K. Gidda, D. Zhang, R.T. Mullen, J.M. Dyer, R.G.W. Anderson, et K.D. Chapman. Disruption of the arabidopsis cgi-58 homologue produces chanarin–dorfman-like lipid droplet accumulation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41) :17833, 2010. (Cité pages 57 et 122.)
- P.D. Jenik, C.S. Gillmor, et W. Lukowitz. Embryonic patterning in arabidopsis thaliana. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23 :207–236, 2007. (Cité page 7.)
- C.M. Jenkins, D.J. Mancuso, W. Yan, H.F. Sims, B. Gibson, et R.W. Gross. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase a2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47) :48968, 2004. (Cité page 31.)
- P. Jolivet, E. Roux, S. d'Andrea, M. Davanture, L. Negroni, M. Zivy, et T. Chardot. Protein composition of oil bodies in arabidopsis thaliana ecotype ws. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6) :501–509, 2004. (Cité page 13.)
- D.T. Jones, W.R. Taylor, et J.M. Thornton. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*, 8(3) :275, 1992. (Cité page 73.)

- M. Karimi, D. Inzé, et A. Depicker. Gateway (tm) vectors for agrobacterium-mediated plant transformation. Trends in Plant Science, 7(5):193-195, 2002. (Cité pages 132, 133 et 142.)
- M. Karlsson, J.A. Contreras, U. Hellman, H. Tornqvist, et C. Holm. cdna cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Journal of Biological Chemistry, 272(43) :27218, 1997. (Cité page 31.)
- L.A. Kelley et MJ Sternberg. Protein structure prediction on the web : a case study using the phyre server. Nat Protoc, 4(3):363-371, 2009. (Cité page 80.)
- A.A. Kelly, A.L. Quettier, E. Shaw, et P.J. Eastmond. Seed storage oil mobilisation is important but not essential for germination or seedling establishment in arabidopsis. Plant Physiology, 2011. (Cité pages 55 et 57.)
- P.C. Kienesberger, M. Oberer, A. Lass, et R. Zechner. Mammalian patatin domain containing proteins : a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. Journal of lipid research, 50(Supplement) :S63, 2009. (Cité page 35.)
- C. Koncz et J. Schell. The promoter of t l-dna gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. Molecular and General Genetics MGG, 204(3):383-396, 1986. (Cité page 135.)
- M. Koornneef et D. Meinke. The development of arabidopsis as a model plant. The Plant Journal, 61(6) :909–921, 2010. (Cité page 6.)
- R. Kourist, H. Jochens, S. Bartsch, R. Kuipers, S.K. Padhi, M. Gall, D. B "ottcher, H.J. Joosten, et U.T. Bornscheuer. The α/β -hydrolase fold 3dm database (abhdb) as a tool for protein engineering. Chembiochem, 11(12):1635-1643, 2010. (Cité pages 32 et 78.)
- S.J. Kridel, F. Axelrod, N. Rozenkrantz, et J.W. Smith. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. Cancer research, 64(6):2070, 2004. (Cité page 39.)

I. Kugler. Untersuchungen

- "uber das keimverhalten einiger rassen von arabidopsis thaliana (l.) heynh. ein beitrag zum problem der lichtkeimung. Beitr "age zur Biologie der Pflanzen, 28 :211–243, 1951. (Cité page 6.)
- U.K. Laemmli et al. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. nature, 227(5259) :680-685, 1970. (Cité page 148.)
- F. Laibach. Summer- and winter-annual races of a. thaliana. a contribution to the etiology of flower development. Beitr. Biol. Pflanzen, 28:173?-210, 1951. (Cité page 6.)
- E. Lam et N.H. Chua. Gt-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. Science, 248(4954) :471, 1990. (Cité page 74.)
- MA Larkin, G. Blackshields, NP Brown, R. Chenna, PA McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, IM Wallace, A. Wilm, R. Lopez, et al. Clustal w and clustal x version 2.0. Bioinformatics, 23(21):2947, 2007. (Cité pages 64, 65, 66, 71 et 72.)
- A. Lass, R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J.G. Strauss, G. Gorkiewicz, et R. Zechner. Adipose triglyceride lipasemediated lipolysis of cellular fat stores is activated by cgi-58 and defective in chanarindorfman syndrome. Cell metabolism, 3(5):309-319, 2006. (Cité pages 57 et 122.)
- A. Lass, R. Zimmermann, M. Oberer, et R. Zechner. Lipolysis-a highly regulated multienzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. Progress in lipid research, 2010. (Cité page 31.)
- B.H. Le, C. Cheng, A.Q. Bui, J.A. Wagmaister, K.F. Henry, J. Pelletier, L. Kwong, M. Belmonte, R. Kirkbride, S. Horvath, et al. Global analysis of gene activity during arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(18):8063, 2010. (Cité page 8.)

- B. Lemieux, M. Miquel, C. Somerville, et J. Browse. Mutants of arabidopsis with alterations in seed lipid fatty acid composition. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 80(2) :234–240, 1990. (Cité pages 11 et 84.)
- O. Leprince, AC Van Aelst, HW Pritchard, et DJ Murphy. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and-sensitive oilseeds. *Planta*, 204(1):109–119, 1997. (Cité page 13.)
- Y. Li, F. Beisson, M. Pollard, et J. Ohlrogge. Oil content of arabidopsis seeds : the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry*, 67(9) :904–915, 2006. (Cité pages XIII, XVI, 14, 15 et 83.)
- Y. Li, M.G. Rosso, N. Strizhov, P. Viehoever, et B. Weisshaar. Gabi-kat simplesearch : a flanking sequence tag (fst) database for the identification of t-dna insertion mutants in arabidopsis thaliana. *Bioinformatics*, 19(11) :1441, 2003. (Cité page 108.)
- Y. Li-Beisson, B. Shorrosh, F. Beisson, M.X. Andersson, V. Arondel, P.D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono, T.P. Durrett, et al. Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book*, 8 (1):1–65, 2010. (Cité pages XIII, XVI, 9, 11, 12, 41 et 153.)
- K. Lin, V.A. Simossis, W.R. Taylor, et J. Heringa. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics*, 21(2):152, 2005. (Cité page 77.)
- T. Lin, C. Chen, R.F. Huang, Y.L. Lee, J.F. Shaw, et T. Huang. Multinuclear nmr resonance assignments and the secondary structure of escherichia coli thioesterase/protease i : a member of a new subclass of lipolytic enzymes. *Journal of Biomolecular NMR*, 11(4) : 363–380, 1998. (Cité page 51.)
- W. Lin et D.J. Oliver. Role of triacylglycerols in leaves. *Plant Science*, 175(3) :233–237, 2008. (Cité page 45.)
- YH Lin et AH Huang. Lipase in lipid bodies of cotyledons of rape and mustard seedlings. *Archives of biochemistry and biophysics*, 225(1):360, 1983. (Cité page 48.)
- Y.H. Lin et A.H.C. Huang. Purification and initial characterization of lipase from the scutella of corn seedlings. *Plant physiology*, 76(3):719, 1984. (Cité page 47.)
- Y.H. Lin, L.T. Wimer, et A.H.C. Huang. Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. *Plant physiology*, 73(2):460, 1983. (Cité page 47.)
- YH Lin, C. Yu, et A.H.C. Huang. Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. *Archives of biochemistry and biophysics*, 244(1):346–356, 1986. (Cité pages 30 et 47.)
- H. Ling. Sequence analysis of gdsl lipase gene family in arabidopsis thaliana. *Pak. J. Biol. Sci*, 11 :763–767, 2008. (Cité page 51.)
- A.M. Lloyd, A.R. Barnason, S.G. Rogers, M.C. Byrne, R.T. Fraley, et R.B. Horsch. Transformation of arabidopsis thaliana with agrobacterium tumefaciens. *Science*, 234(4775) :464, 1986. (Cité page 6.)
- A. Lookene, N. Skottova, et G. Olivecrona. Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (orlistat) r. *European Journal of Biochemistry*, 222 (2):395–403, 1994. (Cité page 39.)
- C. Lu, S.S. Tej, S. Luo, C.D. Haudenschild, B.C. Meyers, et P.J. Green. Elucidation of the small rna component of the transcriptome. *Science*, 309(5740) :1567, 2005. (Cité page 74.)
- Q. Luthi-Peng, H.P. Marki, et P. Hadvary. Identification of the active-site serine in human pancreatic lipase by chemical modification with tetrahydrolipstatin. *FEBS letters*, 299 (1):111–115, 1992. (Cité pages XIV, 39 et 40.)
- Q. Luthi-Peng et F.K. Winkler. Large spectral changes accompany the conformational transition of human pancreatic lipase induced by acylation with the inhibitor tetrahydrolipstatin. *European Journal of Biochemistry*, 205(1):383–390, 1992. (Cité page 39.)
- LJ Macala, RK Yu, et S. Ando. Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *Journal of lipid research*, 24(9) :1243, 1983. (Cité page 148.)
- M. Maeshima et H. Beevers. Purification and properties of glyoxysomal lipase from castor bean. *Plant physiology*, 79(2) :489, 1985. (Cité pages 46 et 108.)
- J. Marion, L. Bach, Y. Bellec, C. Meyer, L. Gissot, et J.D. Faure. Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 56(1):169–179, 2008. (Cité page 152.)
- T. Martin, O. Oswald, et I.A. Graham. Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon : nitrogen availability. *Plant Physiology*, 128(2) :472, 2002. (Cité page 28.)
- J.A. Mayfield, A. Fiebig, S.E. Johnstone, et D. Preuss. Gene families from the arabidopsis thaliana pollen coat proteome. *Science*, 292(5526) :2482, 2001. (Cité page 45.)
- K.S. McClendon, D.M. Riche, et G.I. Uwaifo. Orlistat : current status in clinical therapeutics. *Expert opinion on drug safety*, 8(6) :727–744, 2009. (Cité page 39.)
- D.W. Meinke et I.M. Sussex. Embryo-lethal mutants of arabidopsis thaliana* 1 : : A model system for genetic analysis of plant embryo development. *Developmental Biology*, 72(1) : 50–61, 1979. (Cité page 6.)
- T. Meinnel, P. Peynot, et C. Giglione. Processed n-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics. *Biochimie*, 87(8) :701– 712, 2005. (Cité page 76.)
- E.M. Meyerowitz. Arabidopsis thaliana. *Annual review of genetics*, 21(1):93–111, 1987. (Cité page 6.)
- V. Mhaske, K. Beldjilali, J. Ohlrogge, et M. Pollard. Isolation and characterization of an arabidopsis thaliana knockout line for phospholipid : diacylglycerol transacylase gene (at5g13640). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(4) :413–417, 2005. (Cité page 123.)
- S.K. Mitra, J.A. Gantt, J.F. Ruby, S.D. Clouse, et M.B. Goshe. Membrane proteomic analysis of arabidopsis thaliana using alternative solubilization techniques. *Journal of proteome research*, 6(5):1933–1950, 2007. (Cité page 81.)
- A. Moulin, J.D. Fourneron, G. Pieroni, et R. Verger. Interface-mediated inactivation of pancreatic lipase by a water-reactive compound : 2-sulfobenzoic cyclic anhydride. *Biochemistry*, 28(15):6340–6346, 1989. (Cité page 38.)
- T. Murashige et F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3):473–497, 1962. (Cité page 133.)
- DJ Murphy. Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Progress in lipid research*, 29(4) :299–324, 1990. (Cité page 49.)
- D.J. Murphy, I. Cummins, et A.S. Kang. Immunological investigation of lipases in germinating oilseed rape, brassica napus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 47(1) : 21–31, 1989. (Cité pages 48 et 108.)
- S. Muto et H. Beevers. Lipase activities in castor bean endosperm during germination. *Plant Physiology*, 54(1):23, 1974. (Cité pages XIV, 46 et 47.)
- I. Ncube, P. Adlercreutz, J. Read, et B. Mattiasson. Purification of rape (brassica napus) seedling lipase and its use in organic media. *Biotechnology and applied biochemistry*, 17 (3):327–336, 1993. (Cité page 48.)
- GF Ngando Ebongue, R. Dhouib, F. Carriere, P.H. Amvam Zollo, et V. Arondel. Assaying lipase activity from oil palm fruit (elaeis guineensis jacq.) mesocarp. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(10):611–617, 2006. (Cité pages 39 et 45.)

- T. Nolan, R.E. Hands, et S.A. Bustin. Quantification of mrna using real-time rt-pcr. *Nat Protoc*, 1(3):1559–1582, 2006. (Cité page 137.)
- DL Ollis, E. Cheah, M. Cygler, BW Dijkstra, F. Frolow, SM Franken, M. Harel, SJ Remington, I. Silman, J. Schrag, et al. The alfa/beta hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5 : 197–211, 1992. (Cité page 34.)
- R.L. Ory. Acid lipase of the castor bean. *Lipids*, 4(3) :177–185, 1969. (Cité page 46.)
- R.L. Ory et A.J.S. Angelo. Lipolysis in castor seeds : A reinvestigation of the neutral lipase. *Lipids*, 6(1) :54–57, 1971. (Cité page 46.)
- R.L. Ory, A.J.S. Angelo, et A.M. Altschul. Castor bean lipase : action on its endogenous substrate. *Journal of Lipid Research*, 1(3) :208, 1960. (Cité pages 45 et 46.)
- R.L. Ory, A.J.S. Angelo, et A.M. Altschul. The acid lipase of the castor bean. properties and substrate specificity. *Journal of Lipid Research*, 3(1):99, 1962. (Cité page 46.)
- S. Penfield, Y. Li, A.D. Gilday, S. Graham, et I.A. Graham. Arabidopsis aba insensitive4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *The Plant Cell Online*, 18(8) :1887, 2006. (Cité page 28.)
- S. Penfield, E.L. Rylott, A.D. Gilday, S. Graham, T.R. Larson, et I.A. Graham. Reserve mobilization in the arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires phosphoenolpyruvate carboxykinase1. *The Plant Cell Online*, 16(10) :2705, 2004. (Cité pages XIII, 15, 25 et 26.)
- P. Piffanelli, J.H.E. Ross, et DJ Murphy. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sexual Plant Reproduction*, 11(2):65–80, 1998. (Cité page 45.)
- A.P. Potthoff, L. Haalck, et F. Spener. Inhibition of lipases from chromobacterium viscosum and rhizopus oryzae by tetrahydrolipstatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids* and Lipid Metabolism, 1389(2) :123–131, 1998. (Cité page 39.)
- M. Poxleitner, S.W. Rogers, A. Lacey Samuels, et al. A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination. *The Plant Journal*, 47(6) :917–933, 2006. (Cité pages XIII, 13, 23 et 24.)
- A.L. Quettier et P.J. Eastmond. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6) :485–490, 2009. (Cité pages 55 et 57.)
- S. Ransac, Y. Gargouri, F. Marguet, G. Buono, C. Beglinger, P. Hildebrand, H. Lengsfeld, P. Hadváry, et R. Verger. Covalent inactivation of lipases. *Methods in enzymology*, 286 : 190–231, 1997. (Cité pages 38 et 39.)
- G.P. Redei. Arabidopsis as a genetic tool. *Annual review of genetics*, 9(1) :111–127, 1975. (Cité page 6.)
- T.J. Rydel, J.M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W.C. Stallings, S.M. Brown, J.C. Pershing, J.P. Purcell, et M.F. Alibhai. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a ser-asp catalytic dyad. *Biochemistry*, 42(22):6696–6708, 2003. (Cité page 36.)
- EL Rylott, MA Hooks, et IA Graham. Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in arabidopsis thaliana. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2) :283, 2001. (Cité pages XIII, 19, 25, 26, 27 et 28.)
- L. Sarda, G. Ailhaud, et P. Desnuelle. Inhibition de la lipase pancréatique par le diéthylp-nitrophényl phosphate en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta*, 37 :570–571, 1960. (Cité page 34.)
- L. Sarda et P. Desnuelle. Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 30(3):513–521, 1958. (Cité pages XIII, 32 et 33.)

- A. Sawano et A. Miyawaki. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile pcr strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic acids research*, 28(16) :e78, 2000. (Cité page 102.)
- G.F.E. Scherer, S.B. Ryu, X. Wang, A.R. Matos, et T. Heitz. Patatin-related phospholipase a : nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends in plant science*, 2010. (Cité page 36.)
- R.D. Schmid et R. Verger. Lipases : interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(12) :1608–1633, 1998. (Cité page 30.)
- J.C. Schoning, C. Streitner, D.R. Page, S. Hennig, K. Uchida, E. Wolf, M. Furuya, et D. Staiger. Auto-regulation of the circadian slave oscillator component atgrp7 and regulation of its targets is impaired by a single rna recognition motif point mutation. *The Plant Journal*, 52(6) :1119–1130, 2007. (Cité pages 75, 88 et 139.)
- R. Schwab, S. Ossowski, M. Riester, N. Warthmann, et D. Weigel. Highly specific gene silencing by artificial micrornas in arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 18(5):1121, 2006. (Cité page 110.)
- R. Shakya et S.C. Bhatla. A comparative analysis of the distribution and composition of lipidic constituents and associated enzymes in pollen and stigma of sunflower. *Sexual plant reproduction*, 23(2):163–172, 2010. (Cité page 45.)
- T.L. Shimada et I. Hara-Nishimura. Oil-body-membrane proteins and their physiological functions in plants. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 33(3) :360–363, 2010. (Cité pages XIII et 13.)
- JM Shockey et MS Fulda. Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme a synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Physiol*, 129 (4):1710–1722. (Cité page 18.)
- J.M. Shockey, S.K. Gidda, D.C. Chapital, J.C. Kuan, P.K. Dhanoa, J.M. Bland, S.J. Rothstein, R.T. Mullen, et J.M. Dyer. Tung tree dgat1 and dgat2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell Online*, 18(9) :2294, 2006. (Cité page 12.)
- S.D. Simpson, K. Nakashima, Y. Narusaka, M. Seki, K. Shinozaki, et K. Yamaguchi-Shinozaki. Two different novel cis-acting elements of erd1, a clpa homologous arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal*, 33(2):259–270, 2003. (Cité page 74.)
- D.M. Small. A classification of biologic lipids based upon their interaction in aqueous systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(3):108–119, 1968. (Cité pages 9 et 10.)
- C Somerville. A fortunate choice : the history of arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics*, 3(11) :883–889, 2002. (Cité page 6.)
- I.A. Sparkes, C. Hawes, et A. Baker. Atpex2 and atpex10 are targeted to peroxisomes independently of known endoplasmic reticulum trafficking routes. *Plant physiology*, 139 (2):690, 2005. (Cité page 104.)
- E. Stoynova-Bakalova, E. Karanov, P. Petrov, et M.A. Hall. Cell division and cell expansion in cotyledons of arabidopsis seedlings. *New phytologist*, 162(2):471–479, 2004. (Cité page 98.)
- K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, et S. Kumar. Mega5 : molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 2011. (Cité page 73.)
- K. Tamura, T. Shimada, E. Ono, Y. Tanaka, A. Nagatani, S. Higashi, M. Watanabe, M. Nishimura, et I. Hara-Nishimura. Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *The Plant Journal*, 35(4):545–555, 2003. (Cité page 102.)

- M. Teissère, M. Borel, B. Caillol, J. Nari, A.M. Gardies, et G. Noat. Purification and characterization of a fatty acyl-ester hydrolase from post-germinated sunflower seeds. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*)-*Lipids and Lipid Metabolism*, 1255(2):105–112, 1995. (Cité page 51.)
- R.R. Theimer et I. Rosnitschek. Development and intracellular localization of lipase activity in rapessed (brassica napus l.) cotyledons. *Planta*, 139(3) :249–256, 1978. (Cité page 48.)
- J.P.C. To, W.D. Reiter, et S.I. Gibson. Mobilization of seed storage lipid by arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biology*, 2(1) :4, 2002. (Cité page 28.)
- C. Upton et J.T. Buckley. A new family of lipolytic enzymes? Trends in biochemical sciences, 20(5):178–179, 1995. (Cité page 51.)
- J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, et F. Speleman. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7) :researchoo34, 2002. (Cité page 139.)
- R. Verger et G.H. De Haas. Enzyme reactions in a membrane model 1 : A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 10(2) :127–136, 1973. (Cité pages XIII, 32 et 33.)
- R. Verger, GH De Haas, L. Sarda, et P. Desnuelle. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 188(2) :272–282, 1969. (Cité page 60.)
- O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, et D. Baulcombe. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33(5):949–956, 2003. (Cité page 125.)
- J.G. Wallis et al. Lipid biochemists salute the genome. *The Plant Journal*, 61(6) :1092–1106, 2010. (Cité page 7.)
- SM Wang et AH Huang. Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernel. *Journal* of *Biological Chemistry*, 262(5) :2270, 1987. (Cité page 49.)
- S.M. Wang et A.H.C. Huang. Inhibitors of lipase activities in soybean and other oil seeds. *Plant physiology*, 76(4) :929, 1984. (Cité page 38.)
- G. Wanner et R.R. Theimer. Membranous appendices of spherosomes (oleosomes). *Planta*, 140(2):163–169, 1978. (Cité page 23.)
- M.N. Wass, L.A. Kelley, et M.J.E. Sternberg. 3dligandsite : predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic acids research*, 38(suppl 2) :W469, 2010. (Cité page 80.)
- R.J. Weselake, L.W. Thomson, D. Tenaschuk, et S.L. MacKenzie. Properties of solubilized microsomal lipase from germinating brassica napus. *Plant Physiology*, 91(4) :1303, 1989. (Cité pages 48 et 60.)
- H. Willekens, S. Chamnongpol, M. Davey, M. Schraudner, C. Langebartels, M. Van Montagu, D. Inzé, et W. Van Camp. Catalase is a sink for h202 and is indispensable for stress defence in c3 plants. *The EMBO Journal*, 16(16):4806–4816, 1997. (Cité page 20.)
- FK Winkler, A. d'Arcy, et W. Hunziker. Structure of human pancreatic lipase. 1990. (Cité page 32.)
- S.S.H. Wu, K.A. Platt, C. Ratnayake, T.W. Wang, J.T.L. Ting, et A.H.C. Huang. Isolation and characterization of neutral-lipid-containing organelles and globuli-filled plastids from brassica napus tapetum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23) :12711, 1997. (Cité page 45.)
- Y.Y. Yamamoto et J. Obokata. ppdb : a plant promoter database. *Nucleic Acids Research*, 36 (suppl 1) :D977, 2008. (Cité page 74.)

- Y. Yang, X. Yu, L. Song, et C. An. Abi4 activates dgat1 expression in arabidopsis seedlings during nitrogen deficiency. *Plant Physiology*, 156(2):873, 2011. (Cité page 28.)
- M. Zhang, J. Fan, D.C. Taylor, et J.B. Ohlrogge. Dgat1 and pdat1 acyltransferases have overlapping functions in arabidopsis triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *The Plant Cell Online*, 21(12):3885, 2009. (Cité page 123.)
- B.K. Zolman, A. Yoder, et B. Bartel. Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in arabidopsis thaliana reveals four mutant classes. *Genetics*, 156(3) :1323, 2000. (Cité page 20.)

ANNEXES

A

Sommaire

A.1	Annexes du chapitre 2 : Travail réalisé avant mon ar-	
	RIVÉE	I
A.2	Annexes du chapitre 3 : Résultat et Discussion	III
A.3	Annexes du chapitre 4 : Matériels et méthodesRésultat	
	et Discussion	XI

A.1 Annexes du chapitre 2 : Travail réalisé avant mon arrivée

Couverture de BnTAGL par les peptides

On part de la séquence protéique connue d'AtTAGL (disponible sur le TAIR : At1g45201.1), afin d'aller identifier les EST correspondantes chez le Colza, en utilisant une recherche de type tblastn sur le serveur du NCBI. La base de donnée consultée contient des ESTs, excepté humain et souris, avec une limite à l'organisme : *Brassica napus*. Au 20 juillet 2011, on obtient 75 ESTs, avec une couverture maximum de 53 % et une identité maximum de 95 %. L'étape suivante est de former des contigs avec les EST identifées, puis de vérifier l'alignement du contig avec l'ADNc correspondant chez Arabidopsis. Pour cela, les séquences au format FASTA des EST identifiées sont rapatriée, importée dans la suie logiciel VectorNTI (Invitrogen), et l'algorithme de formation de contig est utilisé avec ses paramètres par défaut.

On obtient différents contigs dont un seul permet de générer une ORF, ayant à première vue une longueur correcte et correspondant avec la séquence d'ADNc d'AtTAGL. Ce contig est constitué des EST présentées dans le Tableau A.1 et sa constitution dans la Figure A.1 page ii. Ensuite, on vérifie la possibilité de ce contig de contenir une ORF (voir Figure A.2 page ii). L'ORF correspondante est prédite *in silico* pour obtenir la séquence protéique. Un alignement est réalisé et avec le logiciel ClustalW. Les peptides obtenus par MS\MS pour l'identification des protéines, à partir des fractions enrichies en THL radiomarqué sont alignés. Cet alignement est présenté dans la Figure 2.3 page 65.

Le contig obtenu contient 2 ORFs. L'ORF représentée au dessus du contig est exactement de la même longueur que l'ORF d'AtTAGL.

EST permettant de reconstituer le cDNA de BnTAGL			
gi 150076690			
gi 150068226			
gi 119430721			
gi 151322392			
gi 151322176			
gi 151322036			
gi 258667180			

Tableau A.1 – EST qui permettent la formation d'un contig correspondant à BnTAGL.

ESTs de *Brassica napus* "pêchées" sur la base de donnée du NCBI, à partir de la séquence protéique d'AtTAGL/At1g45201.1 soumise à une requête de type tblastn.

adnc at1g45201: 85 » 1715	
	gl_255987180_gb_GT073582 1_GT073682 963 + 1552 gl_151322392_gb_EV222383 1_EV222383 618 + 1244 gl_151322176_gb_EV222167 1_EV222167 618 + 1244 (complementary)
	gi_151322036_gb_EV222027.1_EV222027.710 < 1244 (complementary)
gi_119430721_gb_DY023915.1_DY023915: 84 » 915	
gi_150068226_gb_EE430965.1_EE430965: 84 * 598	
890_gb_EE439429.1_EE439429: 1 » 595	
8	1000 /500

Figure A.1 – Schéma représentant le contig créé à partir des EST obtenues.

Les ESTs obtenues sont utilisées pour générer un contig. Dans cette représentation, la séquence d'AtTAGL est situé en haut, et sert de modèle pour l'alignement des autres séquences.



Figure A.2 – ORF prédits par Vector NTI à partir du contig généré.

A.2 ANNEXES DU CHAPITRE 3 : RÉSULTAT ET DISCUSSION



Séquence génomique du locus At1g45201 correspondant à AtTAGL

Figure A.3 – Sequence génomique complète du locus At1g45201

Le locus At1g45201 est défini par les coordonnées suivantes : 17123821 à 1712865, dans le sens direct, sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis thaliana*. Ces données sont issues du serveur "TAIR SeqViewer Whole Genome View".

atgc = Région non transcrite (UTR)

ATG = début - fin de la traduction

 $\overline{\text{ATGC}} = \text{Exon}$

atgc = Intron

atgc = séquence non comprise dans le locus



Mort cellulaire

Figure A.4 – Mort cellulaire liée à l'expression de formes recombinantes d'AtTAGL chez *Nicotiana tabacum*

Il y a de la mort cellulaire chez toutes les feuilles pour lesquelles a été agroinfiltré une souche d'agrobactérie porteuse d'un vecteur contenant une construction permettant l'expression de rAtTAGL. Dans le cas des cellules inoculées avec le tampon seul ou avec une construction contrôle négatif (vecteur codant pour la protéine recombinante YFP-remorine fournie par Artémis Perraki), il n'y a pas de mort cellulaire. Ces photos ont été prises 2 jours après l'agroinfiltration. AD = côté adaxial, et AB = côté abaxial de la feuille. La Figure 3.18 page 103 présente plus de détails sur certaines images.

Comparaison de l'expression des 2 formes de transcrits d'AtTAGL

Les prédictions d'épissage suggèrent 2 formes de transcrit possibles pour AtTAGL. La forme longue, At1g45201.1 est définie comme étant la forme par défaut, et la forme courte, At1g45201.2, si elle est traduite en protéine, ne comporte pas le troisième acide aminé nécessaire à la réaction catalytique. Il n'existe pas d'EST correspondant spécifiquement à la forme courte dans les bases de données.

Les niveaux des transcrits des 2 formes ont été mesurés par RT PCRq. En ce qui concerne les niveaux de transcrit de la forme courte, aucune donnée significative n'a été obtenue. Il n'y pas de transcrits détectés, ni au niveau des organes, ni au niveau de la maturation de la graine. En revanche, la forme courte semble faiblement exprimée durant la croissance post-germinative. La Figure A.5 présente les niveau d'expression des deux types de transcrits au cours de la croissance post-germinative.



Figure A.5 – Expression des formes longue At1g45201.1 et courte At1g45201.2 d'AtTAGL

On note des écarts importants, même si le profil est sensiblement le même. La PCR quantitative relative n'est pas au sens strict du terme adapté pour une comparaison de l'expression entre gènes. L'approximation est faite après vérification que les efficacités d'amplification des amorces sont comparables pour les deux formes de transcrits. Les expériences sont réalisées sur les mêmes cDNAs, sur une unique plaque multipuits et sont normalisées vis-à-vis des mêmes gènes de références.

Les allures des quantités des transcrits courts et longs sont très similaires au cours de la croissance post-germinative. On note cependant, que les transcrits correspondants à la forme courte sont en quantités significativement moins importantes, de l'ordre de 15 fois moins. Nos données montrent que la forme longue est largement majoritaire. La forte courte n'est détectée qu'à la limite de sensibilité.

Il est possible que nous ayons amplifié des ADNc issus de la transcription inverse d'ARN non épissés, la poly-adénylation étant antérieure à l'épissage. Notre contrôle de RT PCRq sur des ARNs bruts nous permet d'écarter une contamination par de l'ADN génomique. La quantité de transcrits mesurée au cours de la croissance postgerminative correspondant à la forme courte At1g45201.2 est quasiment nulle faible, alors que celle correspondant à la forme longue At1g45201.1 est bien plus forte. Il faut ajouter à cela le fait qu'il n'a pas été démontré la présence d'EST spécifiques à la forme courte. Il est donc fortement probable que seule la forme longue soit réellement exprimée. Aucune donnée biologique ne permet de vérifier que la forme courte, prédite par des logiciels *in silico*, existe réellement.

Séquence d'AtTAGL

>AtTAGL

MSKTNMKFCNSYFLVDPTKASFLDLLLLLFSSNLTSARFIDSPPDTLKGFRRSFASRWIL ALAIFLQKVLMLLSKPFAFIGQKLTYWLNLLTANGGFFNLILNLMSGKLVKPDKSSATYT SFIGCSDRRIELDEKINVGSIEYKSMLSIMASKISYESKPYITSVVKNTWKMDLVGNYDF YNAFQESKLTQAFVFKTSSTNPDLIVVSFRGTEPFEAADWCTDLDLSWYEMKNVGKVHAG FSRALGLQKDGWPKENISLLHQYAYYTIRQMLRDKLGRNKNLKYILTGHSLGGALAALFP AILAIHGEDELLDKLEGIYTFGQPRVGDEDFGEFMKGVVKKHGIEYERFVYNNDVVPRVP FDDKYLFSYKHYGPCNSFNSLYKGKVREDAPNANYFNLLWLIPQLLTGLWEFIRSFILQF WKGDEYKENWLMRFVRVVGIVFPGGSNHFPFDYVNSTRLGGLVRPPPTTTPEDKLALIA*

Figure A.6 – Séquence complète de l'enzyme AtTAGL

La séquence complète d'AtTAGL est ici présentée au format FASTA. Cette séquence correspond à la traduction du transcrit long At1g45201.1.

Étude in vivo du promoteur



D2

D3



D7

D4

Figure A.7 - Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-TAGL durant la croissance post-germinative (la lignée Gus2)

Voir la légende de la Figure 3.14 page 95. Ces données sont issues de la lignée Gus2.



Figure A.8 - Activité GUS représentant l'activité du promoteur d'At-TAGL au jour 4 après imbibition chez une plantule étiolée

Le profil d'expression du promoteur AtTAGL est le même chez des plantules étiolés et chez des plantules qui poussent en conditions normales de lumière.

Contrôle quant-à la lignée SALK_145591

A Séquençage de la section For-LB correspondante chez une plante homozygote mutante au site d'insertion du transgène

CTCTAGGTTGCATGACT C TCTAGGTTACTGGGGTGGTTTTTCTTTT

Légende :

C = CA = C'est entre ces deux bases qu'est inséré le transgène, et la première lettre grise est le site d'initiation de la transcription

TCTAGGT : Séquence répétée induite par l'insertion du transgène TACTGGGGTGGTTTTTCTTTT = Séquence depuis la bordure gauche LB de pBin-pROK2 (Transgène)

B Séquence de RB-Rev correspondante chez une plante homozygote mutante au site d'insertion du transgène

CGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTTATTGTGTATATTAGGTTGTTGTTATTAG GTAGCTCTCCTTTCTTCTTATTTCTGAGCAA

Légende :

CGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTGTTT : Séquence depuis la bordure droite RB de pBin-pROK2 (Transgène)

ATTGTGTATATTAGGTTGTTGTTATTAGGTAGC : Séquence induite par l'insertion du transgène, pas de score blast significatif, ni avec PrOK2, ni avec le génome d'Arabidopsis (séquence non identifiée)

TCTCCTTTCTTCTTATTTCTGAGCAA = 5' UTR d'AtTAGL auquel il manque les 14 premières bases, supprimées au cours de l'insertion du transgène

Figure A.9 – Site exact de l'insertion du transgène dans le promoteur d'AtTAGL (partie 2)

Complément de la Figure 3.22 page 111.



Caractérisation phénotypique des mutants AtTAGL

Figure A.10 – Absence de phénotype à l'issue de la croissance postgerminative

Les plantes sont mises à pousser sur un milieu minimum simple, sans apport de carbone dans le milieu. Au jour 6 après l'imbibition, la plupart des plantes sauvages et mutantes se sont développées normalement. Il existe cependant, dans tous les lots de plantes mutantes, un certains nombres de plantules pour lesquels la croissance germinative semble être retardée. Cette portion n'est pas constante dans tous les lots. Tous les plantules (y compris les plantules retardés), si on les transfère sur une nouvelle boîte, que ce soit en milieu minimum ou en milieu contenant une source de carbone (saccharose à 1 %), reprennent et se développent normalement. Il n'y a pas de différence entre les plantes sauvages et mutantes.



Mise en évidence des corps lipidiques sur des plantules à 5 jours après imbibition

Figure A.11 – Coloration des corps lipidiques au rouge de nile chez des plantules sauvages à 5 jours après l'imbibition.

A.3 Annexes du chapitre 4 : Matériels et méthodesRésultat et Discussion

Utilisation des antibiotiques pour les cultures de plantes, et bactériennes

Utilisation des antibiotiques pour les cultures de plantes, et bactériennes

Expression transitoire dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana tabacum*

Voir les pages suivantes.



AII	ub	out	Jues	

Agro-bactéries

A	100		
Ampiciline	100 µg/mi		
100 mg/ml	Dilution 1/1000e		
Ampicilline			150 µg/ml
150 mg/ml			Dilution 1/1000e
BASTA			15 µg/ml
15 mg/ml			Dilution 1/1000e
Carbenicilline			100 µg/ml
100 mg/ml			Dilution 1/1000e
Chloramphenicol	25 µg/ml	25 µg/ml	12.5 mg/ml
12.5 mg/ml	Dilution 1/500e	Dilution 1/500e	Dilution 1/1000e
Gentamycine	20 µg/ml	20 µg/ml	
20 mg/ml	Dilution 1/1000e	Dilution 1/1000e	
Hygromycine			20 µg/ml
20 mg/ml			Dilution 1/1000e
Kanamycine	50 µg/ml	50 µg/ml	35 µg/ml
70 mg/ml	Dilution 1/1400e	Dilution 1/1400e	Dilution 1/2000e
Rifampicine	100 µg/ml	100 µg/ml	
50 mg/ml	Dilution 1/500e	Dilution 1/500e	
Spectinomycine	50 µg/ml	100 µg/ml	
50 mg/ml	Dilution 1/1000e	Dilution 1/500e	
Tetracycline	12.5 µg/ml	2.5 µg/ml	
12.5 mg.ml	Dilution 1/1000e	Dilution 1/5000e	



Préparation des antibiotiques :

- <u>Chloramphenicol</u>: Diluer 12.5 mg de poudre dans 1 ml d'éthanol 96 ° Filtrer Stockage -20 °C
- <u>Rifampicine</u> : Diluer 50 mg de poudre dans 1 ml de DMSO Filtrer Stockage -20 °C
- <u>Tétracycline</u>: Diluer 12.5 mg de poudre dans 1 ml d'éthanol 96 ° ou de DMSO Filtrer Stockage -20 °C
- <u>Les autres antibiotiques</u> : Diluer la poudre dans 1 ml d'eau mQ Filtrer Stockage -20 °C



<u>Transformation de levures</u> Protocole ONE STEP

Source : DZChi Chen et al ; current genetics (1992) 21,83-84

Ce protocole ne nécessite pas de préparer une culture fraîche de levures, mais peut se réaliser à partir d'un simple étalement sur milieu gélosé.

COMPOSITION DU TAMPON (pour 10 ml)

Acétate de lithium 0.2N (204 mg) PEG 3350 40% (4 g) H2O milliQ gsp 10 ml

- \rightarrow Filtrer sur membrane 0.45 μ m sterile
- \rightarrow Conserver à 4°C pendant environ 1 mois

TRANSFORMATION (en environnement stérile)

- Dans un tube Eppendorf stérile ajouter
 - 90 μl de tampon
 - \circ 10 μ l de DTT 1M
 - \circ 5µl d'ADN carrier simple brin (dénaturé préalablement 10min à 100°C)
 - \circ 5 à 10 μ l de miniprep
 - 1 anse de cellules récoltées sur boîte ou le culot de 1.5 ml de culture en phase stationnaire
- Incuber 30 min à 42°C
- Etaler sur milieu sélectif



AGRO INFILTRATIONS dans l'EPIDERME de TABAC

<u>1 - Composition du tampon d'infiltration</u>

Solutions mères 10 X

- Na₃PO₄.12H₂O 20 mM (conservation 4°)^{*}
- MES 500 mM (conservation 4°)* • Glucose 50g/L (conservation 4°)
- Acétosyringone 200 mM (conservation -20°) en DMSO***

Tampon d'infiltration 1 X (conserver à 4°)

- 1 ml Na3PO4.12H2O 20 mM
 - 1 ml MES 500 mM
 - 1 ml Glucose 50 g/L •
 - 5 µl acétosyringone 200 mM •
 - Qsp 10 ml eau distillée
 - Ajuster le pH à 6.5
- Na3PO4.12H2O, Sigma, ref S1001-500G **
- MES, Euromedex, ref EU0033-A *** $\label{eq:acetosyringone} Acetosyringone~(3',5'-dimethoxy-4'hydroxyaceto-phenone),~Sigma,~ref~D134406$

2 - Préparation des échantillons

Jour 1

- Le soir, ensemencer très légèrement 5 ml de milieu LB contenant les antibiotiques
- nécessaires Incuber O/N à 28°C sous agitation

Jour 2

- Au matin, transvaser 1 ml de culture dans un tube eppendorf
- Centrifuger 5 min à 8000 rpm
- Reprendre le culot dans 1 ml de tampon d'infiltration
- Centrifuger 5 min à 8000 rpm



- Reprendre le culot dans 1 ml de tampon d'infiltration
- Mesurer la DO à 600 nm
- Faire la dilution souhaitée dans un volume final de 1 ml de tampon d'infiltration
- (quantité suffisante pour 1 infiltration) (en général à 0.05 de DO) Conserver les dilutions à 4°C jusqu'au moment de l'infiltration

3 - Procédure d'infiltration

- Utiliser 1 seringue de 1 ml, et des gants
- Faire un trou dans la feuille à l'aide d'une pointe de 1 μ l
- Infiltrer en disposant la seringue contre la feuille au niveau du trou sur l'épiderme inférieur
- Placer l'index sur le côté opposé et exercer une légère pression sur le piston
- Le liquide s'infiltre dans la feuille.
- Délimiter le contour de la zone infiltrée avec un feutre
- Arroser la plante directement à son pied
- Placer la plante dans une enceinte fermée de la serre (protection contre insectes)
- Attendre 48 heures (ne jamais arroser pendant ces 48 heures)

4 - Observations

Observer l'épiderme inférieur de la partie infiltrée au microscope confocal (x 63) (faire le montage dans une goutte d'eau et ajouter une goutte d'huile à immersion sur la lamelle)

Ce document a été préparé à l'aide de l'éditeur de texte GNU Texmaker et du logiciel de composition typographique LATEX 2_E, le modèle qui a servi pour la mise en page provient de Julien Chiquet.

Titre Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez *Arabidopsis thaliana*

Résumé Les réserves d'huile de la graine d'Arabidopsis thaliana sont hydrolysées par des lipases au cours de la croissance post-germinative de la plantule. Une protéine capable de fixer un inhibiteur de lipase a été identifiée à partir d'un extrait de plantules de colza. La séquence de cette protéine ressemble à celles de lipases connues. L'expression transitoire du gène orthologue d'Arabidopsis chez Nicotiana benthamiana induit l'apparition d'une activité lipase. Ces données suggèrent que cette protéine est une lipase. Une étude de la localisation in vivo de cette enzyme chez Nicotiana benthamiana indique qu'elle est localisée au niveau des peroxysomes. Chez Arabidopsis, le gène codant pour cette lipase est exprimé essentiellement lors de la croissance des plantules, quand l'hydrolyse de l'huile est maximale. L'analyse d'un mutant montre que ce gène est responsable de l'essentiel de l'activité lipase mesurée pendant la mobilisation de l'huile de réserve. Ces données suggèrent que cette lipase pourrait être impliquée dans la mobilisation des réserves lipidiques pendant la croissance postgerminative. Néanmoins, l'hydrolyse des réserves n'est pas diminuée chez le mutant. Cela pourrait être lié à une compensation par d'autres lipases.

Mots-clés lipase; TAG; triacylglycérol; germination; plantule

Title Identification and characterization of a lipase expressed during *Arabidopsis thaliana* reserves hydrolysis

Abstract In germinating seedlings of Arabidopsis thaliana, fat storage breakdown is initiated by lipases. A protein capable to bind to a lipase inhibitor was identified from an extract of rape seedlings and its amino acid sequence found to resemble that of known lipases. Transient expression of the Arabidopsis orthologous gene led to a 100-fold increase in lipase activity in Nicotiana bethamiana leaves. Taken together, these data strongly suggest that this protein is indeed a lipase. In vivo localization studies using a GFP fusion protein in Nicotiana benthamiana as a transcient expression host showed a peroxisomal localization. In Arabidopsis, the gene coding for this lipase was found to be mainly expressed in seedlings during fat storage breakdown. Most lipase activity was abolished in germinating seedlings of an Arabidopsis mutant for this gene. These data suggest that this lipase is likely involved in the breakdown of fat storage in germinating seedlings of Arabidopsis. However, oil mobilization was not affected in Arabidopsis mutant plants. This might suggest that the effect of the mutation could be compensated for by other lipases.

Keywords lipase; TAG; triacylglycerol; germination; seedling

Titre

Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez Arabidopsis thaliana

Résumé

Les réserves d'huile de la graine d'*Arabidopsis thaliana* sont hydrolysées par des lipases au cours de la croissance post-germinative de la plantule. Une protéine capable de fixer un inhibiteur de lipase a été identifiée à partir d'un extrait de plantules de colza. La séquence de cette protéine ressemble à celles de lipases connues. L'expression transitoire du gène orthologue d'Arabidopsis chez *Nicotiana benthamiana* induit l'apparition d'une activité lipase. Ces données suggèrent que cette protéine est une lipase. Une étude de la localisation *in vivo* de cette enzyme chez *Nicotiana benthamiana* indique qu'elle est localisée au niveau des peroxysomes. Chez Arabidopsis, le gène codant pour cette lipase est exprimé essentiellement lors de la croissance des plantules, quand l'hydrolyse de l'huile est maximale. L'analyse d'un mutant montre que ce gène est responsable de l'essentiel de l'activité lipase pourrait être impliquée dans la mobilisation des réserves lipidiques pendant la croissance post-germinative. Néanmoins, l'hydrolyse des réserves n'est pas diminuée chez le mutant. Cela pourrait être lié à une compensation par d'autres lipases.

Mots-clés

lipase ; TAG; triacylglycérol ; germination ; plantule

Title

Identification and characterization of a lipase expressed during Arabidopsis thaliana reserves hydrolysis

Abstract

In germinating seedlings of *Arabidopsis thaliana*, fat storage breakdown is initiated by lipases. A protein capable to bind to a lipase inhibitor was identified from an extract of rape seedlings and its amino acid sequence found to resemble that of known lipases. Transient expression of the Arabidopsis orthologous gene led to a 100-fold increase in lipase activity in *Nicotiana bethamiana* leaves. Taken together, these data strongly suggest that this protein is indeed a lipase. *In vivo* localization studies using a GFP fusion protein in *Nicotiana bethamiana* as a transcient expression host showed a peroxisomal localization. In Arabidopsis, the gene coding for this lipase was found to be mainly expressed in seedlings during fat storage breakdown. Most lipase activity was abolished in germinating seedlings of an Arabidopsis mutant for this gene. These data suggest that this lipase is likely involved in the breakdown of fat storage in germinating seedlings of Arabidopsis. However, oil mobilization was not affected in Arabidopsis mutant plants. This might suggest that the effect of the mutation could be compensated for by other lipases.

Keywords

lipase ; TAG; triacylglycerol ; germination ; seedling