

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
par

Fabien ARTUR

Présentée et soutenue le 13 mars 2003 à 10h30

Etude des protéines d'*Arabidopsis thaliana*,
un modèle pour l'amélioration génétique du colza

Président : Monsieur **POUCHUS Yves, François**, Professeur de Botanique et de Cryptogamie

Membres du jury : Monsieur **BIARD Jean-François**, Professeur de Pharmacognosie

Madame **LARRE Colette**, Ingénieur de recherche INRA

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION.....	7
LE COLZA	10
I. LE MARCHÉ ECONOMIQUE MONDIAL EN OLEAGINEUX	10
A. Les huiles : une consommation en forte progression.....	11
B. Les tourteaux d'oléagineux : une demande mondiale toujours plus forte.....	12
C. Les oléagineux en Europe.....	13
D. L'Europe, premier marché mondial pour les oléagineux.....	13
E. L'avenir du colza européen.....	14
II. LA CULTURE DU COLZA	15
A. Avantages agronomiques.....	15
B. Avantages environnementaux	15
III. L'HUILE DE COLZA	16
A. Caractéristiques de l'huile de colza.....	16
B. Principaux débouchés de l'huile de colza.....	19
IV. LE TOURTEAU DE COLZA	20
A. Caractéristiques du tourteau	20
1. Les glucosinolates.....	20
2. Les composés phénoliques.....	22
3. L'acide phytique	23
B. Utilisation du tourteau de colza.....	24
V. DEBOUCHES NON ALIMENTAIRES POUR LE COLZA.....	25
A. Dans le domaine pétrolier.....	25
B. Des débouchés industriels très spécifiques de l'acide érucique.....	27
VI. LES VOIES DE RECHERCHE POUR LE COLZA	27
A. Botanique	27
B. Patrimoine génétique	29
C. Principaux axes de recherche du colza.....	30
D. Un outil pour améliorer le colza : <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
ARABIDOPSIS THALIANA.....	34
I. LA PLANTE : <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (L.) HEYN	34
II. MUTANTS	36
A. Historique de techniques de mutagénèses	36
1. Mutagénèses.....	37
2. Transgénèses	37
B. Applications	38
III. MATURATION DE LA GRAINE	40
A. Aspect embryogène	40
B. Aspect biochimique	41
IV. LES PROTEINES DE RESERVE DE LA GRAINE.....	42
A. Généralités.....	42

B.	<i>Classifications</i>	42
C.	<i>Localisation cellulaire</i>	43
D.	<i>Biochimie</i>	43
1.	Les globulines 12S	44
2.	Les albumines 2S	45
V.	PROTEOMIQUE DE GRAINES D'ARABIDOPSIS	48
A.	<i>Généralités sur la protéomique</i>	48
B.	<i>Protéomique de graines d'Arabidopsis</i>	49
PARTIE EXPERIMENTALE		50
I.	ETUDE COMPARATIVE DE DEUX TECHNIQUES DE COLORATION EN ELECTROPHORESE 2-D.	51
	Modes opératoires de l'électrophorèse 2D	51
	Extraction	51
	Isoélectrofocalisation (IEF)	51
	Equilibration du strip avant le SDS-PAGE	51
	2 ^{ème} dimension : SDS-PAGE	51
	Colorations	52
	Bleu de Coomassie colloïdal G250 (selon Damerval <i>et al.</i> , 1987)	52
	Nitrate d'argent (selon Blum <i>et al.</i> , 1987)	52
	Séchage des gels	52
	Imagerie	52
	Obtention de l'image	52
	Traitement de l'image	52
A.	<i>Résultats des deux types de colorations</i>	53
B.	<i>Comparaison argent/bleu</i>	54
C.	<i>Conclusion : bibliographie et choix du bleu pour la suite</i>	55
D.	<i>Aspect visuel de la variabilité</i>	55
II.	ETUDE DE L'EFFET DE LA CONCENTRATION EN PROTEINES	57
III.	CONSTRUCTION DE GELS DE REFERENCE A PARTIR DE GRAINES SAUVAGES	60
1.	Obtention d'un gel « minimum »	60
2.	Obtention d'un gel « maximal »	61
IV.	ETUDE DES GRAINES MUTANTES	61
A.	<i>Analyse visuelle des gels de graines mutantes</i>	61
B.	<i>Comparaison des mutants avec le gel de référence « maximal »</i>	65
C.	<i>Comparaison des mutants avec le gel de référence « minimal »</i>	66
D.	<i>Choix des mutants les plus intéressants</i>	66
V.	ANALYSE EN ELECTROPHORESE 1-D DE GRAINES SAUVAGES EN DEVELOPPEMENT	68
	Mode opératoire de l'électrophorèse 1 D.....	68
	Extraction	68
	Electrophorèse	68
VI.	PRODUCTION D'ANTICORPS	71
	Test ELISA	72
	Western-blot	72
A.	<i>Caractérisation des anticorps par ELISA</i>	72
B.	<i>Essais en immuno-blotting</i>	73
CONCLUSION		75
BIBLIOGRAPHIE		76
ANNEXE		81

Liste des abréviations

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN	acide désoxyribonucléique
Ag	argent
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
BSA	bovin serum albumin
C 18 : 1	chaîne à 18 atomes de carbone comportant une double liaison
CEDRE	centre de documentation, de recherche et d'expérimentation
CHAPS	3[(3-chloramidopropyl)diméthylammonio]propane sulfonate
CO	monoxyde de carbone
Cys	cystéine
DTT	dithiothréitol
1-D	une dimension (électrophorèse)
2-D	deux dimensions (électrophorèse)
EMS	éthylméthane sulfonate
ESB	encéphalopathie spongiforme bovine
Gln	glutamine
Glu	acide glutamique
ha	hectare
His	histidine
IEF	isoélectrofocalisation
IgG	immunoglobuline de type G
IPG	immobilin pH gradient
KD	kilodalton
KLH	keyhole limpet hemocyanin
Lys	lysine
M	molaire (moles par litre)
mA	milli-ampères
Met	méthionine
mio T	millions de tonnes
mmol	milli-moles
Mpb	méga paires de bases
NaCl	chlorure de sodium
NO _x	oxydes d'azote
OPD	ortho phénylène diamine
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffer salin
PCR	polymerase chain reaction
PED	pays en développement
PECO	pays d'Europe Centrale et Orientale
pI	point isoélectrique
PID	pays industrialisés
pM	poids moléculaire
q/ha	quintal à l'hectare
ref	référence
SDS	sodium dodecyl sulfate

T	tonnes
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TRIS	tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
UE	Union Européenne
URPVI	Unité de Recherche sur les Protéines Végétales et leurs Interactions
WS	Wassilewskija

INTRODUCTION

Depuis que l'homme s'est sédentarisé, il a continuellement cherché à améliorer ses cultures. Pour ce faire il a sélectionné des plantes qui correspondaient le mieux à ses besoins : plantes plus résistantes aux parasites et aux conditions environnementales, croissance plus rapide, partie consommée plus importante, etc... c'est la sélection variétale. Il s'agit d'une sélection phénotypique, basée sur des caractères somatiques apparents. L'essor de la biologie moléculaire à partir de la 2^{ème} moitié du XX^e siècle a permis de passer d'un examen phénotypique à un examen génotypique. Aujourd'hui, on sait qu'une variété intéressante c'est une bonne combinaison de gènes ; la difficulté étant de trouver la bonne !

Le patrimoine génétique, c'est-à-dire l'ensemble des gènes d'un individu est appelé génome. La discipline de la biologie qui vise à analyser ce matériel héréditaire est la génomique. La génomique va permettre de déduire la fonction des gènes et leurs interactions, de comprendre l'Evolution des espèces et leur adaptation à différents environnements.

Afin d'analyser la fonction de gènes et leurs interactions, un programme français fédérateur en génomique végétale a pu voir le jour : Génoplante. Ce programme associe des partenaires de la recherche publique (CNRS, INRA, CIRAD, IRD) et des entreprises privées (Biogemma, Bioplante et Aventis Crop Science).

L'objectif de Génoplante (www.genoplante.org) est d'analyser les génomes des cinq espèces phare de l'agriculture européenne : le maïs, le blé, le colza, le tournesol et le pois protéagineux. Le but est d'identifier des gènes utiles permettant l'amélioration des plantes, de découvrir de nouvelles molécules agrochimiques... et d'établir un portefeuille compétitif de brevets, offrant ainsi aux semenciers de nouvelles possibilités d'amélioration des variétés. L'augmentation de la qualité du végétal intéresse chaque niveau de la chaîne alimentaire : l'agriculteur, l'industriel de l'aliment et le consommateur. L'agriculteur demande des plantes à croissance rapide, résistantes aux stress et aux maladies, et faciles à récolter ; l'industriel de l'aliment souhaite valoriser au maximum le végétal ; quant au consommateur, il réclame une sécurité alimentaire, une bonne qualité nutritionnelle et une production respectueuse de l'environnement.

Pour ce faire, quatre grands thèmes de travail ont été définis. Le premier thème consiste en l'analyse de la structure du génome : constituer des catalogues de gènes exprimés,

cartographier finement le génome et mettre au point une analyse haut débit de l'expression des gènes. Le second thème concerne les caractéristiques agronomiques de la plante : étudier la tolérance aux stress abiotiques, augmenter la précocité de floraison et favoriser l'assimilation de l'azote. Le troisième thème de recherche consiste à améliorer la qualité des produits végétaux : identifier des déterminants de stabilité de la qualité de la farine, augmenter la digestibilité des nourritures animales et augmenter le rendement des oléoprotéagineux (en particulier la synthèse d'huile dans la graine de colza, et la quantité de protéines dans le pois). Le dernier thème concerne les résistances aux maladies fongiques : fusariose et septenriose du blé, phoma et scherotina du colza et du tournesol et de l'anthracnose du pois.

Le programme Génoplante se divise en deux parties : une partie « Génoplante générique » où l'objectif est de déterminer la fonction de gènes intéressants sur des plantes modèles, *Arabidopsis thaliana* et le riz qui est en cours de séquençage. L'autre partie, « Génoplante espèce » consistera à appliquer les connaissances acquises précédemment sur le maïs, le blé, le colza, le tournesol et le pois.

Le groupe de travail dans lequel se situe l'Unité de Recherche sur les Protéines Végétales et leurs Interactions (URPVI) du centre INRA de Nantes a pour objectif d'isoler et de caractériser des mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans le remplissage et la qualité des graines, de cloner les gènes correspondants, puis leurs homologues chez le colza. Des mutants d'insertion d'ADN-T qui ont été créés par milliers, sont analysés aux niveaux génétique (déterminisme et étiquetage de la mutation), biochimique (glucide, lipides et protéines), et moléculaire (identification du/des gènes impliqués, caractérisation du transcriptome).

Dans une première partie, l'intérêt d'améliorer le colza sera mis en évidence, du point de vue économique et agronomique. Ensuite ses débouchés alimentaires et non alimentaires actuels et envisageables seront détaillés. La fin de cette partie justifiera l'utilisation d'une espèce modèle, *Arabidopsis thaliana*.

Dans une seconde partie, consacrée à cette espèce modèle, des techniques utilisées pour l'étude de gènes (l'obtention de mutants) seront décrites, mais aussi et surtout ses graines et en particulier ses protéines de réserve.

Dans la troisième partie, il s'agit de mettre au point une méthode de discrimination de mutants altérés dans leurs protéines de réserve. A l'URPVI, cette étude de caractérisation des mutants par électrophorèse à 2 dimensions a fait l'objet de mon stage de DEA. Ce travail sera

lui-même développé en trois parties : tout d'abord une partie méthodologique de mise au point des techniques de coloration ainsi que du traitement des images ; dans un deuxième temps, la comparaison des graines de mutants par rapport au sauvage a été réalisée. Un point particulier a été développé sur l'accumulation des protéines au cours du développement des graines. La troisième partie, menée en parallèle, a permis de définir et de caractériser des outils immunochimiques qui seront utiles pour la suite du projet.

Le colza

Le colza est une plante de grande culture, dans le monde entier et particulièrement en France où il représente plus d'un million d'hectares cultivés. Son principal intérêt économique réside dans la haute teneur en huile (45 à 50 %) de ses graines (Figure 1)



Figure 1 : champs et graines de colza

Dès le XIII^{ème} siècle, le colza apparaît dans quelques textes. Cultivé à l'époque essentiellement pour son huile, cette dernière était seulement utilisée comme combustible dans les lampes à huile, elle a été remplacée par la suite par le pétrole. Au XIX^{ème} siècle l'huile de colza a été employée comme matière première pour la fabrication de savon. Cependant la production demeurait toujours assez faible. Après la seconde guerre mondiale, les besoins en huile comestible augmentent et le colza prend de plus en plus d'importance. La production augmente alors considérablement en Europe et est multipliée par 12 en France (154 000 T) (Appelquist, 1973b). Dès lors le colza présente un intérêt particulier pour l'agriculture et devient l'objet d'enjeux économiques importants.

I. Le marché économique mondial en oléagineux

Les oléagineux regroupent des plantes comme le colza, le soja, l'arachide, le tournesol...etc, qui ont la particularité de posséder des graines riches en lipides.

La production mondiale de graines oléagineuses est estimée à 307 millions de tonnes en 2000/01, contre 128 en 1973/74. En l'espace de 20 ans, elle a été multipliée par 2,4.

Sur la période 2000/01, le soja occupe toujours la première place en terme de graines produites avec 171 millions de tonnes, soit 56 % de la production d'oléagineux, devant le

colza (37,6 millions de tonnes), le coton (33,2 millions), le tournesol (23,4 millions) et l'arachide (22,9 millions). La production de colza, bien qu'ayant elle aussi fortement progressée, n'atteint que 14 millions de tonnes en 2000/01, ce qui représente environ 12 % de la production mondiale d'oléagineux.

Les Etats-Unis sont, de loin les plus gros producteurs de graines oléagineuses, dont près de 90 % sont du soja. Avec une production de 85 millions de tonnes, ils assurent près de 30 % de la production mondiale toutes graines confondues, et 44 % de la production de graines de soja. L'Union Européenne, avec une production de 14,7 millions de tonnes en 2000/01 n'arrive qu'en 6^{ème} position derrière les USA, la Chine, le Brésil l'Argentine et l'Inde.

Les principaux producteurs de colza sont la Chine (30 % de la production mondiale et en progression continue), l'Union Européenne (UE), le Canada et l'Inde. Depuis 1973, c'est le colza qui a enregistré la plus forte progression : sa production a presque été multipliée par 6, notamment grâce à l'augmentation des surfaces ensemencées dans l'UE. Cependant, entre 1999/00 et 2000/01 la production mondiale de colza a chuté, en particulier en Europe et au Canada, et remonte difficilement aujourd'hui.

La production d'oléagineux est destinée essentiellement à la production d'huiles et de tourteaux (farine délipidée de graines). Dans l'UE la culture de colza non alimentaire se développe aussi largement (jachère industrielle) pour la production de biocarburant ou de matières premières industrielles.

A. Les huiles : une consommation en forte progression

Avec 95 millions de tonnes produites en 2001, la production mondiale d'huiles végétales a plus que doublée depuis 20 ans.

L'huile de soja arrive toujours en tête des huiles produites dans le monde avec 28 % de la production. Depuis 1997/98, la production d'huile de palme progresse de façon considérable : sa production est passée de 7,6 million de tonnes en 1986 à 23,4 millions de tonnes en 2000/01. Elle assure désormais 25 % de l'approvisionnement mondial. Les huiles de colza et de tournesol représentent respectivement 15 et 9 % de la production d'huiles végétales mondiale.

Les USA et l'UE sont aujourd'hui les deux principaux producteurs d'huiles végétales (majoritairement de soja pour les USA et de colza pour l'UE), avec des productions respectives de 15,7 et 15,2 millions de tonnes en 2000/01. Ils sont suivis par la Chine (14,7 millions de tonnes, en huiles de soja et colza), la Malaisie (12 millions de tonnes) et l'Indonésie (8,3 millions de tonnes en huile de palme). En matière d'huile de colza, l'UE est le deuxième producteur mondial derrière la Chine. L'UE absorbe 23 % de l'huile de colza consommée dans le monde.

B. Les tourteaux d'oléagineux : une demande mondiale toujours plus forte

En 10 ans, la production mondiale de tourteaux est passée de 125,4 mio T en 1991/92 à 177,6 mio T en 2000/01. Cette forte progression est due à celle des tourteaux de soja, qui augmente de près de 70 % sur la même période pour représenter aujourd'hui 65 % de la production mondiale de tourteaux d'oléagineux. Bien qu'appartenant à la catégorie des graines riches en huiles, le tourteau est un débouché important pour le colza, sa production a augmenté à un rythme annuel moyen de 4 % depuis 10 ans : elle est aujourd'hui de 22 millions de tonnes, ce qui représente 12 % de la production mondiale de tourteau.

La demande en tourteaux est directement corrélée à la consommation de viandes dans le monde. Or celle-ci, relativement stable dans les PID, progresse sous l'impulsion de la demande des PED, du fait de la progression du pouvoir d'achat dans ces régions et notamment de l'accroissement continu de la demande asiatique. Ainsi, en Chine, la consommation individuelle de viande est passée de 19 kg/hab/an au début des années 90 à 45 kg/hab/an aujourd'hui (contre 125 kg/hab/an aux USA et 90 kg/hab/an dans l'UE, à titre de comparaison). En outre, la part des viandes blanches, davantage consommatrices de tourteaux, dans la consommation mondiale de viande a tendance à croître depuis une dizaine d'année. Il existe donc un fort développement potentiel du marché du tourteau.

Aujourd'hui, devant la Chine et les USA, l'UE est le premier consommateur mondial de tourteaux d'oléagineux avec 50 mio T/an, dont 55 % en soja et 11,5 % en colza.

C. Les oléagineux en Europe

Résultat d'une augmentation régulière des rendements et d'une progression fulgurante des surfaces, la production d'oléagineux en Europe a été multipliée par 5 depuis 20 ans : elle est passée de 3 millions de tonnes en 1980/81 à 17,3 millions de tonnes en 1999/00, année record. Le colza représente à lui seul entre 60 et 70 % de la production européenne de graines oléagineuses.

Les surfaces consacrées aux graines oléagineuses en Europe sont estimées à 5,4 millions ha en 2000/01, dont 3 millions ha (58 %) pour le colza, près de 2 millions pour le tournesol et 340 000 ha pour le soja. Une partie de ces superficies (environ 37 %) est destinée à la production de biocarburant ou autres usages industriels : 835 000 ha pour l'UE en 2000, dont 750 000 ha de colza et 85 000 ha de tournesol.

Avec la mise en application de la nouvelle PAC, la production européenne 2000/01 accuse un recul dans l'ensemble des pays producteurs de colza. Après la forte progression des emblavements en colza alimentaire sur la période allant de 1997 à 1999, les surfaces révèlent une baisse de près de 12 % en 2000 par rapport à 1999. La production en non alimentaire a également diminuée mais sa part dans la production européenne se maintient à 24 %.

La France est le premier producteur de graines oléagineuses, avec 5,7 millions de tonnes en 2000/01, devant l'Allemagne (3,6 millions de tonnes) et l'Italie (1,3 millions de tonnes) qui est passée devant le Royaume-Uni (1,2 millions de tonnes).

D. L'Europe, premier marché mondial pour les oléagineux.

La production communautaire de 14,7 millions de tonnes de graines en 2000/01 ne suffit pas pour satisfaire la consommation de l'UE qui a importé 19,4 millions de tonnes de graines oléagineuses (dont 15,2 mio de T de soja) l'an dernier.

Dans le cas du colza, 3,3 millions de tonnes d'huile en 2000 sur les 3,7 produites en Europe ont été consommées. Seulement 400 à 700 000 tonnes ont été exportées.

En France, en 1999, la consommation des tourteaux de colza a été de 971 000 tonnes, tandis que la production ne s'élevait qu'à 632 000 tonnes, les quantités importées ont été de 392 000 tonnes (53 000 tonnes ont été exportées).

L'Europe ne couvre aujourd'hui que 30 % de ses besoins en oléagineux et 42 % de ses besoins en matières protéiques végétales.

E. L'avenir du colza européen

L'année 2000 a vu une augmentation notable de la quantité de graines de colza triturées en Europe (600 000 tonnes de plus qu'en 1999). Une activité ayant permis d'obtenir les deux précieux produits que sont l'huile et le tourteau.

En matière de commerce, la Chine a absorbé près de 60 % des exportations européennes de graines de colza, ce qui a représenté 1,2 millions de tonnes en 1999/00.

L'UE, traditionnellement importatrice de graines de colza provenant de l'Europe de l'Est (80 %) continue de privilégier cette origine depuis 3-4 ans par rapport aux productions canadiennes susceptibles d'être issues de plantes génétiquement modifiées.

L'UE est exportatrice nette d'huile de colza, vers l'Inde, l'ex-URSS, les PECO et la Chine, tandis qu'en tourteaux de colza, elle ne couvre pas ses besoins et importe 14 % de sa consommation en provenance des PECO et de la Chine.

En 2000/01, en revanche, la baisse de la production de colza dans l'UE devrait limiter les exportations de graines, et parallèlement entraîner une réduction des productions d'huiles et de tourteaux. Cette situation ajoutée à une demande intérieure accrue et stimulée en particulier par le développement des utilisations non alimentaires devraient provoquer une augmentation des prix européens du colza. De plus, il est vraisemblable que la Commission Européenne intégrera les conséquences de la crise de l'ESB et prendra des mesures visant à favoriser les cultures oléoprotéagineuses, afin de limiter la dépendance en protéines de l'UE. Les primes du colza et du tournesol sur le soja devraient être maintenues.

Aujourd'hui, la production de colza sur jachère est particulièrement intéressante et la production de Diester® a l'avantage d'augmenter la production de tourteaux dont l'Europe a tout particulièrement besoin.

II. La culture du colza

Le colza, largement reconnu pour ses avantages agronomiques, est désormais considéré comme une « culture d'équilibre ».

A. Avantages agronomiques

Du point de vue agronomique, c'est une tête d'assolement essentielle pour le blé et elle est même devenue incontournable dans certaines régions, notamment dans les petites terres à cailloux. On considère qu'en moyenne le rendement d'un blé de colza (blé cultivé après du colza) est de 10 % supérieur à celui du blé sur blé. Economiquement parlant, le blé produit en rotation permet de réaliser des économies en matière de désherbage, de fertilisation, de protection fongicide, voire insecticide. Il est donc important de juger la rentabilité du colza au delà de sa propre année de production et de prendre en compte le bonus financier qu'il apporte dans la rotation.

B. Avantages environnementaux

Du point de vue environnemental, la culture de colza permet de restructurer les sols. Le colza a une racine pivotante qui peut descendre jusqu'à une profondeur de plus d'un mètre et qui possède un fort pouvoir de récupération d'eau et de minéraux. De plus, le colza possède un cycle de végétation extrêmement long de 10 à 11 mois qui assure une bonne couverture du sol presque toute l'année. Récolté en début d'été, il ne nécessite pas d'arrosage estival. Le colza est réputé pour se comporter en un véritable « piège à nitrates » à l'automne. Il est également capable d'absorber l'azote organique en grande quantité (lisier, vinasse...), ce qui contribue au respect de la qualité de l'eau. Le colza produisant un gros volume de végétation, la matière verte peut être laissée sur place après la récolte des graines (ce qui n'est pas toujours le cas avec les céréales). Il restitue ainsi à la terre 8 à 10 tonnes de matière sèche à l'hectare, ce qui contribue à améliorer le bilan humique des sols.

Du point de vue des paysages, il est important de remarquer que le colza contribue au printemps à la beauté de nos campagnes.

La culture du colza est donc une culture rentable dans le cadre d'une agriculture raisonnée et durable.

III. L'huile de colza

L'huile de colza possède des vertus pharmacologiques adoucissante, cicatrisante, laxative et solvantes.

A. Caractéristiques de l'huile de colza

La fraction lipidique de colza est constituée à 99 % d'acides gras (sous forme de triglycérides). Les chaînes des acides gras vont de 16 à 24 carbones et peuvent présenter au maximum 3 insaturations (Tableau I). Dans les colzas ancestraux, 50 % des acides gras sont constitués d'acide érucique (cardiotoxique). Les longues chaînes acides monoéniques (acide gadoléique et érucique) sont caractéristiques des crucifères. Elles sont remplacées par de l'acide oléique, linoléique et linoléique dans les variétés sans acide érucique.

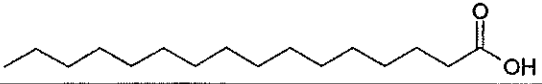
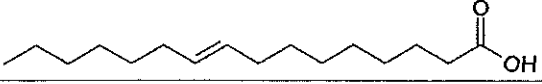
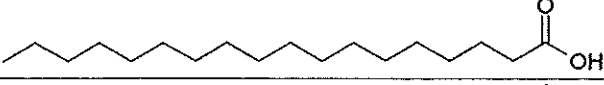
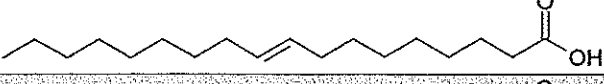
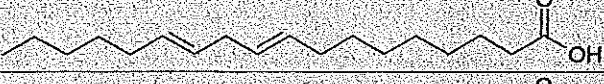
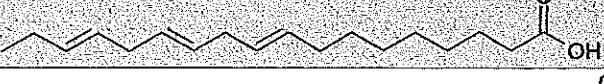
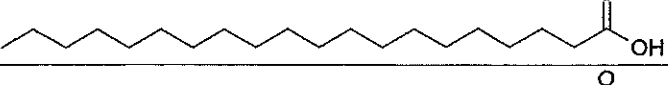
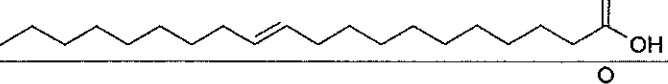
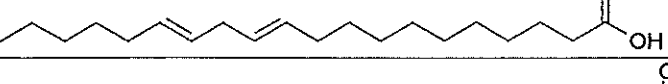
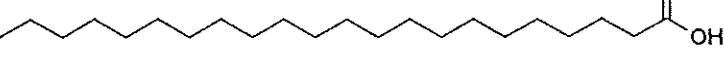
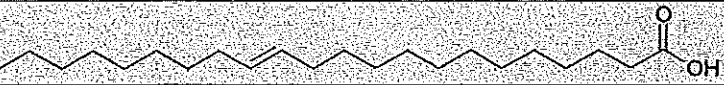
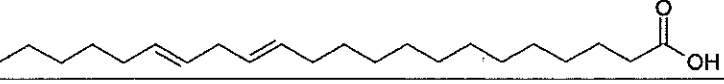
Abréviation	Nom	Formule
16 :0	Acide palmitique	
16 :1 ω7	Acide palmitoléique	
18 :0	Acide Stéarique	
18 :1 ω9	Acide Oléique	
18 :2 ω6,9	Acide linoléique	
18 :3 ω3,6,9	Acide linoléique	
20 :0	Acide arachidique	
20 :1 ω9	Acide gadoléique	
20 :2 ω6,9	Acide eicosadiénoïque	
22 :0	Acide béhénique	
22 :1 ω9	Acide érucique	
22 :2 ω6,9	Acide docosadiénoïque	

Tableau I : Principaux acides gras du colza (Appelquist, 1973a). Les lignes surlignées correspondent aux acides gras majoritaires.

Ces acides gras se retrouvent à 98 % sous forme de triglycérides. Les acides gras qui composent ces triglycérides peuvent être homogènes ou hétérogènes. Toutefois, la répartition ne se fait pas au hasard. Certains acides gras se retrouvent principalement sur le deuxième carbone du glycérol alors que d'autres vont préférentiellement se lier au premier et troisième carbone du glycérol (Brockhoff et Yurkowski, 1966). Dans le cas de variétés avec acide érucique, les acides gras fixés de préférence en deuxième position ont des chaînes saturées et insaturées comportant 18 carbones. L'acide érucique occupe quant à lui la première ou la troisième position dans 99 % des cas. Les variétés "zéro acide érucique" synthétisent des triglycérides beaucoup plus hétérogènes. Les acides oléique et linoléique se placent alors indifféremment sur toutes les positions du glycérol. Il y a très peu de mono et diglycérides. Ils ne représentent pas plus de 2 % des lipides totaux. De même que les acides gras libres ne sont présents qu'à l'état de traces. On retrouve également dans l'huile de colza environ 0,5 à 1% de phospho-, galacto-, et sulfolipides (McKillican, 1966).

Parmi les huiles de consommation courante, le colza se rapproche dans sa composition du soja et de la noix, avec une inversion dans la proportion acide linoléique et acide oléique. L'huile de colza des variétés sans acide érucique ou "OO" offre un très bon profil en acide gras (Figure 2) :

- 8 % d'acides gras saturés
- 60 % d'acides gras monoinsaturés, dont 58 % d'acide oléique
- 32 % d'acides gras polyinsaturés dont
 - 23 % d'acide linoléique, précurseur des acides gras de la famille des oméga 6, indispensables à la vie
 - 9 % d'acide alpha linolénique, précurseur de la famille des fameux acides gras oméga 3, connus entre autres, pour leur intérêt dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

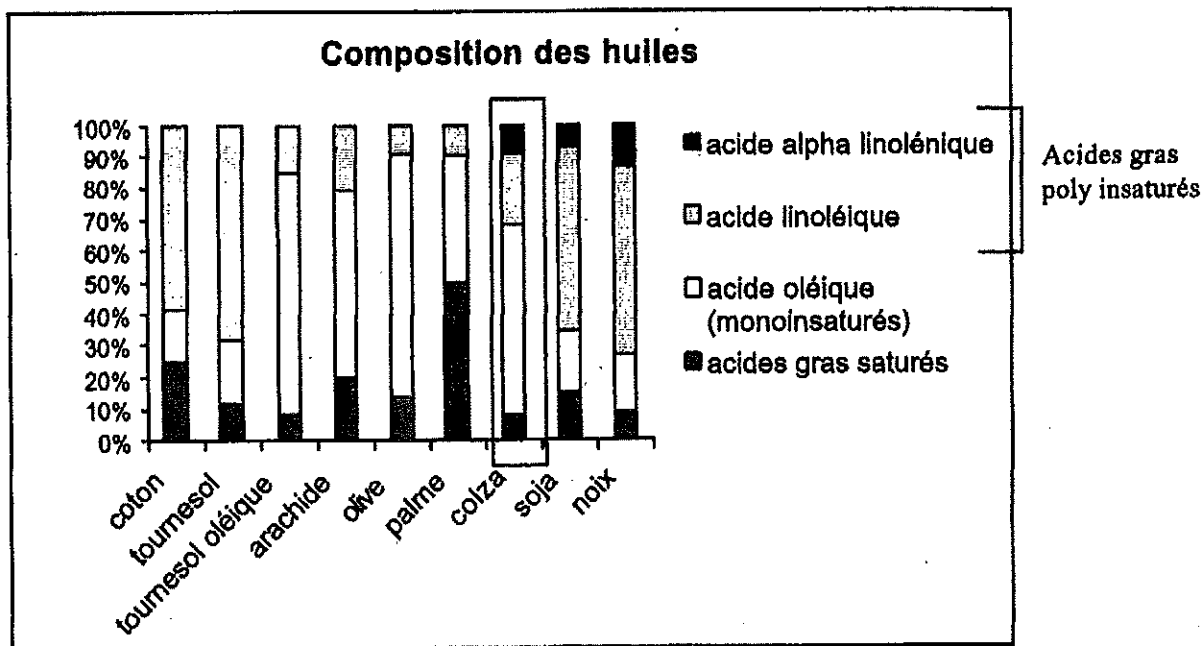


Figure 2 : composition en principaux acides gras de différentes huiles végétales.

L'huile de colza est donc une huile particulièrement saine pour l'alimentation humaine car elle contribue à équilibrer les apports lipidiques. Le respect de cet équilibre joue un rôle significatif sur la prévention des maladies cardio-vasculaires. Mais ce n'est pas tout, un bon apport en acides gras assure par exemple une bonne régulation des systèmes de réponses inflammatoires ainsi que le développement du système nerveux chez le nourrisson (Tableau II)

	OMEGA 6	OMEGA 3
Régulation de la lipémie	Baisse de la cholestérolémie	Baisse de la triglycéridémie
Coagulation sanguine (fonction plaquettaire)	Effet pro-agrégant	Régulation de l'effet pro-agrégant
Autres fonctions	Fonction reproductrice Intégrité de l'épiderme Fonction immunitaire et réponse inflammatoire	Régulation de la fonction immunitaire et de la réponse inflammatoire Fonctionnement du système nerveux (composition des membranes nerveuses)

Tableau II : actions physiologiques des acides gras oméga 3 et 6 (d'après Renaud et al. 1994).

L'huile de colza constitue aussi une source de vitamine E non négligeable. Le colza est en effet riche en tocophérols (88 mg environ pour 100 g d'huile). L'alpha tocophérol (contenu à 26,3 mg pour 100 g d'huile) détient l'activité vitaminique E. Rappelons que la vitamine E est une vitamine liposoluble jouant un rôle anti-oxydant important dans le plasma sanguin. L'alpha tocophérol lutte en effet efficacement contre les radicaux libres, en les neutralisant. La vitamine E est ainsi un puissant agent anti-oxydant extracellulaire. La vitamine E a aussi une activité stabilisatrice de membranes cellulaires.

L'huile de colza est également riche en gamma tocophérol, un très bon anti-oxydant naturel des huiles, lui conférant ainsi une importante protection vis-à-vis du rancissement.

B. Principaux débouchés de l'huile de colza

Le premier débouché alimentaire de l'huile de colza est l'industrie alimentaire (Figure 3). Elle regroupe notamment les mayonnaises et sauces émulsionnées, la biscuiterie, la biscotterie et la conserverie (en particulier le poisson). L'utilisation directe de l'huile de colza « à la bouteille » par le consommateur vient en deuxième position. Depuis 1995, sa consommation a augmenté de façon significative. Ce résultat s'explique par l'image de plus en plus positive dont bénéficie le colza auprès des prescripteurs médicaux.

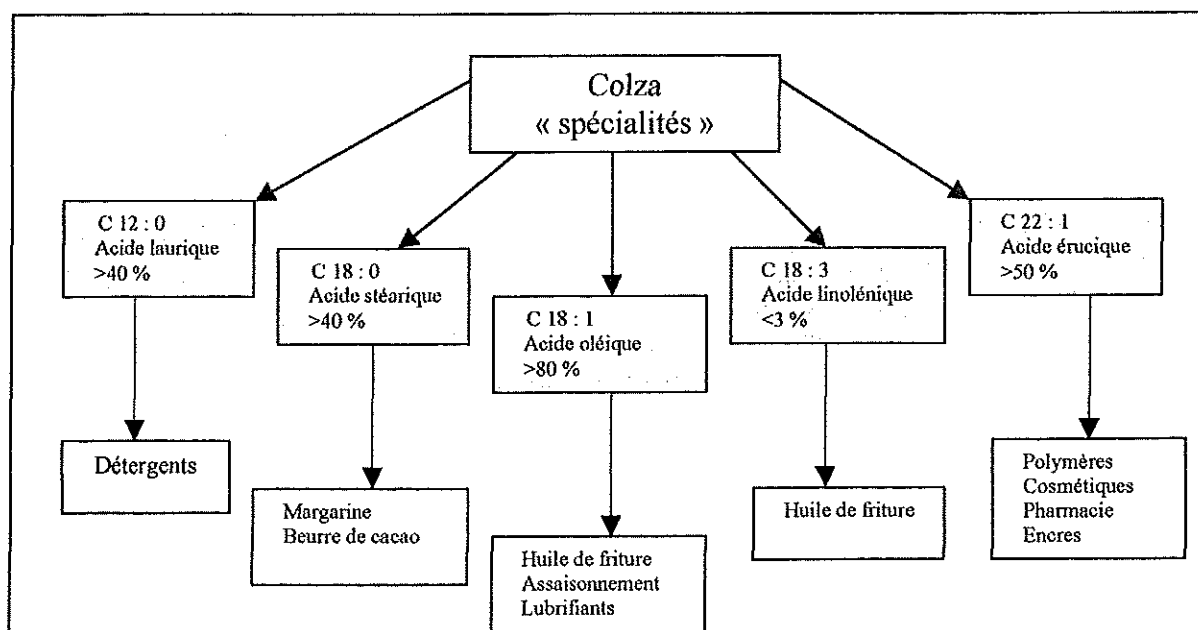


Figure 3 : principaux débouchés d'huiles de colza en fonction de leur profils en acides gras

L'industrie alimentaire (notamment la margarinerie, la pâtisserie et la confiserie) pourraient offrir des débouchés à certaines huiles de colza spécifiques, riches en acide stéarique. De telles huiles pourraient avantageusement remplacer les huiles hydrogénées et inter-estérifiées (techniques chimiques de stabilisation d'huile). De même, des variétés de colza à teneur abaissée en alpha linolénique pourraient élargir le champs d'application de l'huile, notamment par les industries alimentaires. Enfin, certaines compositions particulières en acides gras, à destination d'une alimentation spécifique (adaptée à une pathologie, compléments nutritionnels, laits infantiles...), laissent entrevoir d'autres débouchés à l'huile de colza qui pourrait rentrer, elle aussi dans l'univers des « alicaments ».

IV. Le tourteau de colza

A. Caractéristiques du tourteau

Constituant	Graine	Tourteau
Eau	6-8 %	10-12 %
Lipides	42-50 %	2-5 %
Protéines	17-25 %	30-45 %
Glucides	20-22 %	38-40 %
Dont fibres	15 %	30 %
Glucosinolates	5 % sauf variétés "00"	8 % sauf variétés "00"
Phénols et dérivés	1 %	1 %
Acide phytique	1 %	2 %
Cendres	6-8 %	10-12 %

Tableau III : Composition chimique moyenne du colza exprimée en % du poids sec (P.S.) (Appelquist, 1973a).

1. Les glucosinolates

Les glucosinolates constituent une famille de molécules connues depuis longtemps. La sinigrine a été isolée pour la première fois en 1840. Ils sont associés à une enzyme que l'on appelle myrosinase (Fenwick *et al.*, 1983). Sous l'action de cette enzyme, les glucosinolates sont dégradés en glucose, bisulfate et isothiocyanate (Figure 4).

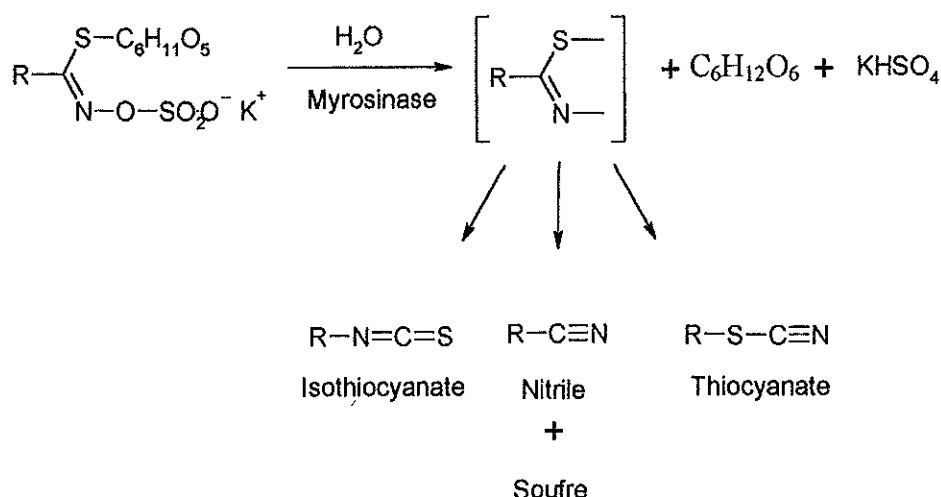


Figure 4 : Dégradation des glucosinolates par la myrosinase (Fenwick et al., 1983).

Les glucosinolates sont des composés caractéristiques des crucifères. Il en existe un nombre important dans le colza mais les deux principaux sont la gluconapine et la progoitrine (Figure 5).

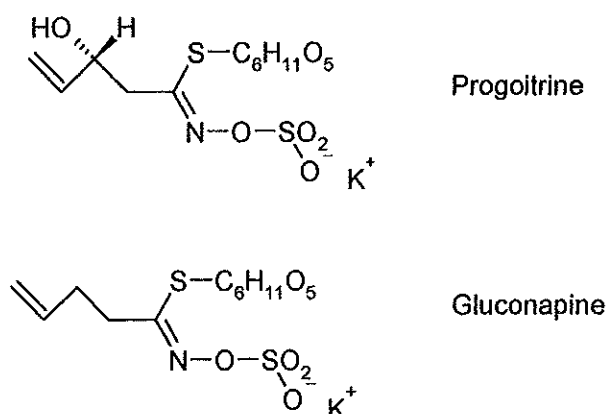


Figure 5 : Structure des principaux glucosinolates du colza (Wathelet et al., 1995).

Les glucosinolates sont solubles dans l'eau, l'éthanol, le méthanol et l'acétone mais le maximum de solubilité est atteint dans des mélanges eau/solvant contenant 10 à 20 % d'eau (Josefsson, 1973). Les produits de dégradation sont solubles dans des solvants comme l'éther ou le chloroforme. La toxicité de ces composés vient surtout de leurs produits de dégradation et en particulier l'isothiocyanate. Ce composé cause des hypertrophies de la thyroïde (Nordfeldt *et al.*, 1954; Jongen, 1996). Les glucosinolates en eux-mêmes ne sont pas toxiques tant qu'il n'ont pas été soumis à l'action de la myrosinase ou d'une autre enzyme du même

type. L'inactivation de la myrosinase a été pendant quelques temps une méthode utilisée pour éliminer la toxicité du tourteau de colza. Pour cela, un traitement à 90°C pendant 15 minutes est suffisant (Appelquist et Josefsson, 1967). Cependant, les glucosinolates ne sont pas éliminés par cette méthode et, dans le cas d'une utilisation alimentaire du tourteau, l'ajout d'autres produits issus de l'agro-alimentaire peut entraîner l'exposition à des enzymes analogues de la myrosinase. L'utilisation de variétés sans glucosinolates a permis de résoudre ce problème. Ces variétés, descendant toutes de la variété Bronowski, ont un très faible taux de glucosinolates, inférieur à 0,2 % du tourteau contre plus de 6 % pour les autres variétés avec glucosinolates.

2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques représentent 0,6 à 1,2 % de la graine de colza (Kosłowska *et al.*, 1983). Ils sont majoritairement sous la forme d'acide phénolique et de tannins condensés. Le colza comporte près de 30 % de plus de ces composés que la plupart des autres oléagineux. Ce sont des composés importants car ils participent pour beaucoup au goût amer, à l'astringence ainsi qu'à la couleur noire des produits à base de tourteau de colza (Shahidi et Naczki, 1992). De plus, ils sont susceptibles de former des complexes avec les protéines réduisant l'intérêt nutritionnel et technologique de ces dernières (Naczki *et al.*, 1998).

L'acide phénolique majoritaire est l'acide sinapique (Figure 6). Il représente 75 % des acides phénoliques libres (Naczki *et al.*, 1992). Les autres acides phénoliques sont entre autres, les acides coumarique, vanillique, gentisique, hydroxybenzoïque, caféique (Naczki *et al.*, 1998). Les acides phénoliques libres ne représentent que 20 % de l'ensemble des composés phénoliques. En majorité ils sont plutôt sous une forme estérifiée, dont la base est majoritairement l'acide sinapique (90 %). Ces esters sont connus comme étant les sinapines. Dans le colza, le représentant majeur de cette famille est la sinapine (Figure 6). La sinapine rentre dans le métabolisme de nombreux composés dont les flavonoïdes (Tzagoloff, 1963). Les phénols se lient aux protéines par des liaisons hydrogènes (groupement OH des phénols) ainsi que par des liaisons hydrophobes (noyaux aromatiques) (Rubino *et al.*, 1996). Les complexes phénols/protéines ont des propriétés très différentes des protéines isolées et ont tendance à former des gels (Rubino *et al.*, 1996). On retrouve dans ces complexes plus de 7

mmol de phénol par g de protéine (Naczki *et al.*, 1998). Ces complexes sont cependant souvent réversibles et peuvent être évités lors de l'extraction par la présence de sels à des concentrations assez élevées (supérieure à 0,75 M de NaCl) et à des pH basiques (Rubino *et al.*, 1996).

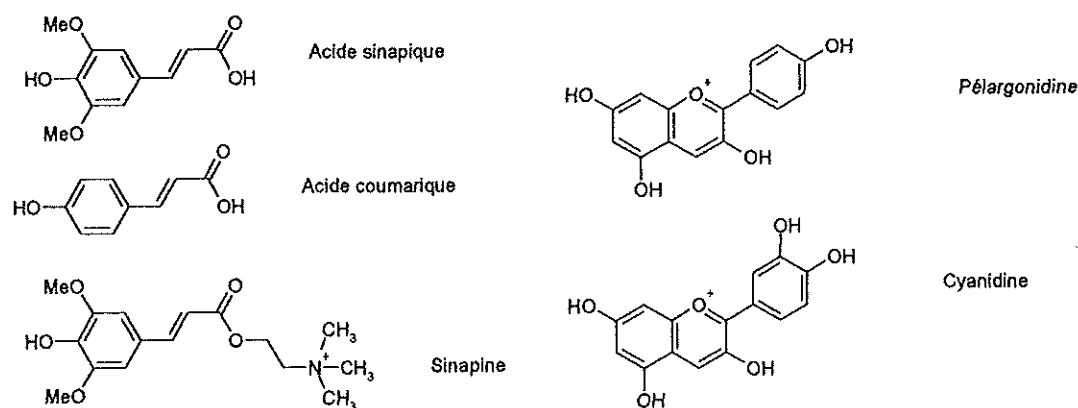


Figure 6 : Structure des composés phénoliques majoritaires de la graine de colza (Durkee, 1971).

Les tannins, qui sont aussi des composés phénoliques, représentent près de 3 % de la farine de colza (Clandinin et Heard, 1968). Ce sont des complexes phénoliques ayant une masse comprise entre 500 et 3 000 Da (Naczki *et al.*, 1998). Ils sont localisés principalement dans l'enveloppe de la graine. Les unités de base de ces tannins sont les pro-anthocyanidols correspondants aux cyanidine et la pélargonidine (Durkee, 1971)(Figure 6). Les tannins se complexent avec les protéines de façon irréversible et forment des précipités. Hagerman et Butler en 1978 (Hagerman et Butler, 1978) ont démontré qu'1 mg de tannin suffisait pour faire précipiter 40 g de BSA.

3. L'acide phytique

Les tourteaux de colza contiennent entre 1 et 1,5 % de phosphore dont 75 à 80 % se trouve sous forme d'acide phytique (Naczki *et al.*, 1986). L'acide phytique est une forme de stockage du phosphore et de l'inositol pour la graine (Figure 7). Ce composé, fortement chargé, peut se lier de façon mono ou divalente à des ions métalliques (Hallberg, 1987). Les complexes alors formés restreignent l'accessibilité des ions, ce qui diminue l'intérêt

nutritionnel du tourteau. De plus, l'acide phytique forme également des complexes avec les protéines. Il se lie aux résidus lysyl et arginyl et modifie ainsi la charge apparente des protéines. La zone de solubilité minimale des protéines devient alors plus large et le point isoélectrique semble être plus faible (Mothes *et al.*, 1990). Ces complexes sont stables à faible force ionique mais sont presque inexistants à des concentrations en NaCl supérieures à 0,25 M. A une concentration de 1 M en NaCl, les complexes sont totalement dissociés.

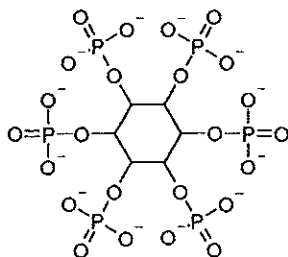


Figure 7 : Structure de l'acide phytique (hexaphosphate de myoinositol).

B. Utilisation du tourteau de colza

L'utilisation du tourteaux de colza en France est répartie de la façon suivante :

- 40 % pour l'alimentation des vaches laitières
- 40 % pour l'alimentation des porcs
- 10 % pour l'alimentation des bovins « viande »
- 10 % pour l'alimentation des volailles

Le tourteau de colza peut se substituer au soja avec lequel il est en concurrence. Obtenu à partir de variétés dites « doubles zéro » (comportent moins de 20 μmol de glucosinolates par gramme de graine soit moins de 15 μmol dans le tourteau, est compatible avec l'alimentation), il est dépourvu d'effet anti-nutritionnel et peut ainsi être incorporé à l'alimentation des porcs et des volailles. Il faut noter que le tourteau de colza bénéficie d'un bon équilibre en acides aminés, ce qui lui procure un avantage par rapport au soja, plus pauvre en méthionine, pour équilibrer les rations. Par ailleurs, sa richesse en sels minéraux permet de limiter les apports externes en minéraux qui entrent dans toute ration alimentaire.

En revanche, le tourteau de colza est moins concentré en protéines et moins énergétique que celui du soja. Il demeure pour cette raison moins bien adapté à l'alimentation des volailles qui sont des animaux à croissance rapide réclamant une alimentation concentrée en protéines.

En ce qui concerne l'alimentation des vaches laitières, le tourteau de colza présente en plus des avantages qualitatifs. Il abaisse le taux butyreux du lait sans en changer le taux de protéines. Il contribue ainsi à augmenter la valeur du lait dont les prix prennent en compte ces deux paramètres (taux butyreux et taux protéique). L'incorporation de colza aurait également un effet positif sur la quantité de lait produite.

V. Débouchés non alimentaires pour le colza

La production d'énergie et l'industrie chimique (des plastiques, des détergents, des lubrifiants, des solvants...) sont de gros consommateurs de produits pétroliers. La culture de colza et son utilisation non alimentaire comme ressource énergétique ou comme matière première pour l'industrie, permet de substituer une ressource fossile par une ressource agricole renouvelable. L'utilisation des ressources agricoles restitue sous forme de CO₂ du carbone préalablement stocké par les plantes. Le bilan « carbone stocké/carbone rejeté dans l'atmosphère » est alors équilibré. Lorsque l'on utilise une énergie fossile, le CO₂ rejeté dans l'atmosphère est supérieur au CO₂ absorbé, ce déséquilibre est responsable du réchauffement de la planète par le phénomène d'effet de serre. Un plus large recours aux biocarburants, en particulier contribuerait à enrayer sa progression.

A. Dans le domaine pétrolier

Les biocarburants à destination des moteurs diesels sont produits à partir d'huiles végétales. Ils présentent un excellent profil environnemental et des avantages techniques notables.

Les huiles végétales ont des caractéristiques physico-chimiques différentes de celle du gazole routier (indice de cétane et viscosité notamment). Afin de pouvoir la substituer aux produits pétroliers, l'huile végétale (triglycérides essentiellement) doit subir une transestérification : en présence d'un catalyseur alcalin, 1 tonne de triglycérides réagissent avec 0,1 tonne de méthanol pour fournir 0,1 tonne de glycérine et 1 tonne d'ester méthylique. Cet ester méthylique d'huile végétale est communément appelé DIESTER[®], nom issu de la contraction de « diesel » et « ester » et déposé par SOFIPROTEOL. Le Diester[®] contient 11 % d'oxygène pour favoriser la combustion du carburant dans les moteurs, il a aussi les particularités d'être

inodore, non toxique et biodégradable à plus de 98 % en 21 jours. Des expérimentations menée par l'Institut Français du Pétrole (IFP) ont montré que l'incorporation de Diester® à la hauteur de 2 % améliore significativement le pouvoir lubrifiant du gazole et permet de diminuer la teneur en soufre (agent lubrifiant), responsable des pluies acides. Cette absence de soufre améliore, de plus, le fonctionnement des pots catalytiques.

Depuis plus de 10 ans, PROLEA, en collaboration avec les pouvoirs publics, l'IFP, l'ADEME, les groupes pétroliers et les constructeurs automobiles, mènent des expérimentations et des études. La filière a choisi de s'orienter vers l'utilisation d'un mélange Diester®-produit pétrolier, ne nécessitant aucune adaptation technique des moteurs. Ainsi, deux taux d'incorporation sont pratiqués :

- 5 % : maximum banalisé par les pouvoirs publics dans les stations services distribuant du gazole.
- 30 % : taux optimum pour profiter pleinement des avantages techniques et écologiques. Les véhicules de transports publics de nombreuses agglomérations françaises fonctionnent au gazole Diester® à 30 %.

Si l'on compare les émissions d'un mélange contenant 30 % de Diester® à celles du diesel, on constate une réduction des hydrocarbures imbrûlés de 15 %, une réduction du CO de 13 %, une réduction de 20 % des particules et pas d'augmentation des NO_x.

Le Diester® est particulièrement adapté à la navigation de plaisance. Son atout majeur est le respect de l'environnement marin. De plus, les fumées dégagées sont propres : dépourvues d'odeurs et de suies (noires)... pour mieux profiter de l'air marin.

Pour ses qualités de solvant biodégradable non toxique, le Diester avait été recommandé par le CEDRE pour nettoyer les rochers souillés par le fioul de l'Erika. 6000 tonnes ont été utilisées comme fluidifiant biodégradable pour pomper le fioul resté prisonnier dans l'épave de ce pétrolier.

Le bitume qui est utilisé pour la construction des routes est un sous-produit de la distillation du pétrole brut. Il nécessite l'emploi de fluxants, traditionnellement d'origine pétrolière, pour le fluidifier afin de le manier. Un fluxant d'origine végétale a été mis au point récemment : l'Oléoflux 18®. Il a l'avantage de ne pas s'évaporer lors du refroidissement du bitume et il n'émet pas de composés organiques volatils (COV) dans l'atmosphère,

conformément aux directives européennes sur la limitation des émissions de COV. En outre, ce nouveau fluxant, doté d'une température d'inflammation élevée, réduit les nuisances et accroît la sécurité sur les sites de production et les chantiers en évitant les risques d'accidents, les émissions de fumées et les dégagements d'odeurs désagréables et toxiques.

B. Des débouchés industriels très spécifiques de l'acide érucique

Les variétés de colza érucique ont été sélectionnés pour répondre à des besoins industriels très spécifiques (Tableau I et Figure 3). Alors que la graine de colza alimentaire est totalement dépourvue d'acide érucique (agressif pour le myocarde), une graine de colza érucique en contient plus de 50 % de l'ensemble des acides gras. Cet acide gras est utilisé comme additif ou comme produit intermédiaire pour l'industrie dans les secteurs suivants : les détergents (agent de graissage des métaux, savon doux, retardateur de mousse), les lubrifiants, les dispersants, les émulsifiants, les cosmétiques (savons et crèmes hydratantes) et les plastiques (amélioration des propriétés de fusion et de résistance).

VI. Les voies de recherche pour le colza

A. Botanique

Classification (www.ncbi.nlm.nih.gov) : Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta ; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Rosidae; Eurosids II; Brassicales; Brassicaceae; Brassica

Description



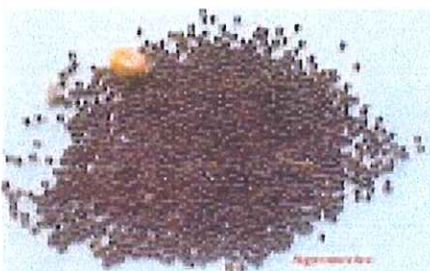
Plante annuelle fourragère et oléagineuse, caractérisée par :

- une racine grêle ;

- des feuilles à nervure centrale claire et épaisse, profondément lobées à la base, de forme ovale au sommet ;



- des tiges florales portant des feuilles supérieures étroites et oblongues à la base des tiges de fleurs groupées ; des fleurs à 4 pétales en croix jaunes vifs en été



- des fruits : siliques (fruit sec déhiscent s'ouvrant par 4 fentes) contenant les graines ovales, 1 mm à 2,5 mm de diamètre, généralement colorés en jaune parfois rougeâtre.

B. Patrimoine génétique

Le colza est une plante dérivant de plusieurs espèces faisant toutes partie de la famille des Brassicacées (anciennement appelée Crucifères) (Tableau IV).

Nom botanique	Nom français	Nom anglais	Synonymes anglais	Nom allemand
<i>Brassica napus</i>				
s-e* <i>olifera</i>	Colza d'hiver	Winter rape	Oil rape,	Winterraps
<i>forma biennis</i>	Colza de printemps	Summer rape	Rapeseed Swede	Sommerraps
<i>forma annua</i>	Colza d'été		rape, Olseed rape	
<i>Brassica campestris</i>				
s-e* <i>olifera</i>	Navette d'hiver	Winter turnip rape	Rapeseed,	Winterrübsen
<i>forma biennis</i>	Navette de printemps	Summer turnip rape	Oil turnip	Sommerrübsen
<i>forma annua</i>	Navette d'été			
<i>forma annua</i> var. <i>chinensis</i>	Moutarde chinoise	Summer turnip rape	Chinese mustard	Chinasenf
	Pak-choi			
var. <i>pekinensis</i>	Chou chinois	Summer turnip rape	Celery cabbage	Chinakohl
	Pet-sai		Chinese kale	
var. <i>dichotoma</i>	Toria	Summer turnip rape	Toria	Toria
var. <i>trilocularis</i>	Sarson	Summer turnip rape	Sarson	Sarson
<i>Brassica juncea</i>	Moutarde brune	Brown mustard	Leaf mustard	Brauner senf
			Indian mustard	Sarepta senf

*sous-espèce

Tableau IV : Tableau : Espèces de crucifères de type Brassica (Bengtsson *et al.*, 1973).

Deux sous-espèces de colza, les colzas d'hiver et de printemps, sont les plus cultivées. Alors que les colzas de printemps sont semés en mars et récoltés en août, les colzas d'hivers sont semés beaucoup plus tôt vers septembre. Ils nécessitent, pour pouvoir germer, une température inférieure à 0° C pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines. Les colzas d'hivers sont très répandus en Europe alors que le Canada, gros producteur de colza, cultive principalement des colzas de printemps appelés canola.

Les relations génétiques entre les différentes crucifères sont expliquées par le triangle de U (Figure 8) du nom du scientifique japonais U, premier à avoir mis en évidence ces relations (U, 1935). Les espèces de base sont la moutarde noire, le chou et la navette. Ces trois espèces possèdent respectivement 8, 9 et 10 chromosomes. Par hybridation, on peut facilement obtenir artificiellement 3 nouvelles espèces dont le nombre de chromosomes est la

somme de celui des espèces de base. Ainsi le colza est un hybride naturel du chou et de la navette et possède 19 chromosomes.

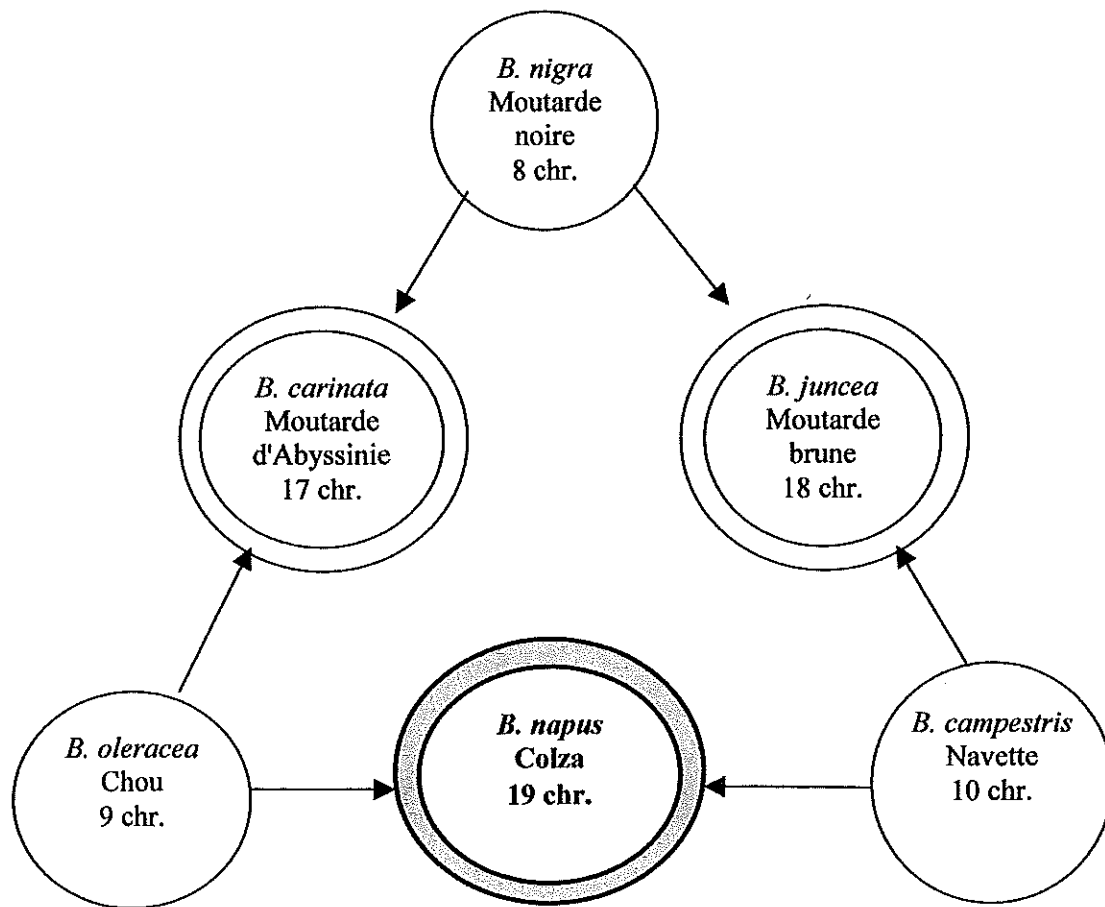


Figure 8 : Relations génétiques entre les crucifères (triangle de U) (U, 1935).

La sélection naturelle a, par la suite, conduit à un grand nombre d'espèces de crucifères. *Brassica oleracea* par exemple est à l'origine du chou, du chou frisé, du chou fleur, du chou de Bruxelles et de plusieurs autres espèces.

C. Principaux axes de recherche du colza

Les principaux axes de sélection travaillés aujourd'hui par les sélectionneurs français et européens s'articulent essentiellement autour des critères suivants :

- le potentiel de rendement et sa régularité
- la teneur en huile
- la résistance aux maladies, en particulier au phoma

- la tenue de la tige : alors qu'un plant de colza classique atteint 1,60 m à la floraison, il existe des variétés naines ne mesurant que 80 cm. Une première variété demi-naine (1,2 m à la floraison) a été commercialisée. Il s'agit d'un hybride issu du croisement d'une variété de taille classique avec une naine. Il présente l'avantage d'être plus résistant à la verse que les lignées classiques et l'agriculteur peut intervenir facilement avec son tracteur jusqu'à la récolte.

A plus long terme, les sélectionneurs travaillent également pour réduire les intrants et améliorer la qualité de l'huile et du tourteau. Les travaux d'identification et de caractérisation des gènes impliqués (cf le programme Génoplante) vont permettre de déboucher plus rapidement et de façon plus ciblée. Parmi les premières applications, on peut citer la composition en huile et en acides gras, pour la création de colza à usages spécifiques et un tourteau contenant très peu de glucosinolates et peu de cellulose (amélioration de la digestibilité par les monogastriques), la tolérance aux herbicides et la résistance aux insectes.

La sélection du colza est relativement récente et c'est pourquoi la génétique de cette espèce laisse entrevoir des potentiels en gains de productivité encore très importants. Déjà dans les parcelles d'expérimentation, les sélectionneurs enregistrent des rendements de plus de 60 q/ha (23 q/ha en 1962, 44,5 q/ha en 2000) et il n'y a pas actuellement de raisons pour que cette progression s'arrête.

Les sélectionneurs cherchent à exploiter plusieurs pistes :

- la sélection d'hybrides : le phénomène d'hétérosis (supériorité de l'hybride par rapport à ses parents) n'a pas encore été véritablement exploité sur le colza. Les chercheurs sélectionnent des lignées parentales pour leur aptitude à former des combinaisons performantes.
- La recherche d'une plus grande régularité de rendement par la sélection de plantes plus rustiques et plus résistantes aux maladies.
- Une modification de l'architecture des plantes. Les nouvelles variétés, aujourd'hui sont déjà plus courtes et dotées d'un appareil végétatif moins développé, évolution effectuée au profit d'un rendement en grain plus élevé.
- A terme, une modification du métabolisme des plantes : il n'est pas utopique de penser que les chercheurs réussiront grâce aux techniques de transfert de gènes, à jouer sur le métabolisme des plantes, sur le stockage des acides gras ou des protéines dans la graine

Le colza est doté d'un double génome puisqu'il est issu du croisement naturel d'un chou et d'une navette. L'introduction de gènes nouveaux par la voie du transfert de gènes est donc une opération bien plus délicate que pour des plantes à génomes simples comme le maïs ou le tournesol.

Les nouvelles techniques de génie génétique ont déjà permis deux applications sur le colza : la mise au point du système d'hybridation par stérilité mâle génique et la tolérance aux herbicides (glufosinate et glyphosate). Ces colzas génétiquement modifiés sont déjà cultivés depuis plusieurs années dans de grands pays agricoles, notamment au Canada.

Le moratoire de juillet 1998 reconduit en 2000 pour 2 ans, ne permet pas la commercialisation en France de variétés de colzas génétiquement modifiés. En attendant, il est primordial que les essais puissent se poursuivre afin de mieux appréhender la nature des éventuels impacts entre ces nouvelles variétés et l'environnement et afin de définir les meilleurs itinéraires culturels.

A moyen terme, les sélectionneurs travaillent sur la résistance aux maladies et sur la résistance aux insectes. Ils ont également engagé toute une série de travaux sur la qualité des huiles destinées à des usages spécifiques. Enfin, à plus long terme, ils espèrent pouvoir intervenir sur le métabolisme général des plantes en améliorant l'efficacité de l'absorption de l'azote par exemple ou en exploitant mieux l'énergie captée par la plante.

D. Un outil pour améliorer le colza : *Arabidopsis thaliana*

La recherche en génomique, en particulier le programme Génoplante va permettre de découvrir la fonction de gènes intéressants pour l'amélioration des plantes phare de l'agriculture européenne. Ces plantes, le maïs, le blé, le colza, le tournesol et le pois protéagineux ont des génomes de grande taille qui n'ont pas été séquencés, ils ne peuvent donc pas être étudiés par les techniques de génomique classique. Il est néanmoins possible de découvrir des gènes d'intérêt dans ces grands génomes par les techniques de génétique classiques. Une autre approche consiste à utiliser des plantes modèles qui possèdent un petit génome séquencé ; de plus, le nombre de gènes qu'ils contiennent est assez limité, ce qui permet une étude plus aisée. Deux plantes modèles sont actuellement utilisées : *Oriza sp.* (le riz) et *Arabidopsis thaliana*.

Depuis plus de 10 ans, les études de génétiques comparatives de plantes ont montré que l'organisation des gènes dans les génomes est conservée depuis des périodes d'évolution bien

plus longues que ce qui avait été imaginé (Gale et Devos, 1998). Si la colinéarité génétique est parfaite (distance génétique réduite, proximité génétique), il est possible d'isoler des gènes qui ont été localisés précisément sur des cartes génétiques d'espèces à grand génome par clonage positionnel sur des espèces à petit génome, tels que le blé et le riz ou le colza et *Arabidopsis* et la réciprocité est possible. Au niveau des Brassicacées, la colinéarité apparaît être extrêmement forte entre *Arabidopsis* et le Colza : il y aurait seulement 10 millions d'années de différence (Muller, 1981). *Arabidopsis thaliana* est donc un bon modèle d'étude du Colza.

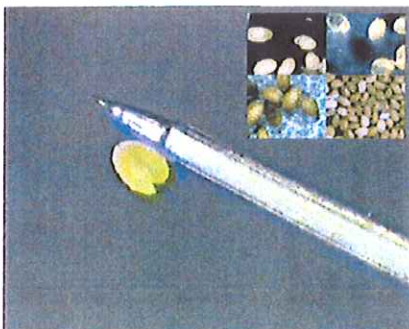
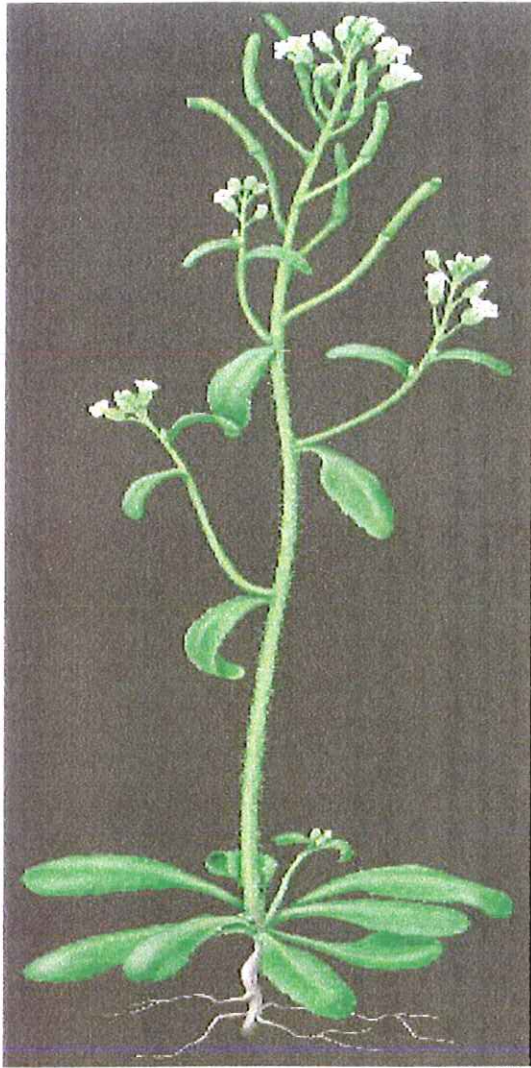
Durant les 8 à 10 dernières années, *Arabidopsis thaliana* est devenue un modèle universel pour la compréhension des aspects fondamentaux de la croissance et du développement des plantes, tels que la floraison, la croissance des racines, l'action des hormones ou encore la réponse à un stress environnemental (Meinke *et al.* 1998). Au début des années 80, une carte génétique détaillée a été ébauchée (Koornneef *et al.* 1983) et des publications mettant en évidence la valeur de cette plante pour des études de physiologie végétale, de biochimie et de développement (Meinke *et al.* 1979 ; Somerville *et al.* 1979). Puis deux avancées significatives ont suivies : l'établissement de protocoles de transformations (Lloyd *et al.* 1986) et la démonstration par Meyerowitz *et al.* en 1986 que son petit génome permettait des analyses moléculaires détaillées. De plus, cette plante se développe, se reproduit et répond aux stress et à la maladie mieux que la plupart des plantes de culture. *Arabidopsis* pousse facilement en laboratoire sur des milieux simples et produit beaucoup de graines ; ce qui autorise les études génétiques à grandes échelles, impliquant souvent plusieurs dizaines de milliers de plants (www.nsf.gov). Les objectifs à long terme des biologistes sont de déterminer les fonctions et les localisations des gènes-clés dans le fonctionnement de la plante, afin de résoudre des questions concernant l'évolution des organismes eucaryotes et l'évolution de la cellule commune (Meinke *et al.* 1997).

ARABIDOPSIS THALIANA

I. La plante : *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn

Classification (www.ncbi.nlm.nih.gov) : Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta ; Spermatophyta; Magnoliophyta; Eudicotyledons; Rosidae; Eurosids II; Brassicales; Brassicaceae; Arabidopsis





Noms communs: Arabette des dames (mouse-ear cress ou thale cress en anglais)

Origine : Europe et Asie mais on la trouve aussi sur le continent américain.

Milieu écologique : zones cultivées, talus, dunes, murs, friches... partout, c'est une vraie « mauvaise herbe » ! Plante très prolifique (plusieurs dizaines de milliers de graines par individu) ; une forte densité de population (1000 individus/m²) n'altère pas le cycle de reproduction.

Caractéristiques morphologiques :

Taille adulte : 10-15 cm

Racine pivotante courte, de structure simple et n'établissant pas de relations symbiotiques avec des bactéries fixant l'azote

Rosette de feuilles de 2 à 5 cm de diamètre au raz du sol, feuilles alternes, recouvertes de petits poils unicellulaires.

Inflorescences en grappes

Fleurs caractéristiques de la famille : à symétrie bilatérale comprenant 4 sépales verts, 4 pétales blancs disposés en croix, 4 étamines et 1 gynécée (2 carpelles), et mesurant 2 mm de long

Les fruits sont des siliques de 30 à 50 mm comprenant 30 à 60 graines de 500 µm, électrostatiques à maturité.

Cycle de développement : court, environ 2 mois en conditions optimales, pouvant s'accomplir entièrement in vitro. Les plantes fleurissent au bout de 4 semaines.

Mode de reproduction : essentiellement par autofécondation mais il est possible de réaliser des croisements en déposant du pollen directement sur le stigmate.

Génome : 5 chromosomes constitués de 125 Mpb, soit 4 fois moins que le Riz, 20 fois moins que le Maïs ou qu'*Escherichia coli*. Pruitt et Meyerowitz (1986) ont montré une très faible redondance dans ce génome.

Plus de 200 écotypes ont pu être isolés dans de nombreux écosystèmes d'Europe et d'Asie. Ils se sont tous remarquablement bien adaptés à leur environnement, en particulier au niveau de leur floraison (www.user.imaginet.fr/~pol/2cul-ara.htm et www.inra.fr).

II. Mutants

Pour analyser des gènes, les principales techniques développées consistent à modifier le patrimoine génétique (créer des mutants) et à étudier les conséquences pour la plante. Des techniques simples de mutagenèses chimiques ou d'insertions ont été employées. Des collections énormes de mutants avec différents phénotypes ont été constituées ainsi que des cartes chromosomiques de gènes mutants et de marqueurs moléculaires (Koncz *et al.* 1992 ; Martinez-Zapater, 1998).

A. Historique de techniques de mutagenèses

La fréquence de mutation spontanée chez *Arabidopsis* est faible et varie de 0,01 à 3 % selon les investigations. En dépit de cette caractéristique, cette plante répond très bien aux différents mutagènes (Koncz and Rédei, 1994).

1. Mutagénèses

Reinholz en 1945, en utilisant des faibles doses de rayons-X, obtient un taux de mutation 3 à 4 fois supérieur au taux de mutation spontanée. Ses expérimentations révèlent que des doses de 2 000 kR empêchent la germination des graines sèches (matures). Aujourd'hui, les mutations induites par rayons-X sont devenues des outils valables pour le développement des méthodes d'isolement de gènes de la génomique soustractive (Shirley *et al.* 1992 ; Sun *et al.* 1992).

Dans les années 60, des agents mutagènes chimiques sont employés. L'éthylméthane sulfonate (EMS), un agent alkylant fut le premier appliqué sur *Arabidopsis* par Röbbelen (1962) et McKelvie (1963) utilisèrent l'EMS et l'éthylèneimine. L'EMS est considéré comme un « supermutagène » car il est hautement mutagène sans provoquer trop de cassures des chromosomes ; bien que d'autres produits aient été utilisés, l'EMS reste une référence.

2. Transgénèses

La première transformation génétique, décrite par le terme de transgénèse fut réalisée par Doy *et al.* en 1973, il s'agissait du transfert et de l'expression du gène de la β -galactosidase d'*E. coli*. Le transfert direct d'ADN dans des protoplastes de plantes, employant un plasmide Ti d'ADN est réalisé avec succès en 1980 par Davey *et al.* sur le Pétunia puis appliqué à *Arabidopsis* en 1989. Bien que la transformation de protoplaste ait été le moyen le plus utilisé pour transférer des gènes dans les années 80, aujourd'hui les vecteurs de transfert de gènes utilisés sont des plasmides Ti ou Ri d'ADN-T d'*Agrobacterium*. *Agrobacterium tumefaciens* est un pathogène végétal qui induit la crown-gale ou tumeur bactérienne au collet (crown gall en anglais) grâce à un plasmide. En 1974, le laboratoire de Schell démontra que la tumeur induite par *Agrobacterium* est due à son grand plasmide Ti (Van Larebeke *et al.* 1974) et Chilton *et al.* en 1977 ont montré que la formation de la crown-gale est la conséquence directe de l'incorporation de l'ADN-T de ce parasite dans le génome de la plante : le plasmide s'intègre de manière aléatoire dans le génome de la cellule végétale (hôte) ; cette cellule-hôte va l'exprimer, ce qui aura pour conséquence sa différenciation (tumorigénèse), qui fournira une niche écologique à la bactérie. Les techniques de biologie moléculaires permettent de modifier génétiquement ces plasmides Ti de manière à y intégrer des gènes de résistance à

des antibiotiques (kanamycine, chloramphénicol, méthotrexate...) qui permettront de sélectionner les plantes génétiquement modifiées (celles qui poussent sont celles qui ont intégré le plasmide porteur du gène de résistance) (Herrera-Estrella *et al.* 1983).

B. Applications

La transformation d'*Arabidopsis* avec ces vecteurs (plasmides Ti désarmés, c'est à dire que les gènes induisant la différenciation de la cellule hôte et donc induisant la tumeur sont supprimés ; il ne reste sur le plasmide que les gènes permettant son insertion) a commencé relativement tard. La première transformation fut publiée en 1986 par Lloyd, travaillant pour le groupe Monsanto (Lloyd *et al.*, 1986), de nombreuses autres plantes transgéniques d'*Arabidopsis* ont ensuite été produites par infection des feuilles, bourgeons et racines. Un protocole très efficace a été mis au point dans le laboratoire de Pelletier et Caboche pour obtenir de grandes quantités de mutants (Bechtold *et al.* 1993). C'est ce laboratoire qui, dans le programme Génoplante, fournit les mutants d'*Arabidopsis*. Cette technique se pratique sur les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (F₀) en début de floraison. Celles-ci sont soumises à une infiltration sous vide pendant vingt minutes dans une suspension d'Agrobactérium génétiquement modifiés au niveau de leur plasmide Ti puis les plantes sont mises en culture jusqu'à la maturation des graines. Celles-ci sont récoltées et semées sur du sable contenant l'antibiotique. Les plantes qui se développent (F₁) sont celles qui ont intégré le plasmide. Ensuite, les fleurs s'auto-fécondent naturellement et les graines sont récoltées pour être analysées. 4 à 5 transformants peuvent être obtenus par plante F₀ ainsi traitée. La sélection des mutants affectés dans leur remplissage s'effectue d'après un caractère phénotypique de la graine par observation au microscope qui permet de choisir les graines avec un aspect ridé.

L'inconvénient de ce type de mutagenèse est qu'elle est aléatoire : l'insert peut s'intégrer dans un gène (au sens large du terme) actif, inactif ou dans une partie non codante. Ainsi une insertion peut passer inaperçue si elle ne touche pas un gène actif : il faut donc créer beaucoup de mutants avant d'en trouver un qui possède un caractère phénotypique intéressant. Par contre, le gros avantage de cette technique est qu'elle permet de localiser facilement la (ou les) insertions et surtout de déterminer le gène muté. L'équipe de Caboche et Lepiniec (Balzergue *et al.* 2001) utilisent la technique de PCR-walking (Figure 9) : l'ADN génomique est digéré par des enzymes de restriction, puis des adaptateurs asymétriques sont accrochés

aux digestats par ligation et enfin une PCR (une amorce correspondant à l'adaptateur et une autre au T-DNA) amplifie le morceau du gène qui était entre l'insert et le site de restriction ; il reste ensuite à séquencer l'amplicon, et rechercher dans les banques à quoi correspond la séquence inconnue.

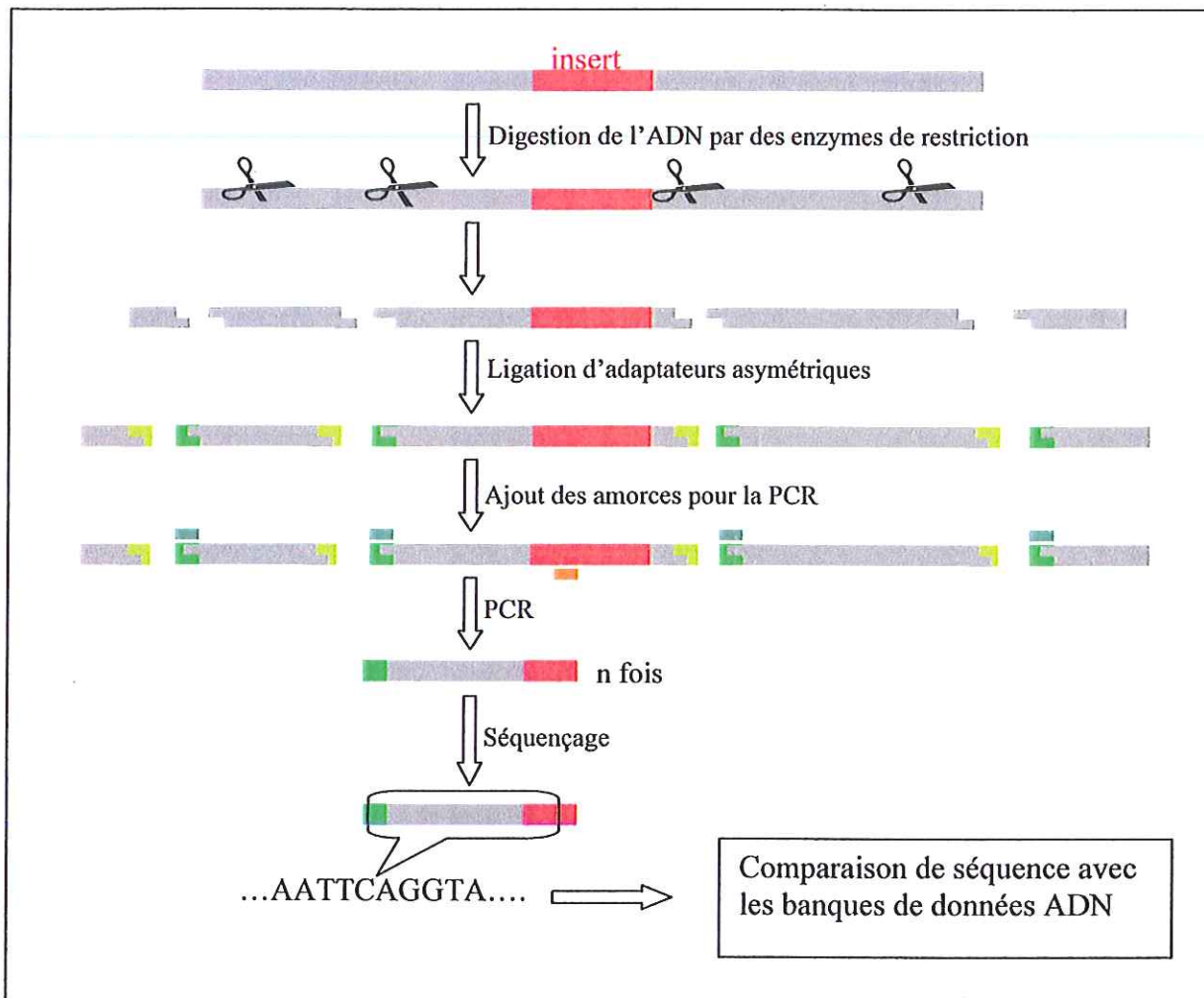


Figure 9 : schéma de la PCR-walking suivi du séquençage, technique utilisée par Caboche et Lepiniec pour déterminer le gène dans lequel se situe un insert

III. Maturation de la graine

Les graines d'*Arabidopsis*, comme celles des autres crucifères sont produites dans des fruits appelés siliques. Chaque silique est constituée de deux carpelles et d'un septum central (replum) qui sépare deux rangées de graines. Les graines sont attachées au replum par le funicule qui guide le tube pollinique lors de la fécondation et qui sert ensuite à apporter les nutriments pour le développement embryonnaire. *Arabidopsis*, dans des conditions optimales de croissance produit des siliques contenant 40 à 60 graines. Les graines sauvages, mesurent 500 μm de long et pèsent à peine 20 μg à maturité (sèches).

A. Aspect embryogène

Chez *Arabidopsis thaliana*, le développement de la graine s'étale sur 28 jours après la floraison. Ce développement peut être divisé en 3 grandes périodes : une phase d'embryogénèse-morphogénèse jusqu'au 7^{ème} jour après la floraison, suivie d'une phase de maturation jusqu'au 17^{ème} jour après la floraison et enfin une phase de maturation dite tardive. Un aperçu de l'embryogénèse et du développement de la graine est présenté sur la Figure 10. L'albumen (endosperm), habituellement tissu de réserve, dégénère durant les étapes du développement de l'embryon et n'est plus présent dans la graine mature.

Les protéines de réserve et les lipides, essentiels pour la germination, sont stockés dans les cotylédons embryonnaires.

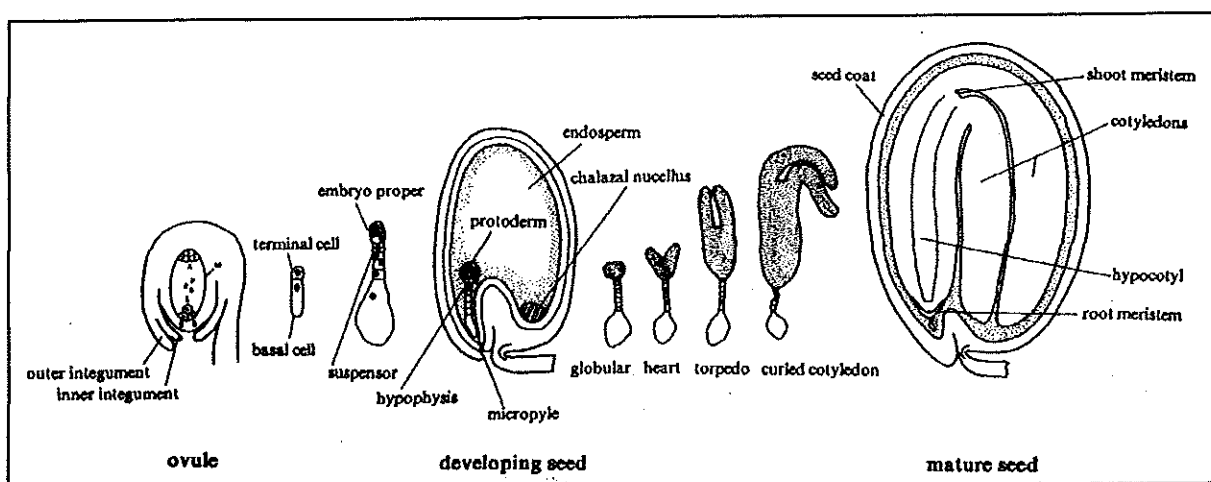


Figure 10 : aperçu de l'embryogénèse et du développement de la graine chez *Arabidopsis*. (d'après Castle et Meinke, 1993)

B. Aspect biochimique

La Figure 11 représente le développement de la graine sous un aspect biochimique. La graine ne contient que transitoirement de l'amidon et ses réserves sont constituées d'huile et de protéines. Elles commencent à être accumulées à partir du 7^{ème} jour, c'est aussi à partir de ce moment-là que la graine commence à se déshydrater.

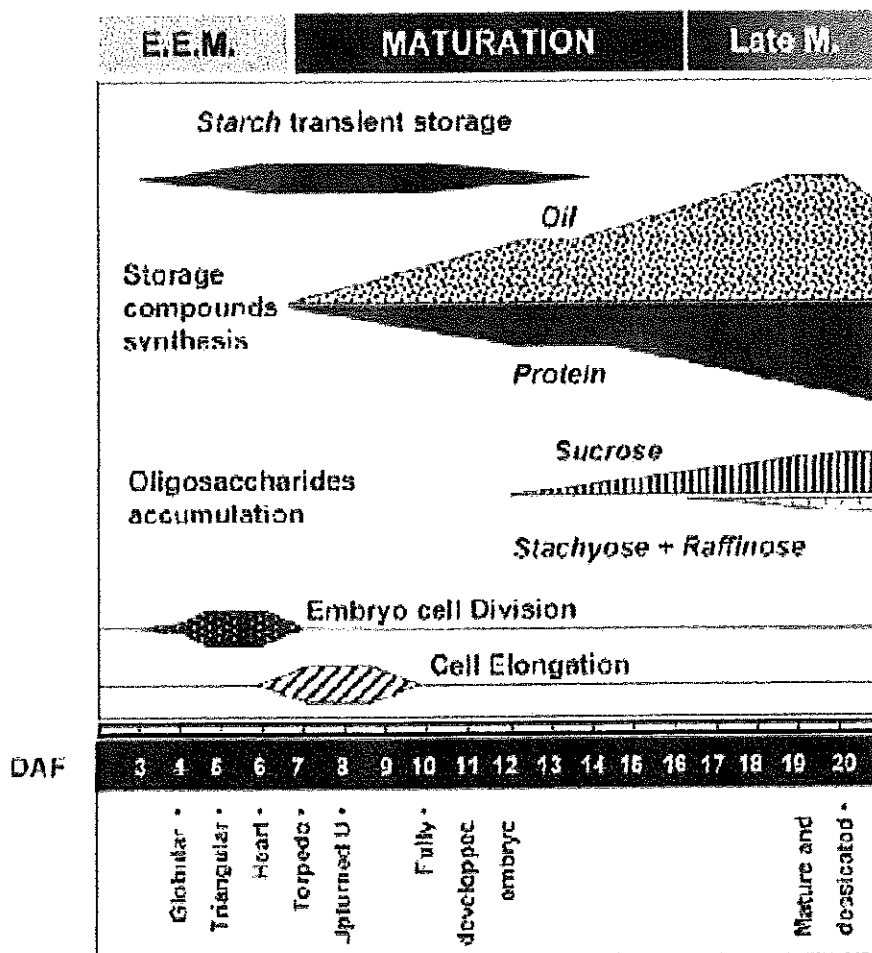


Figure 11 : schéma synthétique de la maturation de la graine d'Arabidopsis d'après ses caractéristiques biochimiques (Baud *et al.*, 2002). (EEM : étape de maturation précoce, DAF : jours après floraison, starch : amidon)

IV. Les protéines de réserve de la graine

A. Généralités

La graine comprend 3 éléments : le tégument, l'embryon et les réserves. La plupart des plantes synthétisent des protéines afin de constituer des stocks d'azote, de soufre et de carbone. Dans un petit nombre de cas, ces protéines sont synthétisées dans des tissus végétatifs et stockées entre les périodes de croissance ou en prévention de déficiences en nutriments. Cependant, dans la grande majorité des plantes, le stockage apparaît seulement dans les organes de reproduction, de propagation et de dispersion (graines, pollens, ...). La germination de tels tissus peut être accompagnée d'une protéolyse générale. Les graines accumulent des protéines de stockage dans des vacuoles de cellules de l'embryon ou de l'albumen pendant la maturation. Dans la plupart des espèces de plantes, l'albumen est le principal tissu de réserve de la graine ; les lipides et protéines sont stockés sous forme de vésicules. Dans des espèces légumineuses comme le pois ou le haricot, les cotylédons sont sur-développés et acquièrent une fonction de stockage. Les protéines de réserves sont abondantes en nombre mais pas diversifiées en structure.

B. Classifications

La première étude systématique réalisée par Osborne date de 1924. Il classe les protéines de la graine en 4 groupes en fonction d'un critère de solubilité : les albumines, les globulines, les prolamines et les gluténines.

- Les albumines sont des protéines solubles dans l'eau et qui coagulent par chauffage. Elles sont principalement observées dans les oléagineux et protéagineux et aussi, mais en quantité bien moindre, dans les céréales.
- Les globulines sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solutions salines. Elles sont présentes dans la plupart des graines en quantité variable.
- Les prolamines sont solubles dans des solutions hydro-alcooliques à 60-70% mais insolubles dans l'eau et les solutions salines. Ces protéines, riches en proline et résidus amidés (Asn et Gln), sont retrouvées essentiellement dans les céréales.
- Les gluténines sont insolubles dans l'eau, les solutions salines et les solutions hydro-alcooliques, par contre, elles sont extractibles par des solutions alcalines. Ces protéines sont présentes dans le blé, le maïs et le riz.

Malgré son ancienneté, cette classification est encore très utilisée et utile dans le cas d'un fractionnement sélectif.

Cependant, une autre classification a été récemment développée, basée sur la fonction des protéines (Shewry et Casey, 1999). Elle comprend 3 groupes : les protéines de réserves, les protéines structurelles et métaboliques et les protéines de protection.

- Les protéines de réserve ont pour fonction générale de stocker l'azote, le carbone et le soufre. Elles sont quantitativement majoritaires dans la graine.
- Les protéines structurelles et métaboliques, appelées aussi protéines constitutives sont essentielles pour le développement, la maturation et la germination de la graine.
- Les protéines de protection jouant un rôle dans la résistance aux agents pathogènes, aux insectes ou encore à la dessiccation.

C. Localisation cellulaire

Les protéines de réserve sont localisées principalement dans des vacuoles de petites tailles généralement, appelées corpuscules protéiques.

Les protéines de réserve appartenant aux globulines et albumines sont synthétisées sous forme de précurseur par le réticulum endoplasmique rugueux (polysomes) et ensuite, dans la plupart des cas, sont transportées aux vacuoles de stockage via l'appareil de Golgi (Chrispeels *et al.*, 1982 ; Hinz *et al.*, 1999). Quant aux prolamines, elles s'agrègent dans la lumière du réticulum endoplasmique, et forment les corps protéiques. Dans ce cas, ces corps protéiques sont des vésicules issues directement du réticulum (Mifflin, 1981).

D. Biochimie

Chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines de réserve ont été étudiées la première fois par Heath *et al.* en 1986. Ces protéines ressemblent beaucoup à celles déjà connues dans les autres espèces de Brassicacées, notamment le colza. Les principales protéines sont des globulines et des albumines.

1. Les globulines 12S

Les globulines ou cruciférines représentent 50 à 55 % des protéines de la graine mature. Il existe 2 types de globulines qui se distinguent par leur coefficient de centrifugation, les 12 et 7S. Ces dernières sont absentes des Brassicacées, en particulier du colza et d'Arabidopsis, par contre, elle représentent une part importante des protéines de réserves des légumineuses. Les globulines 12S (300 kD environ) sont formées de six sous-unités agencées en hexamères. Chacune de ces sous-unités (monomère) est constituée de deux polypeptides : alpha (acide, de 30 kD environ) et bêta (basique, de 20 kD environ), reliés par un pont disulfure. Les deux polypeptides sont issus d'un même précurseur ayant subi une protéolyse (Figure 12).

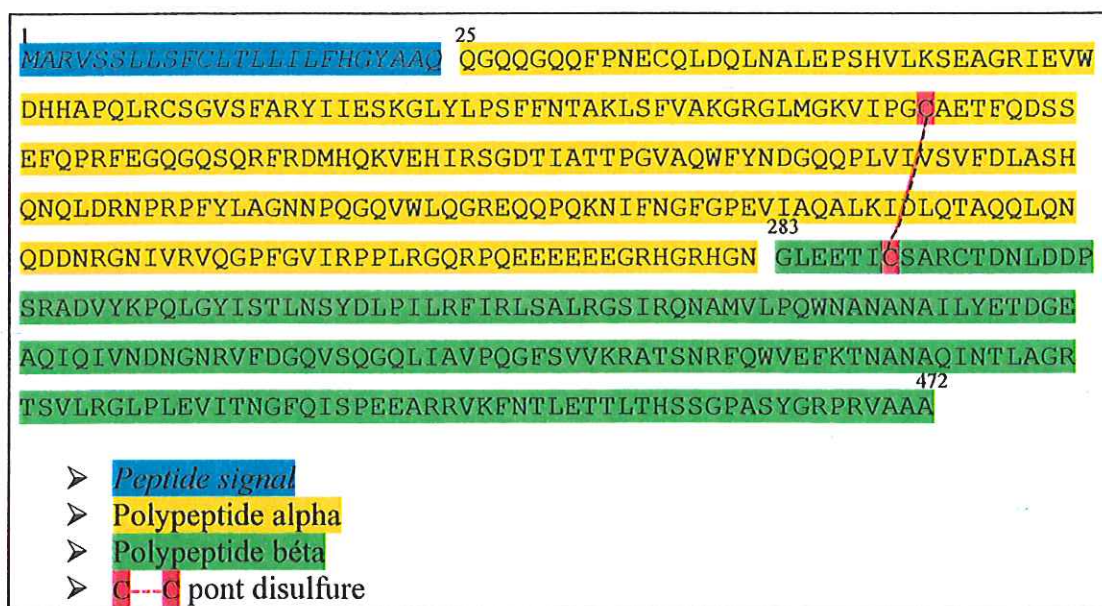


Figure 12 : séquence d'un précurseur de protéine de réserve 12S d'Arabidopsis thaliana (>sp|P15455|12S1_ARATH 12S SEED STORAGE PROTEIN PRECURSOR)

2. Les albumines 2S

L'autre type de protéines de réserve est une albumine 2S, appelée aussi arabine, semblable à la napine du colza. Ces 2S albumines existent dans les graines matures sous forme d'hétérodimères : les deux polypeptides de 3 kD (alpha) et de 9 kD (bêta) sont reliés par deux ponts disulfures. Ces deux polypeptides sont issus d'un même précurseur après protéolyse (Figure 13). Il en existe 4 voire 5 isoformes (van der Klei, 1993) chez *Arabidopsis thaliana*.

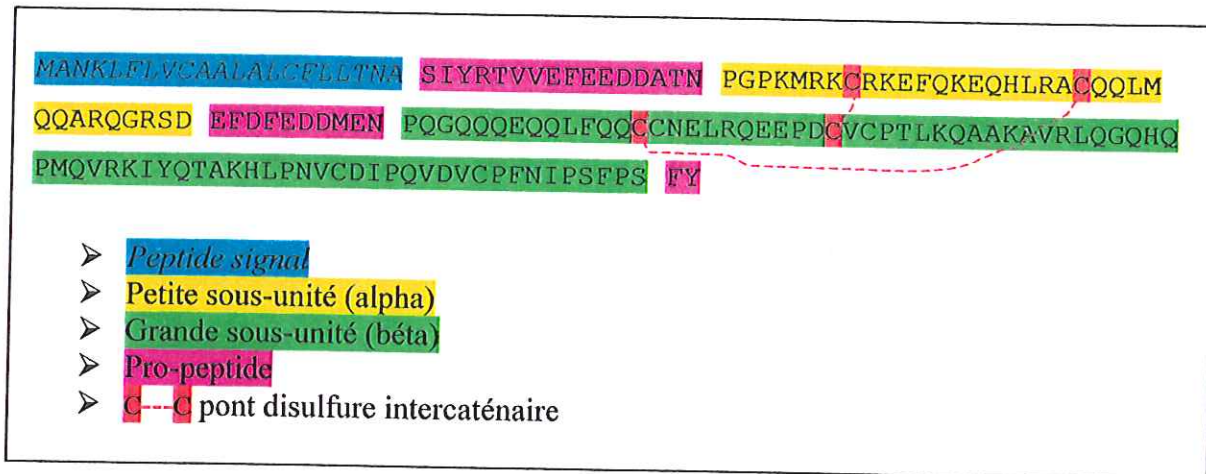


Figure 13 : Séquence d'un précurseur de protéine de réserve 2S d'*Arabidopsis thaliana*,(>sp | P15457 | 2SS1_ARATH 2S SEED STORAGE PROTEIN PRECURSOR)

La maturation du précurseur permet d'obtenir une protéine 2S sous une forme (schématisée dans la Figure 14), comportant 2 ponts disulfure inter-caténaux et 2 autres dans la grande sous-unité permettant de la maintenir repliée.

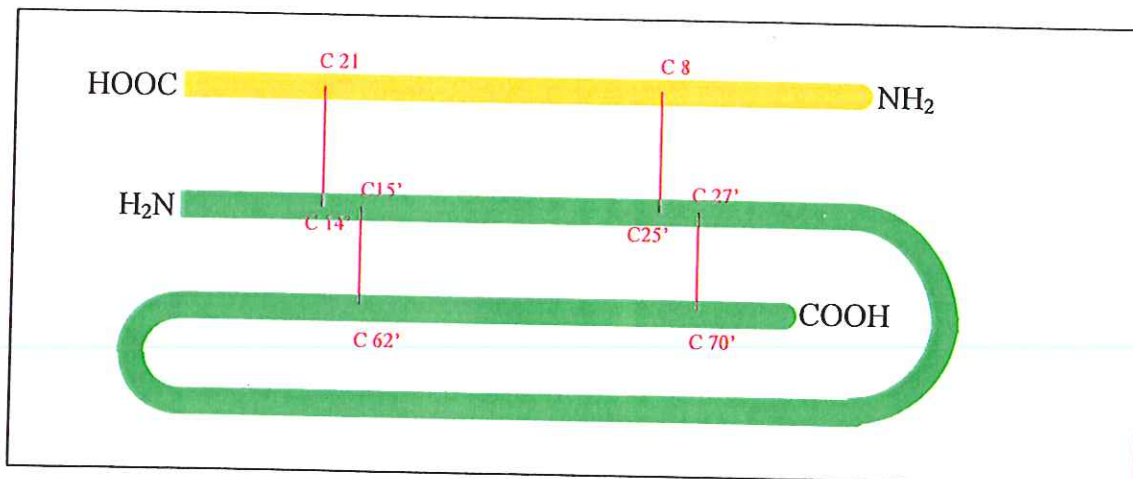


Figure 14 :Représentation schématique de la protéine de réserve 2S d'*Arabidopsis thaliana* issu du précurseur (>sp | P15457 | 2SS1) de la figure précédente.

Ces polypeptides précurseurs sont codés par des familles multigéniques, c'est-à-dire qu'ils sont des membres d'une famille de protéines voisines codées par un ensemble de gènes similaires. Ces familles multigéniques proviennent de la duplication et de la variation d'un gène ancestral. C'est ainsi qu'on explique la présence de différentes isoformes de ces protéines de réserves. Ces familles multigéniques existent partout dans la nature : actines, tubulines, hémoglobine, immuno-globulines, interférons...

En comparant les séquences des protéines 2S de colza avec celles des albumines 2S d'autres espèces assez proches comme *Arabidopsis thaliana*, les auteurs constatent que certaines des isoformes de napines sont plus proches des 2S d'*Arabidopsis thaliana* que des autres napines de colza (Figure 15) : *Arabidopsis thaliana* est donc un bon modèle d'étude du colza .

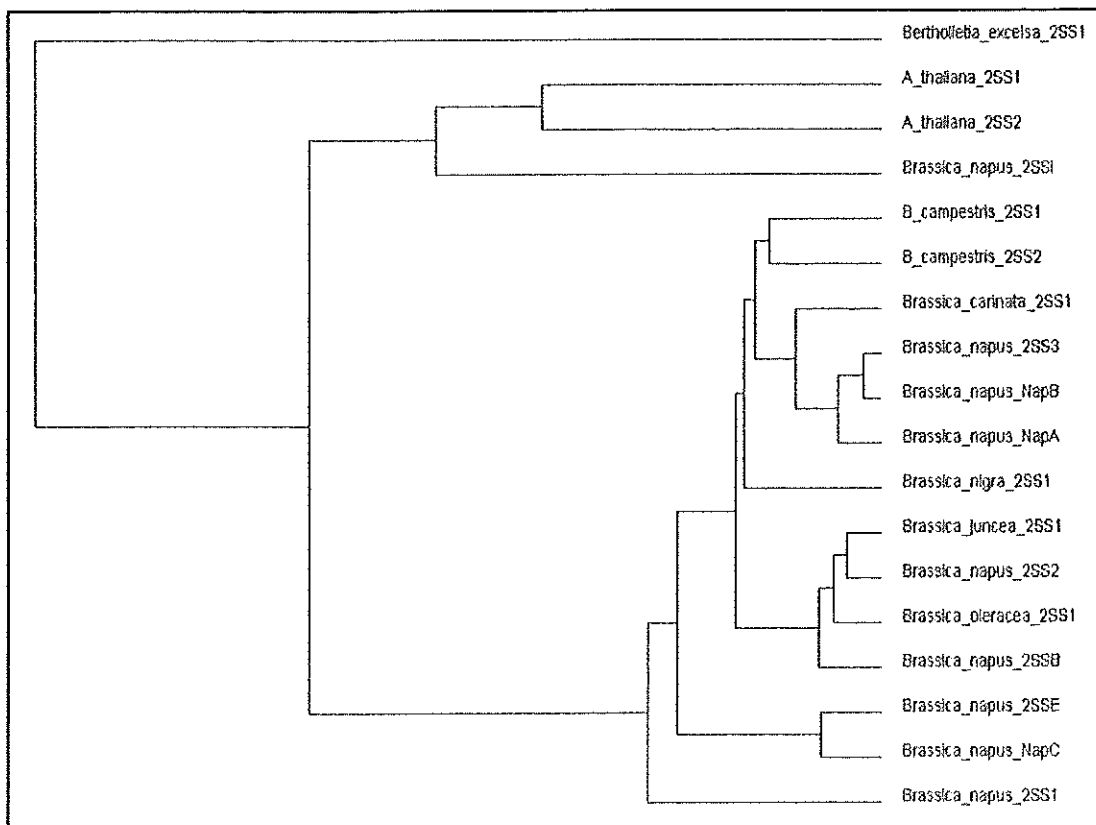


Figure 15 : : Arbre phylogénique des albumines 2S de type napine de colza (*Brassica napus*) (Barciszewski *et al.*, 2000), de navette (*Brassica campestris*), de chou (*Brassica oleracea*), de moutarde noire, brune et d'Abyssinie (*Brassica nigra*, *Brassica juncea* et *Brassica carinata*) (Dasgupta *et al.*, 1995), d'*Arabidopsis thaliana* (Krebbers *et al.*, 1988) et de la noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*) (Sun *et al.*, 1987).

V. Protéomique de graines d'Arabidopsis

A. Généralités sur la protéomique

Les progrès de la biologie moléculaire amènent aujourd'hui à considérer les applications pratiques des études post-génomiques. En effet, un gène unique peut générer une protéine unique, aucune protéine (pseudo-gène), ou plusieurs protéines (modifications post-traductionnelles, différences d'épissages des exons et de clivages protéolytiques). Cette situation a conduit depuis quelques années à l'émergence du concept de protéome. Le protéome est défini comme la concentration relative des produits du génome à un moment donné ainsi que la nature et l'étendue des modifications post-traductionnelles, ce qui ne peut pas être déduit de la connaissance de la séquence des gènes. Ainsi le génome contient toutes les instructions possibles, le transcriptome est le plan d'expression du génome et le protéome est la réalisation effective de ce plan. Or, entre le transcriptome et le protéome il y a peu de corrélation (0,5) car le taux de dégradation/renouvellement des ARNm diffère de celui des protéines.

La protéomique utilise la technique d'électrophorèse à 2 dimension (2-D) qui permet de séparer des protéines en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire. En utilisant cette approche, presque toutes les protéines cellulaires peuvent être isolées. Bien que la technique d'électrophorèse 2-D ait été mise au point par Klose et O'Farrell dans les années 70, ce n'est que dans les dix dernières années qu'elle a été nettement développée, en grande partie grâce aux évolutions récentes de la spectrométrie de masse qui permettent d'identifier les protéines extraites des spots de gels 2-D. Les protéines peuvent être aussi quantifiées par analyse d'image (quantification relative). La protéomique, comme la génomique ou la transcriptomique nécessitent des traitements de données conséquentes et ne seraient pas devenues ce qu'elles sont actuellement sans le développement en parallèle de la bioinformatique.

B. Protéomique de graines d'*Arabidopsis*

Actuellement, peu de travaux sur ce sujet ont été publiés et le seul digne d'intérêt est celui de Gallardo *et al.* 2001. Ces auteurs se sont intéressés à la germination des graines (germination stricto-sensu et émergence du radicule) lors de germination naturelle et après divers traitements industriels ; les protéines dont l'abondance variait étaient analysées au spectromètre de masse. La plupart de ces protéines séquencées étaient encore inconnues et n'ont pas de rôle encore bien identifié. Pour ce travail, l'objectif était d'obtenir des gels 2-D très chargés en protéines, de manière à pouvoir en observer un nombre relativement élevé. Sur environ 1300 spots, 74 varient (augmentent ou diminuent d'intensité) pendant la germination, et seulement 29 correspondent à des protéines connues. Ces résultats mettent en évidence que l'approche protéomique permet une investigation globale et précise d'un phénomène biologique par nature complexe.

Partie expérimentale

L'objectif du programme Génoplante est d'identifier des gènes qui permettront d'améliorer des « plantes phares » de l'agriculture européenne : le blé, le maïs, le colza, le tournesol et le pois protéagineux. Des études sont faites parallèlement sur les plantes de cultures elles-mêmes et sur des plantes modèles. Les connaissances obtenues à partir des plantes modèles devant être transposées aux plantes de grande culture.

L'un des thèmes de recherche sur le colza concerne les graines, parties principalement utilisées et valorisables de cette plante. L'objectif du travail est d'identifier des gènes impliqués dans la (les) voie(s) métabolique(s) du remplissage de la graine. Le moyen employé est l'utilisation d'*Arabidopsis thaliana*, comme modèle et en particulier des mutants affectés dans le remplissage de leur graine. Au sein de la collection de mutants de l'INRA de Versailles, quelques uns ont été sélectionnés d'après le phénotype ridé de leur graine : un aspect ridé indiquant une altération potentielle du remplissage (120 mutants ont été retenus). Ces graines ont été analysées par différents laboratoires sur des aspects biochimiques (lipides, glucides, glycoprotéines et protéines) afin de sélectionner des mutants les plus intéressants pour chacune des équipes, de manière à n'étudier attentivement qu'un nombre limité de mutants.

A l'URPVI, laboratoire s'intéressant aux protéines, en particulier au protéome de la graine, la sélection s'est effectuée en deux étapes : la première par électrophorèse à une dimension (1-D), méthode rapide et peu gourmande en matériel végétal, qui a permis de retenir une vingtaine de mutants affectés dans la composition protéique de leurs graines ; la seconde étape, à laquelle j'ai participé au cours de mon stage, vise à caractériser plus finement les compositions des graines de ces mutants. Pour cela, des outils méthodologiques ont été mis en place, outils qui ont permis de choisir les mutants présentant la plus grande variabilité dans leur composition protéique. Parallèlement à cette sélection, qui utilise la technique d'électrophorèse à 2 dimensions (2-D), une production d'anticorps polyclonaux est débutée.

I. Etude comparative de deux techniques de coloration en électrophorèse 2-D.

Modes opératoires de l'électrophorèse 2D

L'électrophorèse 2-D est une méthode d'analyse des mélanges complexes de protéines extraites de cellules, de tissus ou d'autres échantillons biologiques. Cette technique sépare les protéines selon deux propriétés indépendantes en deux étapes. La première dimension est une isoélectrofocalisation qui sépare les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). La seconde dimension est une électrophorèse sur gel SDS-PAGE qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire (PM). Ainsi, chaque tâche ou spot correspond à un type de protéines, caractérisé par un pI et un PM. En fonction de la taille et de l'intensité de coloration du spot, on peut avoir une idée de l'abondance de chaque type protéique.

Extraction

Les graines sont broyées avec un microbroyeur de verre de 100-1000 μ L (Poly Labo) dans 200 μ L de tampon de réhydratation en conditions réductrices (urée 8 M, CHAPS 2% (m/v), DTT 0.3 %, IPG buffer 0.5 %, ED et quelques grains de bleu de bromophénol). Les échantillons sont incubés 1 h à température ambiante, sous agitation pour faciliter l'extraction.

Isoélectrofocalisation (IEF)

350 μ L (250 μ g environ de protéines pour 25 graines) d'extrait sont déposés, en évitant de former des bulles d'air, au fond du support en céramique. Le gel de première dimension (Immobiline Dry Strip), après décongélation est glissé délicatement dans le support. Puis, après avoir chassé les éventuelles bulles d'air, il faut recouvrir le gel d'huile (IPG Cover Fluid) qui limitera l'évaporation pendant l'IEF. Le programme de l'IEF pour un strip IPG pH 3-10 L de 18 cm est détaillé dans le Tableau V.

Etape	Voltage	Temps
1	0 V	01 : 00
2	30 V	12 : 00
3	200 V	01 : 00
4	500 V	01 : 00
5	1000 V	01 : 00
6	8000 V	05 : 00
Total		21 : 00

Tableau V : programme d'IEF pour strip IPG pH 3-10 L de 18 cm

Equilibration du strip avant le SDS-PAGE

Si cette étape ne peut être réalisée juste après la fin de l'IEF, il est vivement conseillé de conserver le strip à -70°C ; sinon, les protéines risquent de diffuser dans le gel et les spots seront mal définis et difficiles à analyser. Le strip est placé 10 min dans un tampon d'équilibration en conditions réduites (tampon Tris-HCl à pH 8.8, 50 M, urée 6 M, glycérol 30% v/v, SDS 2% v/v, DTT 65 mM et quelques grains de bleu de bromophénol), puis encore 10 min dans le même tampon contenant de l'iodoacétamide à 135 mM à la place du DTT afin d'alkyler les résidus soufrés.

2^{ème} dimension : SDS-PAGE

Les gels utilisés sont constitués de 15% d'acrylamide et ont une épaisseur de 1.5 mm. Ils sont préparés la veille et conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ en atmosphère humide pour éviter qu'ils se déshydratent.

Le strip est posé sur sa tranche sur le gel de polyacrylamide, puis de l'agarose à 0.5% dans le tampon de migration est coulé par dessus afin de permettre le transfert des protéines entre le strip et le gel d'acrylamide. La migration s'effectue à 40 mA par gel dans un tampon contenant 25 mM de Tris-base, 192 mM de glycine et 0.1 % v/v de SDS.

Une fois la migration achevée (le front de migration est matérialisé par le bleu de bromophénol), le gel est démoulé aussitôt et mis dans la solution de fixation de coloration afin d'éviter tout phénomène de diffusion des protéines dans le gel.

Le logiciel Mélanie III[®] est capable de créer des images synthétiques. Il faut sélectionner uniquement les spots que l'on veut faire entrer dans le calcul (spots appariés seulement, par exemple). Une option permet de ne tenir compte que d'un certain nombre de spots parmi ceux sélectionnés sur un critère particulier, comme par exemple leur présence dans au moins 3 gels différents. Il est aussi possible de copier des spots provenant d'un gel sur un autre et de cette manière « d'empiler » des gels les uns sur les autres. Pour ce faire, les gels doivent être préalablement comparés.

La première partie de cette étude consiste en une comparaison de deux techniques de coloration avec pour objectif d'évaluer leur sensibilité, leur reproductibilité mais aussi le niveau de qualité de l'information qu'elles permettraient d'obtenir. La technique choisie sera utilisée pour faire un criblage rapide des mutants et devra donc prendre en compte la quantité de graines disponibles, la visualisation des protéines de réserve et la caractérisation de certains spots par spectrométrie de masse.

A. Résultats des deux types de colorations

Cette étude a été réalisée avec des graines de l'écotype sauvage WS en utilisant un protocole d'électrophorèse 2-D (technique d'extraction-séparation) récemment développé au laboratoire. Ces graines sauvages serviront ensuite de référence pour la comparaison des mutants. Deux techniques de coloration ont été comparées de façon à essayer de réduire le nombre de graines utilisées, évaluer la reproductibilité de l'ensemble extraction-séparation et la facilité de mise en œuvre de ces colorations. Les électrophorèses 2-D ont été réalisées de façon indépendantes, tant du point de vue de l'extraction utilisée que de la migration. Après coloration, chacun de ces gels a été numérisé puis analysé avec le logiciel Mélanie[®].

Les résultats en terme de nombre de spots détectés sont donnés dans les Tableau VI et VII.

Numéros	Nombre de graines	Nombre de spots détectés
1	5	284
2	5	318
3	5	318
4	5	258
Moyenne $\pm$ écart-type	5	295 $\pm$ 29
5	8	181
6	11	397

Tableau VI : nombre de spots détectés en fonction du nombre de graines utilisées lors de l'extraction, pour une coloration au nitrate d'argent.

Numéros	Nombre de graines utilisées	Nombre de spots détectés
1	25	207
2	25	201
3	25	236
4	25	310
5	25	179
6	25	204
7	25	170
Moyenne $\pm$ écart-type	25	215 $\pm$ 47

Tableau VII : nombre de spots détectés en fonction du nombre de graines utilisées lors de l'extraction, pour une coloration au bleu de Coomassie colloïdal G250.

La coloration au nitrate d'argent étant considérée 5 fois plus sensible que celle utilisant le bleu de Coomassie colloïdal, 5 fois moins de graines ont donc été utilisées pour réaliser le gel 2-D.

B. Comparaison argent/bleu

La coloration au nitrate d'argent permet de détecter environ 300 spots à partir d'un extrait de 5 graines avec un coefficient de variation (CV) de 10 %. L'augmentation du dépôt de protéines conduit à une augmentation du nombre de spots détectés (397 spots avec 11 graines), ce qui indique que l'utilisation de 5 graines ne permet pas de détecter la totalité des protéines. Il serait donc intéressant de réaliser des essais de coloration au nitrate d'argent à partir d'un nombre de graines supérieur. La coloration au bleu de Coomassie colloïdal faite à partir de 25 graines permet de visualiser 215 spots avec un CV de 25 %, ce qui traduit une assez faible reproductibilité de cette coloration. L'essai 4, avec un nombre particulièrement élevé de spots, participe largement à ce fort CV. Cette variabilité est sans doute liée à la présence résiduelle de grains de bleu colloïdal incrustés dans le gel qui ne sont pas éliminés lors des différents rinçages et qui sont reconnus comme des spots par le logiciel Mélanie®. Il est parfois très difficile de différencier un petit spot qui correspond bien à une protéine d'un artéfact. La zone des haut poids moléculaires (>40 kD) est particulièrement sensible à ce phénomène car on y trouve des spots de très faible intensité et circonférence qui peuvent ressembler à un grain de bleu. La diminution de ces artéfacts passe par une augmentation du nombre de rinçages, au détriment de la sensibilité : les spots de faible intensité vont aussi se décolorer...

C. Conclusion : bibliographie et choix du bleu pour la suite

Il n'en reste pas moins que le nombre moyen de spots détectés sur un gel est relativement faible par rapport aux 1272 dénombrés par Gallardo *et al.* en 2001. Cette différence peut être liée aux conditions certes légèrement différentes (extraction en présence de thiourée et de triton, qui ne change probablement rien, et une seconde dimension avec une concentration de 10% de polyacrylamide qui permet de visualiser des protéines de plus haut PM). Cependant, la quantité de protéines déposées dans leur cas est supérieure (50 graines) et permet l'obtention d'un gel très chargé en spots et très dense dans la zone des protéines de réserves. Nos objectifs étant dans cette première étape d'identifier des mutants affectés dans leurs protéines de réserve, les conditions choisies permettent de bien les visualiser et donc de moins charger les gels.

D'un point de vue pratique, le contrôle de la révélation au nitrate d'argent est plus délicat, comparé au bleu de Coomassie, puisqu'il faut stopper la coloration avant qu'elle ne devienne trop intense, sachant que le fond du gel se colore aussi. Si l'on attend trop, le gel se colore entièrement et les spots ne sont plus détectables. De plus, les graines de mutants ne contenant pas toutes les mêmes quantités de protéines, le temps de révélation ne peut être imposé précisément. Le bleu de Coomassie a une reproductibilité correcte sur les zones de protéines de réserve (ce qui nous intéresse de prime abord) et il permet aussi d'analyser les spots par spectrométrie de masse, chose impossible avec le nitrate d'argent. Pour ces différentes raisons (reproductibilité correcte des zones de protéines de réserve, nombre assez faible de spots permettant un criblage et possibilité d'analyser les spots en spectrométrie de masse), la coloration au bleu de Coomassie a été préférée.

D. Aspect visuel de la variabilité

A partir de ces essais de reproductibilité, l'étude des gels permet la mise en évidence de groupes de spots variables, localisés sur la Figure 16 sous les termes de zones variables et très variables.

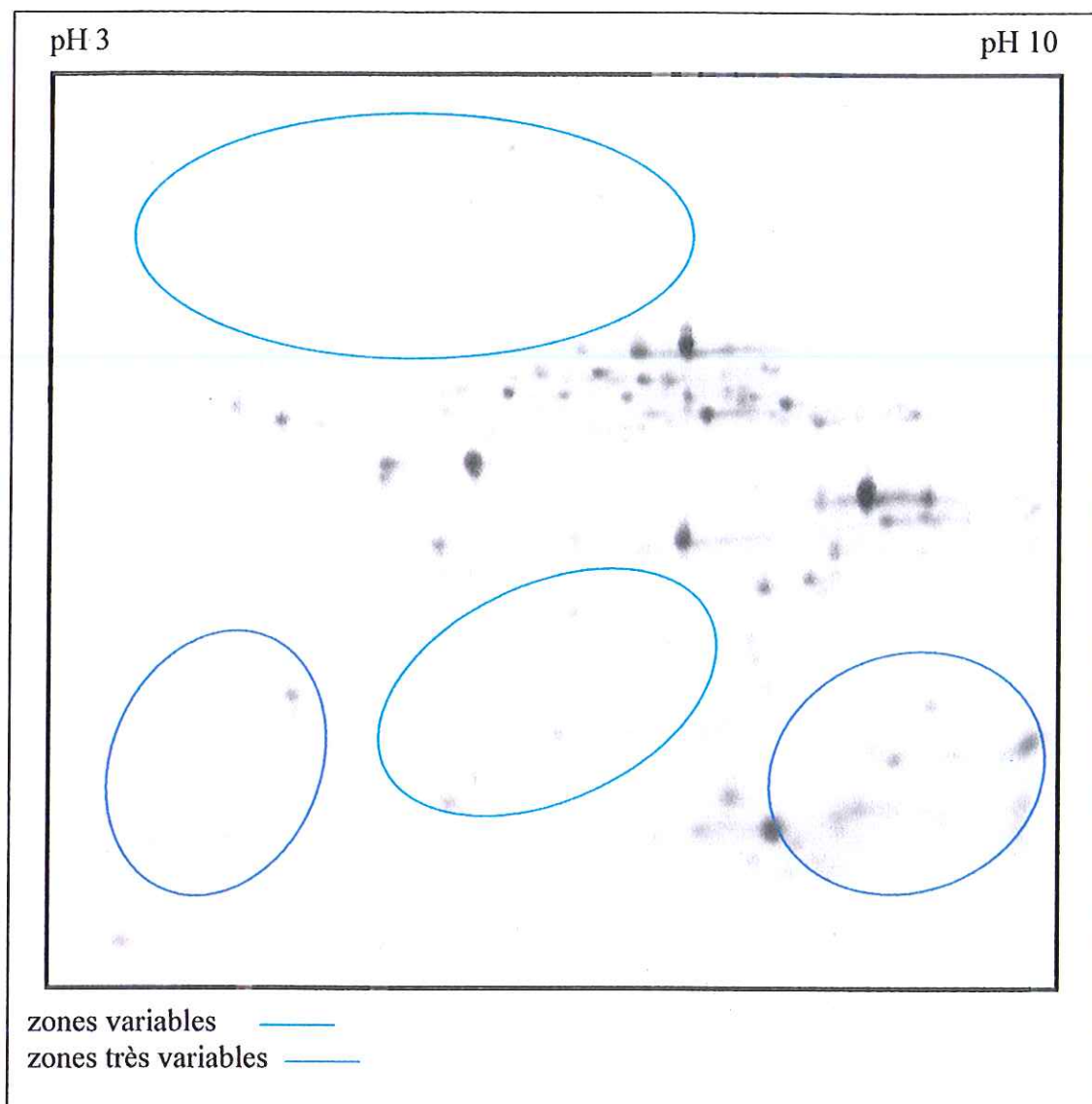


Figure 16: gel d'électrophorèse 2-D réalisé avec 25 graines et coloré au bleu de Coomassie G250 avec la localisation des zones variables

Les zones variables signalées sur la Figure 16 sont des zones où les spots apparaissent assez rarement, ils sont souvent de faible intensité, flous et donc très difficiles à déterminer. C'est plus particulièrement dans ces zones que la détection automatique des spots est insuffisante et doit être complétée par un lourd travail d'analyse d'image manuel de l'opérateur.

II. Etude de l'effet de la concentration en protéines

Le niveau de remplissage protéique des graines mutantes est très variable, c'est pourquoi des gels ont été préparés à partir d'un nombre croissant de graines sauvages (13, 25, 37, 50 et 62). Dans une première analyse, l'effet a été testé sur le nombre de spots détectés, puis dans un second temps, sur l'intensité des spots.

Numéros	Nombre de graines	Nombre de spots détectés
1	13	178
2	25	177
3	37	210
4	50	256
5	62	313

Tableau VIII: nombre de spots détectés en fonction du nombre de graines utilisées lors de l'extraction, en électrophorèse 2-D et une coloration au Bleu de Coomassie

On notera, d'après le Tableau VIII que l'augmentation de la concentration en protéines due à l'augmentation du nombre de graines, permet de détecter davantage de spots (augmentation quasi linéaire au delà de 25 graines). Cependant, certains spots proches finissent par se chevaucher lorsque la quantité en protéines déposée augmente et d'autres ont des contours qui deviennent plus flous, ce qui entraîne des difficultés lors de la détection automatique.

L'augmentation de la quantité protéique déposée permet de faire apparaître des spots de faible intensité et donc évitera de les qualifier de « nouveaux » chez certains mutants. De plus, cette gamme croissante de protéines déposées a été utilisée pour essayer d'établir un lien objectif entre les quantités de protéines extraites et l'intensité des spots.

L'augmentation de la quantité de protéines déposée devrait entraîner une augmentation de l'intensité des spots détectés. La variation de cette intensité a été étudiée sur les spots les mieux appariés. Le logiciel Mélanie® permet d'obtenir automatiquement une estimation de l'intensité de la coloration du spot qu'il exprime en volume (intégration de l'intensité maxi du spot par la surface du spot). Les résultats obtenus sur les spots détectés de manière automatique par le logiciel font apparaître des incohérences majeures entre le volume donné et l'observation visuelle du gel. La Figure 17 montre 4 exemples de résultats obtenus de manière automatique avec Mélanie® et représente l'intensité (valeur du volume, en UA fournie par Mélanie) de chaque spot en fonction du nombre de graines extraites.

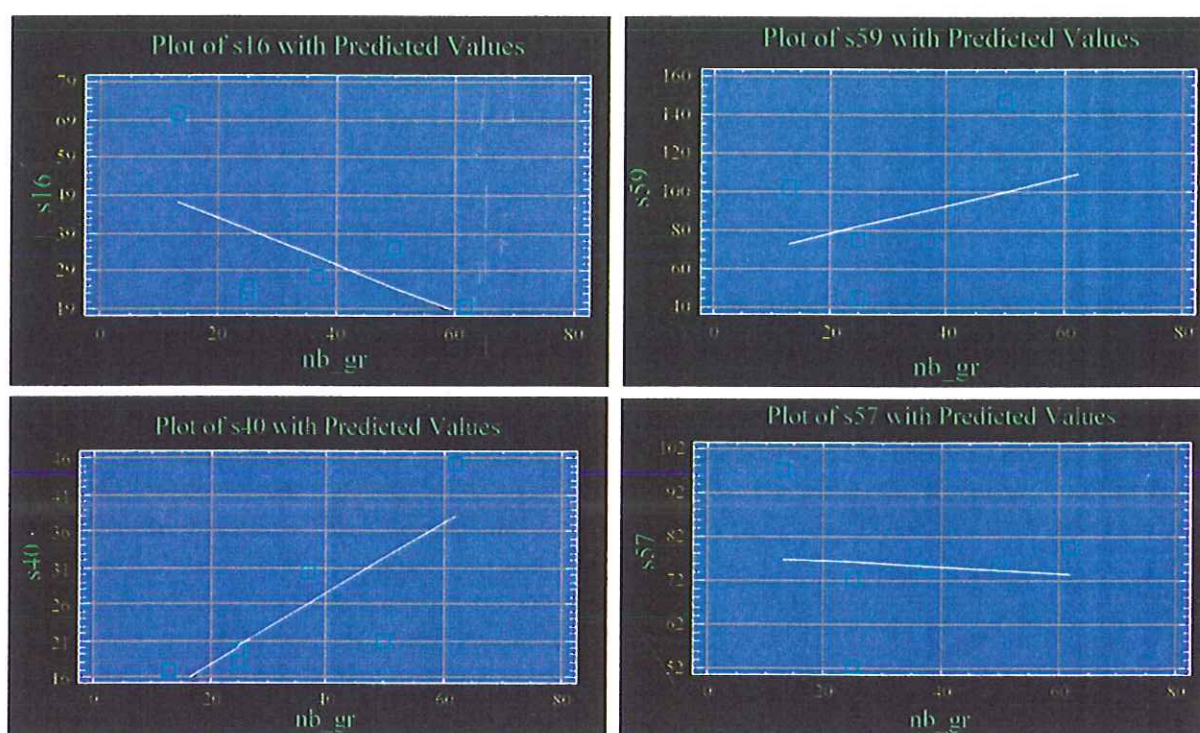


Figure 17: exemples de volumes de spots (UA) mesurés de façon automatique par le logiciel Mélanie®. Les droites de régression tracées automatiquement montrent la faible corrélation (CV très différents).

La représentation correspondant au spot n°40 de la figure 17 montre une augmentation globale de l'intensité du spot avec le nombre de graines extraites avec cependant une valeur un peu faible pour l'extrait à 50 graines. Cet exemple, avec celui du spot n°59 qui présente, aussi une tendance à l'augmentation de l'intensité en fonction de la concentration en protéines mais avec une grande dispersion, sont assez représentatifs des résultats obtenus automatiquement avec Mélanie®. De plus, les intensités mesurées pour certains spots, comme le n°57 ou le n°16 sont probablement totalement aberrantes. C'est le cas des gels obtenus avec 13 et 62 graines pour le spot n°16. Ces résultats mettent bien en évidence les limites de la détermination automatique du volume des spots par le logiciel Mélanie®.

Tous les spots ont donc été retravaillés manuellement au niveau de la délimitation du spot (surface) et la même représentation a été choisie, intensité en fonction du nombre de graines. Quatre exemples, les spots n°16, 19, 59 et 75 sont reportés sur la Figure 18.

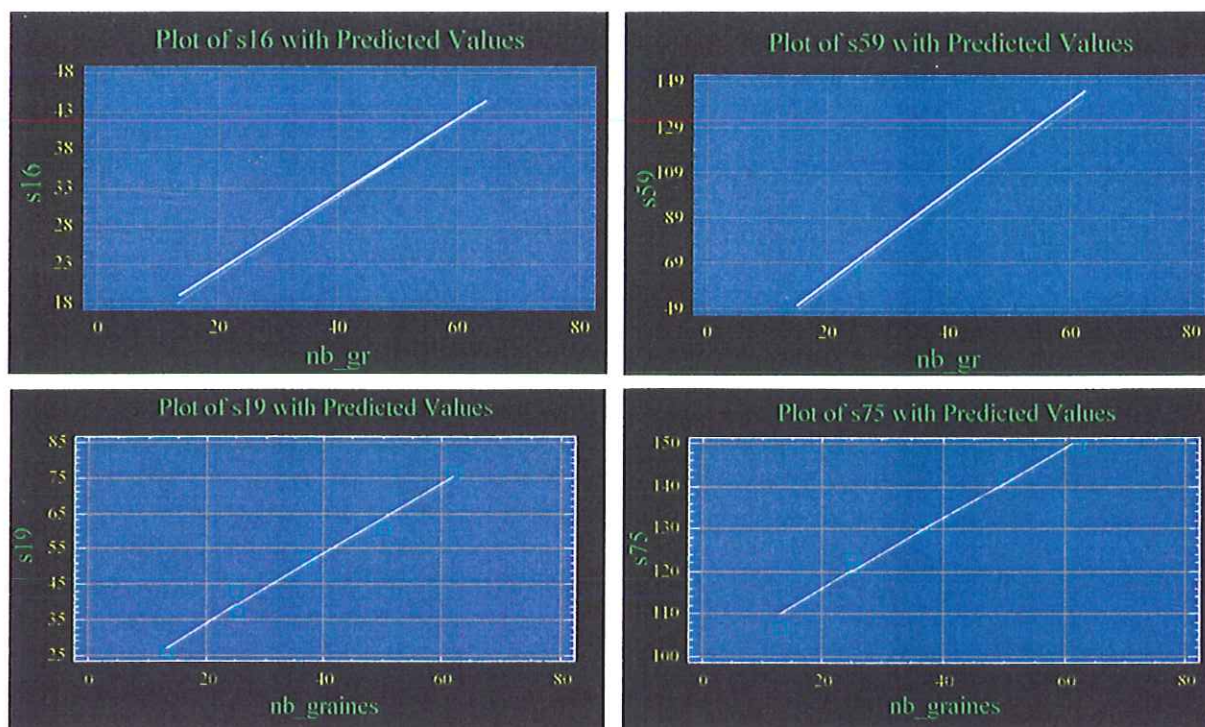


Figure 18: exemples de variation du volume des spots en fonction du nombre de graines utilisées pour l'électrophorèse 2-D, après correction manuelle.

Après détection manuelle et visuelle on note que dans la grande majorité des spots traités, l'intensité croît avec la quantité de graines extraites et que l'on obtient une relation linéaire significative entre la quantité de graines et le volume du spot ($p \text{ value} \leq 0.0004$).

L'analyse automatique par le logiciel Mélanie® de l'intensité des spots donne des résultats incohérents (Figure 17) montrant ainsi qu'une analyse en automatique ne peut suffire. En effet, même si ce logiciel est un logiciel spécifique de traitement d'images de gels d'électrophorèse 2-D, les tâches qu'il réalise doivent être vérifiées (et éventuellement corrigées) manuellement. Le mode automatique permet un certain gain de temps, mais reste inférieur à l'œil en terme d'évaluation de l'intensité et des spots. Par contre, la correction manuelle de la détection des spots permet de bien corrélérer les quantités de protéines déposées à l'intensité des spots (Figure 18). Cette bonne corrélation obtenue après retraitement des gels devra permettre d'estimer les teneurs en différentes protéines dans les mutants.

III. Construction de gels de référence à partir de graines sauvages

Afin de comparer les gels de graines mutantes par rapport à des graines sauvages, il est nécessaire d'utiliser un gel de référence. En raison de la faible reproductibilité de l'électrophorèse 2-D et de la teneur inconnue en protéines dans chaque graine, il est nécessaire de créer un gel moyen qui servira de référence.

Un gel moyen a été établi grâce au logiciel Mélanie[®]. L'étude précédente montre que les spots « variables » sont localisés dans les mêmes zones du gel d'électrophorèse 2-D (voir Figure 16). Le logiciel de traitement d'images est capable de corriger les écarts entre deux gels à condition de lui proposer des spots « repères » ; ces spots que l'on va manuellement marquer doivent être présents sur tous les gels à comparer. 19 spots ont été notés (Figure 19) comme étant présents sur l'ensemble des gels et facilement identifiables, ils seront utilisés comme repères pour traiter l'ensemble des images obtenues. Compte tenu des zones variables, les repères choisis ne couvrent pas l'ensemble du gel mais sont plutôt localisés vers la zone centrale du gel, ce qui rend l'appariement des zones périphériques moins fiable. Cependant, pour l'objet de notre étude qui concerne dans un premier temps l'analyse de l'expression des protéines de réserve, la zone centrale est suffisante.

A cause de ces variations, il devient difficile de réaliser un gel de référence. C'est pourquoi deux types de gels de référence ont été établis.

1. Obtention d'un gel « minimum »

Ce gel de référence a été réalisé à partir des gels d'électrophorèse 2-D obtenus avec 25 graines sauvages, colorés au bleu de Coomassie colloïdal (Tableau VII). A chaque fois, les gels ont été comparés entre eux et les spots appariés sont utilisés pour créer le gel synthétique. Chaque spot présent dans le gel synthétique doit être détecté dans au moins trois gels différents.

Ce gel, ainsi réalisé comporte 141 spots.

De plus, ce gel de référence « minimal » peut être placé dans la gamme, à proximité du gel à 25 graines pour une grande majorité des 141 spots. Ceci montre que ce gel synthétique est un gel moyen correct et il permettra une comparaison rapide entre sauvage et mutants sur les spots majoritaires.

2. Obtention d'un gel « maximal »

Ce gel de référence est formé par l'ensemble des spots qui sont apparus au moins une fois dans un gel de graines sauvages . Il permettra de repérer efficacement et sans ambiguïté les spots « nouveaux » des gels de mutants. Pour ce faire, après appariement des spots, tous les spots non appariés des gels obtenus avec des graines sauvages ont été ajoutés au gel « minimum », quelles que soient leur concentration en protéines ou leur type de coloration afin d'obtenir un gel avec un nombre exhaustif de spots.

Ce gel, ainsi réalisé possède 1635 spots.

IV. Etude des graines mutantes

A. Analyse visuelle des gels de graines mutantes

Les gels mutants et sauvages sont traités avec le logiciel Mélanie® dans un premier temps, puis après appariement des spots, ils sont comparés visuellement. L'analyse porte dans un premier temps sur l'intensité générale des gels, puis sur des zones plus particulières : hauts et bas PM, protéines de réserves et leurs différentes sous-unités. La Figure 19 montre la localisation des protéines de réserves sur un gel d'électrophorèse 2-D et met en relation cette électrophorèse avec une électrophorèse 1-D (SDS-PAGE à 15% d'acrylamide). L'analyse est affinée au niveau de certaines particularités des zones de protéines de réserves.

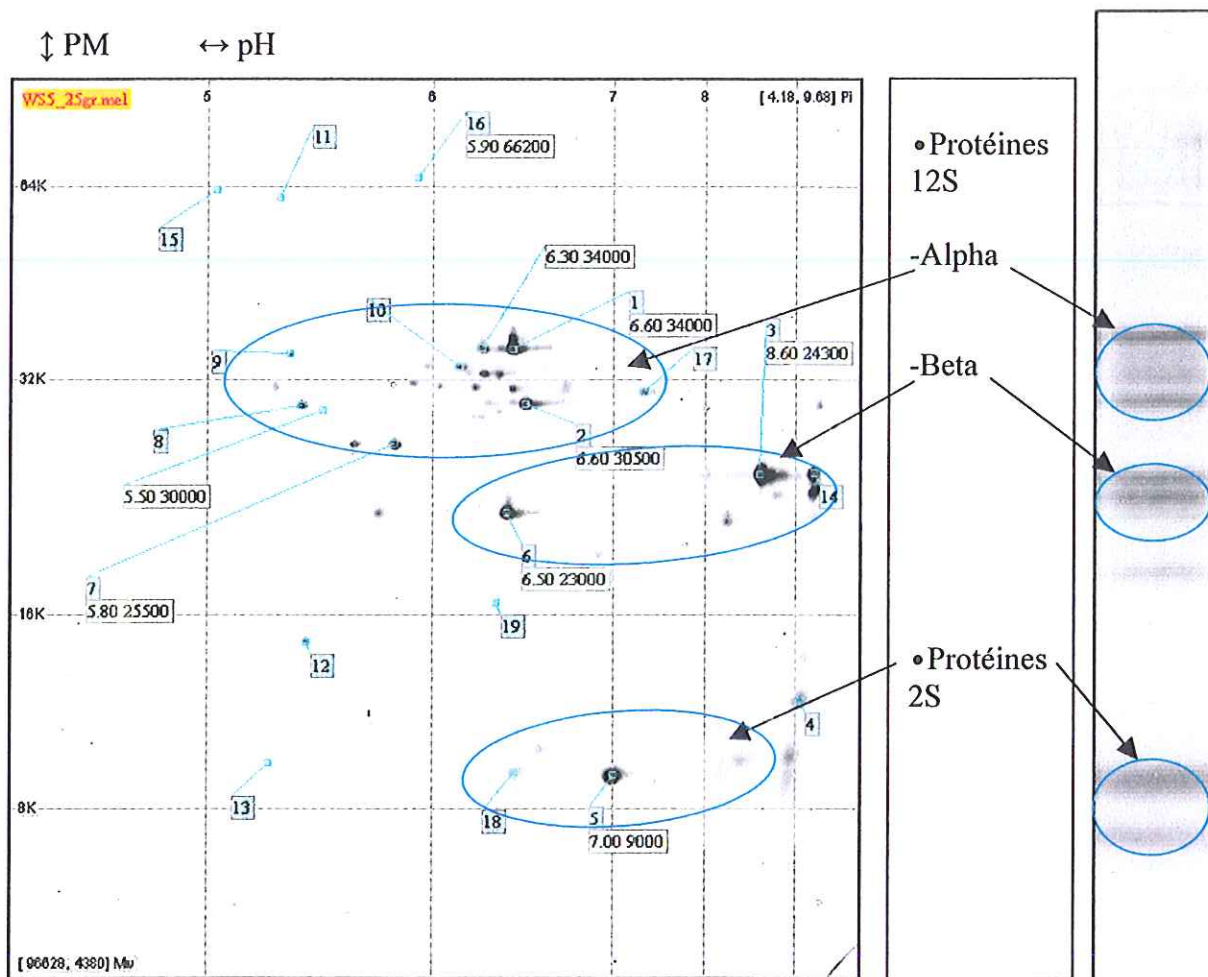


Figure 19 : électrophorèse 2-D, 1D et localisation des protéines de réserve. Sur l'électrophorèse 2-D, les numéros correspondent aux spots-repères utilisés pour l'analyse d'images, les valeurs dans les étiquettes correspondent aux pI et PM des protéines des spots analysés par spectrométrie de masse.

Les zones entourées dans la Figure 19 sont des zones où sont localisées les protéines de réserve, cependant, dans ces zones, se trouvent sans doute d'autres protéines mais du fait de leur faible concentration (petit spot peu intense) elles sont difficilement visibles.

Les mutants étudiés ne présentent pas de disparition ou d'apparition de spots dans la zone des sous-unités alpha de 12S, mais cependant des variations relatives d'intensité de ces spots sont mis en évidence chez certains d'entre eux. La Figure 20 présente un zoom sur cette zone des alpha-12S et montre une forte augmentation de deux spots de masse plus élevée.

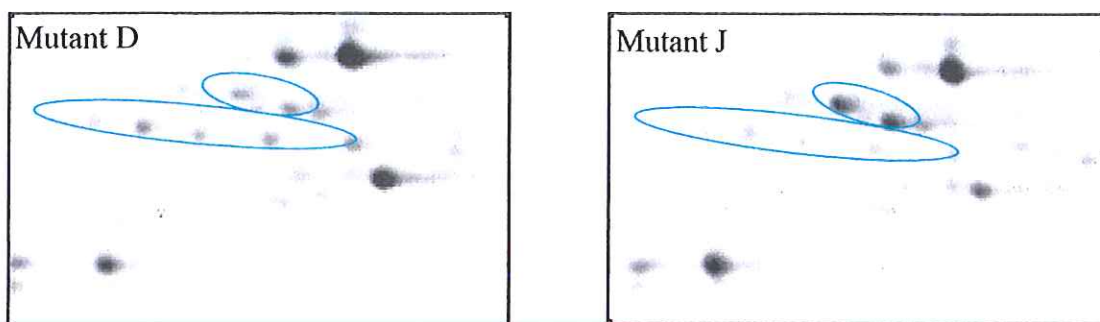


Figure 20: particularités observées au niveau des sous-unités alpha des globulines 12S

Une observation similaire a été faite pour les sous-unités beta des 12S. D'autres spots varient fortement en intensité, par exemple le spot noté 14 utilisé comme repère. La Figure 21 illustre ces deux exemples.

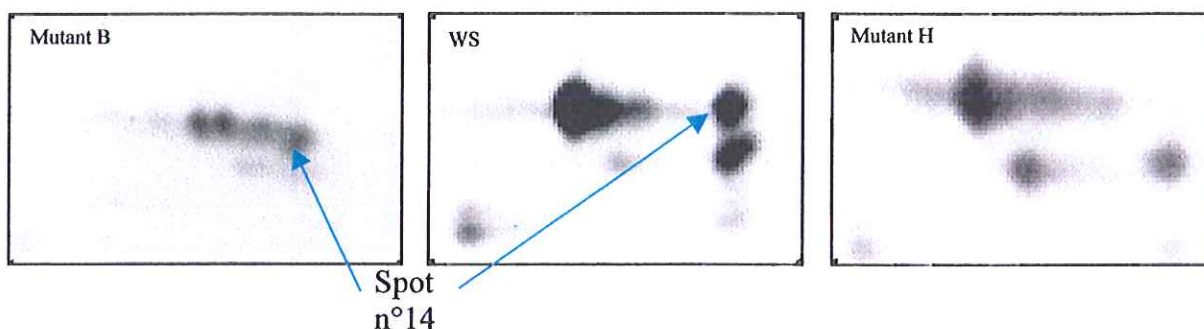


Figure 21: particularités observées dans la zone des protéines beta 12S

L'ensemble des images ne pouvant être figuré dans ce mémoire, un tableau récapitulatif des observations faites à partir de la comparaison mutant-sauvage a été constitué (Tableau IX) et les différences les plus notables ont été listées.

Noms	Nombre graines	Nombre spots	Intensité globale	Hauts PM	Bas PM acides	Bas PM basiques	2S	alpha 12S	7 spots ds 12S	beta 12S	n°14 landmark
A	50	234	faible		peu visibles	peu visibles	faible	moy	inversés	1 gros surtout	faible
B	50	218	faible		peu visibles	peu visibles	faible	moy		les 4 homogènes	faible
C	25	225	moy+		visibles	peu visibles	fort	moy+			faible
D	25	282	moy		visibles	très visibles	moy	moy	homogènes		fort
E	25	247	moy	bcp	peu visibles	peu visibles	faible	moy	inversés	1 gros surtout	absence
F	50	183	moy		peu visibles	visibles	moy	moy	inversés		absence
G	50	289	moy		peu visibles	peu visibles	faible	faibles	homogènes faibles	1 gros surtout	absence
H	25	264	moy	bcp	peu visibles	peu visibles	moy-	moy-	inversés	1 gros surtout	faible
I	25	182	moy		peu visibles	peu visibles	moy-	moy-	inversés		absence
J	25	247	moy		peu visibles	visibles	moy+	moy	inversés		absence
K	25	198	fort		visibles	visibles-flous	moy+	fort	inversés		fort
L	25	223	moy		visibles	visibles	moy+	moy	homogènes		moy
M	25	232	moy		peu visibles	visibles	moy+	moy		1 gros surtout	absence
N	25	288	fort		peu visibles	visibles-flous	moy+	moy+			absence
O	25	142	faible et homogène		visibles	peu visibles	faible	faibles	peu visibles	1 gros surtout	absence
P	25	176	moy		peu visibles	peu visibles	moy+	moy-			faible
Q	25	266	moy+		visibles	visibles	moy	moy		1 gros surtout	moy
R	25	243	moy+		peu visibles	peu visibles	moy	moy	inversés		moy
S	25	233	moy+	bcp	peu visibles	peu visibles	faible	moy			faible
T	25	164	faible		peu visibles	peu visibles	faible	faibles	homogènes		faible

Tableau IX: récapitulatif des observations et comparaisons visuelles des gels de mutants et sauvages.

- Le mutant O a la particularité de posséder des protéines de réserves en quantité relativement faible : l'ensemble des spots du gel ont une intensité voisine.
- Il apparaît que 3 mutants, E, H et S possèdent davantage de spots localisés dans les hauts PM que les autres mutants.
- En ce qui concerne les protéines de réserve 2S (arabine), 7 mutants, A, B, E, G, O, S et T, en possèdent une quantité moins importante que les autres mutants.
- L'étude des protéines de réserves 12S, et en particulier de 7 spots localisés dans leur zone permet de mettre en évidence 5 mutants (D, G, L, O et T) : ceux-ci se distinguent car ces 7 spots sont révélés avec une intensité homogène. 9 autres mutants, A, E, F, H, R, J, K, R et S ont même une inversion d'intensité (Figure 20).
- Concernant les protéines de réserves beta 12S, le mutant B est remarquable car il possède des spots de même taille et de même intensité (Figure 21).

B. Comparaison des mutants avec le gel de référence « maximal »

Les gels de graines mutantes sont comparés au gel de référence « maximal » de manière à rechercher des spots nouveaux (Tableau X).

Noms	Nombre spots	Nombre spots « nouveaux »	Localisation particulière
A	234	9 (3.4%)	
B	218	8 (3.7%)	ht + bas PM
C	225	5 (2.2%)	
D	282	13 (4.6%)	ht + bas PM
E	247	20 (8.1%)	<20000
F	183	6 (3.3%)	
G	289	35 (12%)	
H	264	16 (6.1%)	
I	182	5 (2.7%)	milieu
J	247	15 (6.1%)	
K	198	5 (2.5%)	
L	223	7 (3.1%)	ht PM (4)
M	232	10 (4.1%)	<20000
N	288	38 (13%)	
O	142	11 (7.7%)	ht PM + milieu
P	176	3 (1.7%)	
Q	266	16 (5.3%)	
R	243	14 (5.7%)	
S	233	16 (6.9%)	
T	164	13 (7.9%)	ht PM(5) + extrêmes (5)

Tableau X: comparaison des gels des différentes graines mutantes avec le gel de référence « maximal ». La localisation des spots nouveaux est indiquée lorsqu'elle est particulière.

Il est important de relativiser le terme de spots « nouveaux » : il signifie seulement qu'il s'agit de spots qui ne sont jamais apparus sur des gels de graines sauvages. Si ces spots n'ont pu être mis en évidence sur des graines sauvages, c'est qu'ils étaient peut-être trop faibles pour être détectés, et il ne faut pas forcément faire la relation « spot nouveau=protéine nouvelle ou mutée ».

3 groupes peuvent être définis :

- <6% de nouveaux spots : la grande majorité des mutants (12)
- 6 à 12% de nouveaux spots : mutants E, G, H, J, O, S et T
- >12% de spots nouveaux : mutant N

Les spots « nouveaux » sont localisés très fréquemment dans les mêmes zones : hauts et bas PM (> 40kD et <15 kD).

C. Comparaison des mutants avec le gel de référence « minimal »

Il s'agit d'une étude concernant les 141 spots les moins variables chez la graine sauvage. Les spots communs (appariés entre le gel de référence et celui du mutant) sont comparés en terme d'intensité par le logiciel Mélanie®. Le récapitulatif est visible dans le Tableau XI.

noms	nombre spots	nb spots communs avec gel ref 25gr	nb intensité +	nb intensité -	Rapport
A	234	107 (46%)	16	91	0,15/0,85
B	218	107 (49%)	19	87	0,17/0,83
C	225	119 (53%)	13	106	0,11/0,89
D	282	124 (44%)	12	112	0,10/0,90
E	247	107 (43%)	18	89	0,17/0,83
F	183	105 (58%)	34	71	0,32/0,68
G	289	98 (34%)	10	88	0,10/0,90
H	264	114 (43%)	29	85	0,25/0,75
I	182	113 (62%)	37	76	0,33/0,66
J	247	124 (50%)	16	108	0,13/0,87
K	198	109 (55%)	35	74	0,32/0,68
L	223	118 (53%)	24	94	0,20/0,80
M	232	112 (48%)	27	85	0,24/0,76
N	288	119 (41%)	20	99	0,17/0,83
O	142	75 (53%)	43	32	0,57/0,43
P	176	100 (57%)	38	62	0,38/0,62
Q	266	126 (47%)	26	100	0,20/0,80
R	243	119 (49%)	17	102	0,14/0,86
S	233	117 (50%)	28	89	0,24/0,76
T	164	91 (56%)	29	62	0,32/0,68

Tableau XI: comparaison des gels de mutants avec le gel de référence « minimal ». Les spots communs (appariés) sont comparés ensuite en terme d'intensité

Les mutants ont généralement des spots d'intensité plus faibles que ceux du gel de référence, cependant 6 se différencient quelque peu en ayant plus d'un tiers de leurs spots plus intenses que ceux du gel de référence : F, I, K, O, P et T.

D. Choix des mutants les plus intéressants.

Les études comparatives précédentes des mutants par rapport à des sauvages ont permis de dénombrer des spots apparus ou disparus mais aussi de noter des différences d'intensité marquées sur certains spots ce qui correspond à des compositions en protéines différentes. Parmi ces mutants, 4 sont particulièrement affectés dans leur composition protéique, observée en électrophorèse 2-D.

- Le mutant D est intéressant à cause de ses particularités dans la zone des protéines de réserve alpha 12S, en particulier de l'homogénéité d'intensité des deux groupes de spots (figure 20). De plus, il présente de nombreux spots dans la zone des bas PM acides.
- Le mutant H se distingue des autres mutants par une quantité importante de spots dans la zone des hauts PM ; il montre une inversion des intensités des spots dans la zone des protéines alpha 12S (Figure 20), de plus il lui manque le spot noté 14 dans les protéines bêta 12S (Figure 21). On note aussi une nette diminution d'intensité des spots de protéines 2S et une augmentation d'un spot approximativement de pI 5.60 et PM 23000.
- Le mutant F a un profil assez particulier au niveau des intensités des spots qui diffèrent de la graine sauvage : une très nette diminution de l'intensité du spot de pI 7.2 et PM 31000 et l'inversion des intensités des 7 spots de protéines alpha 12S.
- Le mutant R a des spots « nouveaux » dans la zone des hauts PM, l'inversion des intensités des 7 spots des protéines alpha 12S, des nouveaux spots vers 20 kD et un spot bien visible dans la zone des bas PM acides.

En accord avec les autres partenaires du programme, l'étude se poursuivra avec ces quatre mutants. Dans un premier temps, les mutations devront être localisées précisément afin de connaître le gène altéré, ensuite, il s'agira de comprendre pourquoi et comment il intervient dans la (les) voie(s) métabolique(s) de l'accumulation des protéines de réserve de la graine.

V. Analyse en électrophorèse 1-D de graines sauvages en développement

Dans les analyses précédentes, bon nombre de mutants présentent des variations d'intensité sur les deux groupes de spots de la sous-unité alpha 12S (Tableau IX et Figure 20) en électrophorèse 2-D. Deux hypothèses peuvent être envisagées : soit les mutants accumulent des types différents de protéines 12S, soit ils ne parviennent pas à un même niveau de maturité. Une première étude a donc été réalisée en prenant pour hypothèse que les graines des mutants n'arriveraient pas au terme de leur maturation. Elle a tout d'abord été réalisée en électrophorèse 1-D à partir de graines sauvages récoltées à différents moments de maturation. En effet, une assez bonne corrélation a pu être observée entre les intensités de 2 bandes de d'électrophorèse 1-D des mutants (1-D ayant servi à la première sélection des mutants précédant ce travail) et les 7 spots répartis en deux groupes visibles en électrophorèse 2-D (Figure 20). Ces 2 bandes d'électrophorèse, notées 1 et 2, ont été suivies au cours du développement de graines sauvages en électrophorèse 1-D (Figure 22). Une coloration des protéines au nitrate d'argent a été préférée car elle permet de n'utiliser que 2 ou 3 graines à chaque stade de développement.

Mode opératoire de l'électrophorèse 1 D

Extraction

Les graines sont broyées avec un microbroyeur de verre de 100-1000 μ L (Poly Labo) dans 50 μ L de tampon réducteur de Tris-HCl (Tris base 62.5 mM, pH 8.8 ajusté avec HCl 6 N, SDS 69.4 mM, glycérol 8 % (v/v), mercaptoéthanol 5 % (v/v), ED et quelques grains de bleu de bromophénol). Les échantillons sont incubés 30 min à 60°C pour faciliter l'extraction, puis 1 min 15 à 100°C pour dénaturer et réduire les protéines. Après une centrifugation de 10 min à 11000 t/min, le surnageant est déshydraté au speed-vac (40 min, 35°C, sous vide), avant d'être resolubilisé dans 20 μ L d'eau à 5% de mercaptoéthanol ; cette étape permet d'homogénéiser les volumes des extraits.

Electrophorèse

La migration des protéines s'effectue dans un gel d'acrylamide à 15 % (solution Protogel à 30 %, tampon Tris/HCl 2 M, SDS 0.1%). Il polymérise avec du TEMED et du persulfate d'ammonium à 10 %. Un gel de concentration (stacking) à 6 % d'acrylamide est utilisé pour concentrer le dépôt de l'échantillon avant la séparation. On dépose 15 μ L d'extrait par puits pour une coloration au bleu de Coomassie colloïdal et 3 μ L pour une coloration au nitrate d'argent.

La migration s'effectue à ampérage constant : 10 mA/gel pendant 10 à 15 min (stacking) puis 20 mA/gel pendant 1 h 30 environ.

Coloration au nitrate d'argent (selon Blum et al., 1987)

La coloration s'effectue en 5 étapes, séparées par des lavages. Le gel est placé une nuit dans la solution de fixation comportant 40 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique. Puis il est lavé 2 fois pendant 20 min dans une solution à 30 % d'éthanol puis une troisième fois dans de l'eau distillée. Puis il passe 1 min dans la solution de sensibilisation contenant 0.2 % de thiosulfate de sodium ; puis il subit 3 lavages de 20 sec à l'eau distillée. Ensuite le gel est mis en contact avec la solution de nitrate d'argent à 0.2 % contenant 0.2 % de formaldéhyde à 37 % pendant 20 min puis lavé 3 fois 20 sec à l'eau distillée. Pour l'étape de développement, la solution utilisée comporte 3 % de carbonate de sodium, 0.5 % de formaldéhyde à 37%, 0.05% de thiosulfate de sodium à 10 %.

Le gel est placé dans cette solution 1 min puis à nouveau jusqu'à apparition des spots ; il est alors lavé immédiatement quelques secondes à l'eau distillée et la coloration est stoppée avec une solution de glycine à 2.5 % pendant 5 min. Le gel subit 3 lavages de 10 min à l'eau distillée.

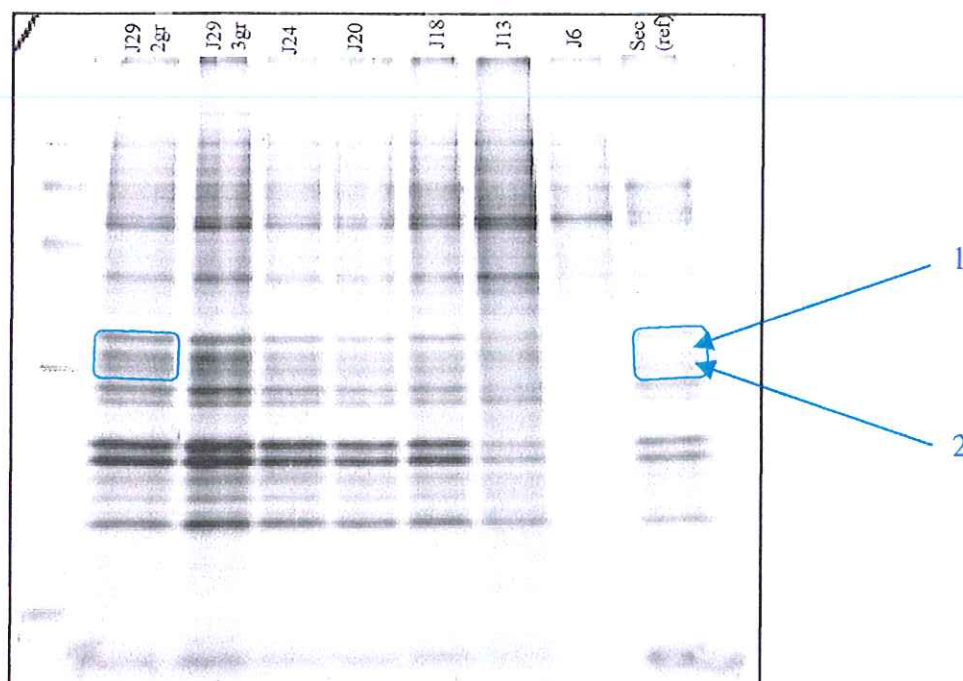


Figure 22: électrophorèse 1-D de graines sauvages à différents stades de maturation : 6, 13, 18, 20, 24, 29 jours après floraison et à terme (sec)

On s'aperçoit qu'au cours du développement de graines sauvages, les bandes notées 1 et 2 sur la Figure 22 sont en proportion égale ; à partir du 29^{ème} jour, le n°1 est en plus grande proportion (intensité supérieure), le rapport est inversé dans la graine mature. La maturation de la graine se faisant sur 30 jours, l'équilibre entre ces deux protéines (ou groupes de protéines) est rompu assez tardivement ; quant à l'inversion de leur rapport quantitatif, il intervient très tardivement en fin de la maturation.

Les 4 mutants sélectionnés présentent tous des caractéristiques voisines au niveau des 7 mêmes spots des protéines de réserves alpha 12S. L'analyse en électrophorèse 1-D de graines sauvages en développement montre que les bandes correspondant aux PM des 7 spots en 2-D ont une intensité différente qui s'inverse tardivement dans la maturation (Figure 22). La maturation des protéines de réserve 12S serait donc affectée par la mutation. Ce résultat

significatif en électrophorèse 1-D devra être confirmé en 2-D. Ensuite il faudra essayer de savoir si la mutation bloque la maturation des protéines de réserve 12S à un stade tardif ou si elle occasionne un retard dans le développement de la graine qui est, par conséquent, récoltée avant la fin de sa maturation.

VI. Production d'anticorps

L'étude de l'accumulation des protéines de réserve et de l'effet de la mutation sur la voie de biosynthèse des protéines devra, une fois les mutants choisis, être poursuivie par une analyse des protéines structurales et métaboliques, qui sont des protéines mineures en terme quantitatif. Afin de permettre la visualisation de ces protéines mineures, la « suppression » des protéines de réserve est envisagée. Les protéines de réserve 12S sont très fortement représentées sur un gel de 2-D. Leur forte proportion limite les possibilités de déposer davantage de protéines totales, technique la plus aisée pour visualiser les protéines mineures. C'est pourquoi, il a été choisi de les éliminer de l'extrait par immuno-affinité. Pour réaliser cet objectif, des anticorps anti-12S ont été préparés par immunisation de souris contre des peptides synthétiques. Quatre peptides ont été sélectionnés par comparaison de séquences de protéines de réserves 12S de graines de plantes de la famille des Brassicacées. Deux des peptides correspondent à des séquences consensus identifiées sur les polypeptides alpha et les deux autres sur les polypeptides bêta. Ils ont été synthétisés puis couplés à de la KLH (protéine porteuse). Le suivi de l'immunisation est réalisé par test ELISA et Western Blot.

Modes opératoires

12 souris réparties en 4 lots sont immunisées par injection intrapéritonéale de peptides (Figure 23) couplés à de la KLH (L111: LQNQDDNRGNI, Y13H: SQRFRDMHQKVEH, Y18I: TLAGRTSVLRGLPLEVI et G7C : GLEETIC). Les sérums sont obtenus par prélèvements au niveau du sinus rétro-orbital.



Figure 23 : Localisation des peptides immunogènes dans la séquence d'un précurseur de protéine de réserve 12S d'Arabidopsis thaliana (>sp|P15455|12S1_ARATH 12S SEED STORAGE PROTEIN PRECURSOR)

Test ELISA

100 μ L d'une solution de peptides couplés à de la KLH ou de la BSA dilués à 10 μ g/mL dans un tampon carbonate (50 mM, pH 9.6) sont déposés dans chaque puits et incubés une nuit à +4°C. Après 3 lavages au PBS-Tween 20 à 0.05 % (PBS 10 mM, pH 7.4), les puits sont saturés avec 300 μ L d'une solution de PBS-lait à 4 % pendant 2 H à température ambiante. Après 3 lavages au PBS-Tween 20 à 0.05 %, 100 μ L de sérums dilués au 1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 et 1/24300 dans du PBS-lait à 0.1 % sont incubés 2 H à température ambiante. Après 3 lavages au PBS-Tween 20 à 0.05 %, 100 μ L/puits d'anticorps anti- IgG de souris conjugués à la peroxidase (Biorad, rf 170-6516) dilué au 1/3000 dans du PBS-lait à 0.1 % sont ajoutés et incubés 1 H à température ambiante. Après 3 lavages au PBS-Tween 20 à 0.05 %, la solution de révélation (10 mg OPD (Sigma, rf P8287) dissout dans 25 mL de tampon citrate (50 mM, pH 5.5) et 10 μ L d' H_2SO_4 2M) sont déposés à raison de 100 μ L/puits pendant 20 min. L'absorbance est lue à 492 nm après arrêt de la réaction par 100 μ L/puits d' H_2SO_4 2M.

Le titre est défini par la valeur de la dilution maximale du sérums qui permet d'obtenir une réponse maximale (fin du plateau de la courbe de titration).

Western-blot

Après l'électrophorèse 1-D, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et visualisées avec les sérums de souris dilués au 1/350.

Transfert

Immédiatement après la fin de l'électrophorèse 2-D, le gel est démoulé et placé quelques minutes dans le tampon de transfert (Tris base 25 mM, Glycine 192 mM et éthanol 20 % (v/v)). Sur un support sont déposés successivement une éponge puis un papier buvard puis la membrane de nitrocellulose et enfin le gel puis un autre papier buvard et une éponge en évitant de laisser des bulles d'air entre les différentes couches, chacune étant imbibée de tampon de transfert. Le support est refermé et positionné dans la cuve de transfert thermostatée à +8°C ; le temps de transfert est de 1H15 à un ampérage constant de 1000 mA.

Blot

Après le transfert, le gel est récupéré et mis à colorer pour vérifier que l'électrophorèse s'est bien déroulée. La membrane est prélevée avec des pinces et laissée au moins une heure sous agitation dans du PBS (NaCl 0.15 mM, KCl 2.68 mM, KH_2PO_4 1.46 mM et Na_2PO_4 8.10 mM) + 5 % de lait en poudre écrémé. Elle est ensuite rincée 2 fois 10 min au PBS + 0.05 % de Tween à 20 %. La membrane est ensuite incubée pendant un heure à température ambiante avec l'anticorps de souris dilué au 1/350. Elle subit 2 lavages de 10 min dans du PBS-Tween. Elle est alors incubée pendant une heure avec un anticorps anti-souris couplé à de la peroxydase puis lavée 10 min dans du PBS-Tween puis 10 min dans du PBS. Le substrat (HRP 4CN 150mg, éthanol 50 mL, H_2O_2 150 μ L et 250 mL de PBS) est ajouté et la coloration doit être stoppée quand le fond de la membrane commence à se colorer, au bout d'une demi-heure par un lavage à l'eau distillée.

A. Caractérisation des anticorps par ELISA

Les sérums obtenus ont été testés dans deux systèmes différents : peptide conjugué à la BSA (BSA-peptide) et BSA, peptide conjugué à la KLH (KLH-peptide) et KLH. L'immunisation a été effectuée avec le peptide couplé à la KLH (KLH-peptide).

Le coating en ELISA se fait avec le peptide couplé à la BSA (BSA-peptide). Les sérums de chacune des souris sont testés à six niveaux de dilution contre le BSA-peptide. En parallèle un blanc est réalisé sur des puits sans antigène. Un contrôle utilise la BSA seule pour le coating. Les courbes obtenues mettent en évidence la non réactivité des sérums sur la BSA.

L'analyse des courbes (en annexe) montre que les sérums réagissent convenablement vis-à-vis des peptides utilisés pour les immunisations. Pour l'immunisation avec KLH-L11I, KLH-G7C et KLH-Y13H les titres de chaque sérum de chaque lot de souris sont quasiment

identiques. Cependant, les deux premiers peptides, L11I et G7C ont permis l'obtention de sérums avec des titres moyens de 300 alors que le peptide Y13H a permis d'obtenir des sérums de titre 10 fois supérieur. Quant aux souris immunisées par le KLH-Y18I, les réponses sont très variables : les sérums obtenus ont des titres variant de 300 à 3000. Les résultats montrent que les souris ont été globalement convenablement immunisées par les KLH-peptides, avec un problème de reproductibilité avec l'immunogène KLH-Y18I.

Résultats avec KLH-peptides et KLH seule (courbes en annexe).

Les sérums des souris immunisées par KLH-Y13H et KLH-Y18I réagissent mieux avec la KLH seule que lorsqu'elle est couplée au peptide. Les sérums des souris 4 et 6 réagissent de la même manière sur la KLH seule que lorsqu'elle est couplée au peptide L11I. Pour les souris 11 et 12, immunisées par KLH-G7C, leur sérum réagit peu, voire très peu avec la KLH seule.

Théoriquement, le sérum immunisé par KLH-peptide doit avoir un titre supérieur (mieux réagir) avec KLH-peptide qu'avec BSA-peptide ou KLH seule. L'activité d'un sérum vis-à-vis du KLH-peptide associe des anticorps dirigés contre la KLH et contre le peptide. Ici, seul le peptide Y-13H rentre dans ce cadre. D'autre part, si le taux de couplage du peptide sur la KLH est très élevé, la réponse immunitaire vis-à-vis du peptide est favorisée au dépend de la KLH. La forte variabilité des sérums obtenus par l'immunisation avec KLH-Y18I est peut-être liée à la difficulté de solubilisation. C'est un précipité qui a été injecté : les quantités de peptides immunogènes injectées ne sont pas bien contrôlées et cela expliquerait les différences de réponses très marquées. En effet, un précipité est plus immunogène qu'une solution car il est plus difficilement éliminé par l'organisme et donc restera plus longtemps visible vis-à-vis du système immunitaire.

B. Essais en immuno-blotting

Un essai préliminaire en blot a été effectué, en utilisant de la farine de colza (même famille qu'*Arabidopsis*) pour vérifier l'activité des anticorps vis-à-vis des protéines entières et non plus contre des petits peptides.

Les sérums ont été testés dilués au 350^{ème} en Western Blot contre de la farine délipidée de colza (Figure 24).

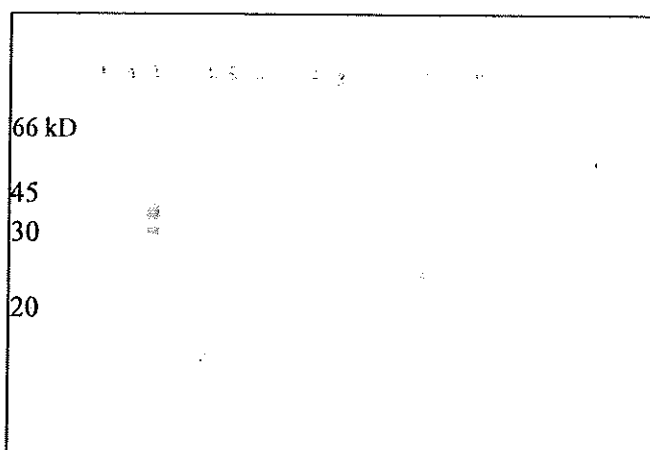


Figure 24: western blot de farine délipidée de colza testant 12 sérums de souris. Les souris 1,2 et 3 ont été immunisées avec KLH-Y13H, 4,5,6 avec KLH-L11I, 7,8,9 avec Y18I et 10,11,12 avec KLH-G7C.

Seuls quatre sérums sur les douze réagissent. Le sérum de la souris 3, immunisée par KLH-Y13H réagit contre les chaînes lourdes et légères des sous-unités alpha des globulines 12S ; le sérum de la souris 5 immunisée par KLH-L11I réagit, lui, uniquement contre les chaînes légères. Les sérums des souris 10 et 12, immunisés par KLH-G7C réagissent contre les sous-unités beta des protéines de réserves 12S. Les sérums des souris immunisées par le peptide Y18I ne réagissent pas en blot.

Les sérums donnent des résultats escomptés : ceux des souris immunisées par KLH-Y13H réagissent contre tous les polypeptides alpha 12S, ceux des souris immunisées par KLH-L11I réagissent uniquement contre les chaînes alpha légères des 12S et ceux des souris immunisées par KLH-G7C réagit contre les polypeptides beta 12S. Ces résultats sont à confirmer sur de la farine d'Arabidopsis, mais ils montrent déjà que les peptides permettent d'obtenir des anticorps actifs sur les différents polypeptides des protéines 12S que l'on souhaitait, et qu'ils sont actifs à l'intérieur de la famille des Brassicacées.

Les KLH-peptides donnant les meilleurs résultats en western-blot (KLH-Y13H et KLH-G7C) ont été retenus pour immuniser des lapins. Les lapins permettent d'obtenir davantage d'anticorps à chaque prélèvement de sang.

CONCLUSION

Ce travail m'a permis de comprendre les relations qui peuvent exister entre Recherche, Politique agricole Européenne, Semenciers et Industrie agro-alimentaire concernant une plante de grande culture : le colza. Afin d'améliorer cette plante, en particulier comprendre la mise en réserve des protéines de la graine, un objet modèle est utilisé : *Arabidopsis thaliana*. Ce petit végétal permet des études génétiques grâce à une création relativement aisée de mutants.

Pour répondre au programme Génoplande, les méthodes développées au cours de ce travail ont permis la comparaison en électrophorèse 2-D d'une vingtaine de mutants d'insertion d'ADN-T avec le sauvage. Quatre mutants particulièrement affectés dans le remplissage protéique de leur graine ont été identifiés. Le protéome de ces graines mutantes sera étudié plus finement en électrophorèse 2-D en s'attachant à la caractérisation des protéines impliquées dans le métabolisme. C'est pour faciliter l'identification et l'étude de ces protéines mineures que pourront être utiles les outils développés : la coloration au nitrate d'argent devrait permettre leur localisation, les anticorps seront employés en blot pour localiser rapidement l'ensemble des spots correspondants aux protéines 12S sur le gel, ils pourront aussi être utilisés en chromatographie d'affinité pour obtenir des extraits dépourvus de protéines 12S qui saturent les gels.

L'hypothèse d'une maturation non aboutie chez certains mutants a été confirmée en électrophorèse 1-D par l'utilisation de graines sauvages en voie de développement. Ce résultat devra être conforté par une étude systématique des graines en cours de développement en électrophorèse 2-D en s'attachant plus particulièrement aux 7 spots mis en évidence.

Pour la suite du travail, les spots d'intérêt devront être identifiés par spectrométrie de masse de manière à pouvoir caractériser les variations protéomiques induites par la mutation. La confrontation de ces résultats avec ceux obtenus par les investigations en génomique et transcriptomique devraient permettre de décrire des voies métaboliques de l'accumulation des protéines de réserve de la graine.

Bibliographie

- Appelquist, L.A.** (1973a). Chemical constituents of rapeseed. Dans *Rapeseed*. L.A. Appelquist et R. Ohlson. Amsterdam, Elsevier: 123-173.
- Appelquist, L.A.** (1973b). Historical Background. Dans *Rapeseed*. L.A. Appelquist et R. Ohlson. Amsterdam, Elsevier: 1-8.
- Appelquist, L.A. et Josefsson E.** (1967). Method for quantitative determination of isothiocyanates and oxazolidinethiones in digests of seed meals of rape and turnip rape. *Journal of the science of food and agriculture* 18: 510-519.
- Balzergue, S., Dubreucq, B., Chauvin, S., Le-Clainche, L., Le Boulair, F., de Rose, R., Samson, F., Biaudet, V., Lecharny, A., Cruaud, C., Weissenbach, J., Caboche, M. et Lepiniec, L.** (2001). Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *BioTechniques* 30: 496-504.
- Barciszewski, J., M. Szymanski et Haertle T.** (2000). Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein. *Journal of Protein Chemistry* 19(4): 249-54.
- Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepiniec, L. et Rochat, C.** (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* 40 : 151-160.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfert by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plant. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life science*, 316: 1194-9.
- Bengtsson, L., A. Von Hofsten and Lööf B.** (1973). Botany of rapeseed. Dans *Rapeseed*. L.A. Appelquist et R. Ohlson. Amsterdam, Elsevier: 36-48.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- Brockerhoff, H. and Yurkowski M.** (1966). Stereospecific analyses of several vegetable fats. *Journal of Lipid Research* 7(1): 62-4.
- Castle, L.A. and Meinke, D.W.** (1993). Embryo-defective mutants as tool to study essential fonctions and regulatory processes in plant embryo developement. *Semin. Dev. Biol.*, 4, 31-39.
- Chilton, M. -D., Drummong, M. J., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya A. L., Gordon, M. P. and Nester, E. W.** (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271.
- Chrispeels, M.J., Higgins, T.J.V., Craig, S. and Spencer, D.** (1982). Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetic of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons. *J. Cell. Biol.* 93, 5-14.

- Clandinin, D. et Heard J. (1968). Tannins in prepress-solvent and solvent-processed rapeseed meal. *Poultry Science* **40**: 484-487.
- Congdon, R. W., Muth, G. W., and Splittgerber, A. G. (1993). The binding interaction of Coomassie Blue with proteins. *Anal. Bioch.* **231**: 407-413.
- Damerval, C., Le Guilloux, M., Blaisonneau, J. and de Vienne, D. (1987). *Electrophoresis*, **8**, 158-159.
- Dasgupta, J., S. Dasgupta, S. Ghosh, B. Roy and Mandal R.K. (1995). Deduced amino acid sequence of 2S storage protein from Brassica species and their conserved structural features. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysic* **32**(6): 378-84.
- Davey, M. R., Cocking, E. C., Freeman, J., Pearce, N., and Tudor, I. (1980). Transformation of Petunia protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. *Plant. Sci. lett.* **18**: 307-313.
- Doy, C. H., Gresshoff, P. M. and Rolfe B. G. (1973). Biological and molecular evidence for the transgenesis of genes from bacteria to plant cells. *Proc. Natl. acad. Sci.* **70**: 723-726.
- Durkee, A. (1971). The nature of tannins in rapeseeds (*Brassica campestris*). *Phytochemistry* **10**: 1583-1585.
- Fenwick, G.R., R.K. Heaney and Mullin W.J. (1983). Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *critical reviews in food science and nutrition* **18**(2): 123-201.
- Gale, M. D. and Devos, K. M. (1998). Plant comparative in genetics after 10 years. *Science*, **282**, 656-59.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. and Job, D. (2001). Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, **126**, 835-848.
- Hagerman, A. and Butler L. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**: 947-952.
- Hallberg, L. (1987). Wheat fiber, phytates and iron absorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterol Supplement* **129**: 73-9.
- Heath, J.D., Weldon, R., Monnot, C., and Meinke, D.W. (1986). Analysis of storage protéines in normal and aborted seedes from embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **169**: 304-312.
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. et Schell, J. (1983). Expression of chimeric genes transferred into plant cells using Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **303**: 209-213.

- Hinz, G., Hillmer, S., Bäumer, M. and Hohl, I.** (1999). Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting BP-80 exit the Golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *The Plant Cell*, **11**, 1509-24.
- Jongen, W.M.F.** (1996). Glucosinolates in Brassica: occurrence and significance as cancer-modulating agents. *The proceedings of the Nutrition Society* **55**(1): 433-446.
- Josefsson, E.** (1973). Nutritional value and use of rapeseed meal. Dans *Rapeseed*. L.A. Appelquist et R. Ohlson. Amsterdam, Elsevier: 354-378.
- Klose, J.** (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik*, **26**: 231-243.
- Krebbers, E., L. Herdies, A. de Clercq, J. Seurinck, J. Leemans, J. van Damme, M. Segura, G. Gheysen, M. van Montagu and Vandekerckhove J.** (1988). Determination of the processing sites of an Arabidopsis 2S albumin and characterization of the complete gene family. *Plant Physiology* **87**: 859-866.
- Koncz, C., Chua, N.-H. and Schell, J., Eds.**. Methods in Arabidopsis Research (World Scientific, River Edge, NJ, 1992).
- Koncz, C. and Redei, G.P.** (1994). Genetic studies with Arabidopsis: a historical view. In Arabidopsis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York (USA)-1994-1300p.
- Koornneef, M., Van Eden, J., Hanhart, C. J., Stam, P., Braaksma, F. J. et Feenstra, W. J.** (1983). Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. hered.* **74**: 265-272.
- Koslowska, H., D. Rotkiewicz and Zadernowski R.** (1983). Phenolic acids in rapeseed and mustard. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **60**: 1119-1123.
- Lloyd, A. M., Barnason, A. R., Rogers, S. G., Byrne, M. C., Fraley, R. T. and Horsch, R. B.** (1986). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science*, **234**: 464-466.
- Martinez-Zapater J.M. and Salinas J., Eds.**, Arabidopsis protocols, vol.82 of Methods in Molecular Biology (Humana, Totowa, NJ, 1998).
- McKelvie, A. D.** (1963). Studies on the induction of mutations in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Radiat. Bot.* **3**: 105-123.
- McKillican, M.E.** (1966). Lipid changes in maturing oil-bearing plants. IV. Changes in lipid classes in rape and crambo oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **43**(7): 461-465.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M.** (1998). *Arabidopsis thaliana* : a model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662-682.
- Meinke, D. W. et al., Eds.**, "Multinational coordinated Arabidopsis thaliana genome research project, progress report, year six" (National Science Foundation Publication 97-131, Arlington, VA, 1997).

- Meinke, D. W. and Sussex, I. M.** (1979). *Dev. Biol.* **72**: 50.
- Meyerowitz E. M. and Pruitt R. E.** (1985). *Science* **229**: 1214.
- Mifflin, B.J., Burgess, S.R. and Shewry, P.R.** (1981). The development of protein bodies in storage tissues of seeds : subcellular separations of homogenates of barley, maize, and wheat endosperms and of pea cotyledons. *Journal of Experimental Botany*, **32**(126): 199-219.
- Mothes, R., K.D. Schwenke, D. Zirwer and Gast K.** (1990). Rapeseed protein-polyanion interactions. Soluble complexes between the 2 S protein fraction (napin) and phytic acid. *Nahrung* **34**(4): 375-385.
- Muller, J.** 1981, *Bot. Rev.* **47**, 1.
- Naczki, M., R. Amarowicz, A. Sullivan and Shahidi F.** (1998). Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola : a review. *Food Chemistry* **62**(4): 489-502.
- Naczki, M., P.K.J.P.D. Wanasundara and Shahidi F.** (1992). Facile spectrophotometric quantification method of sinapic acid in hexane-extracted and methanol-ammonia-water-treated mustard and rapeseed meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 444-448.
- Naczki, M., L. Diosady and Rubin L.** (1986). The phytate and complex phenol content of meal produced by ethanol-ammonia-hexane extraction of canola. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* **19**: 13-16.
- Nordfeldt, S., N. Gellerstedt and Falkmer S.** (1954). Studies on rapeseed meal and its goitrogenic effect on pigs: a nutritional and histopathological study. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica* **35**: 217-236.
- O'Farrell, P.H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-21.
- Osborne, T.B., Ed.** 1924. *The Vegetable Proteins*. London, Longmans, Green and Co.
- Pruitt, R. E and Meyerowitz, E. M.** (1986). Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.* **187**: 169-183.
- Rabilloud T.** (1990). Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a ten year synthesis. *Electrophoresis* **11**: 785-794.
- Reinholz, E.** (1945). Auflösung von Röntgenmutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., und ihre Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und Evolutionstheorie. Ph.D. thesis, University of Frankfurt, Germany.
- Renaud et al.,** (1994). Mediterranean alpha linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *The Lancet* **343**, 11 juin.

- Röbbelen, G.** (1962). Wirkungsvergleich zwischen Äthylmethansulfonat und Röntgen-Strahlen in Mutationsversuch mit *Arabidopsis thaliana*. *Naturwissenschaften* **49**: 1237-49.
- Rubino, M.I., S.D. Arntfield, C.A. Nadon and Bernatsky A.** (1996). Phenolic protein interactions in relation to the gelation properties of canola protein. *Food Research International* **29**(7): 653-659.
- Shahidi, F. and Naczki M.** (1992). An Overview of the Phenolics of Canola and Rapeseed: Chemical, Sensory and Nutritional Significance. *Jaocs, journal of the american oil chemists' soc* **69**(9): 917-924.
- Shewry, P.R. and Casey R.** (1999). Seed Proteins. In *Seed Proteins*. P.R. Shewry et R. Casey. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-10.
- Shirley, B. W., Hanley, S., Goodman, H. M.** (1992). Effects of ionising radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *Plant cell* **4**: 333-347.
- Somerville, C. R. and Ogren W. L.** (1979). *Nature* **280**: 147.
- Sun, S.S., S.B. Altenbach and Leung F.W.** (1987). Properties, biosynthesis and processing of a sulfur-rich protein in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Eur J Biochem* **162**(3): 477-83.
- Sun, T. P., Goodman, H. M., Ausubel, F.M.** (1992). Cloning the *Arabidopsis* GA1 locus by genomic subtraction. *Plant cell* **4**: 119-128.
- Tzagoloff, A.** (1963). Metabolism of sinapine in mustard plants. I. The degradation of sinapine into sinapic acid and choline. *Plant Physiology* **38**: 202-206.
- U, N.** (1935). Genome-analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of botanic* **7**: 389-452.
- Van der Klei, H., Van Damme, J., Casteels, P. and Krebbers, E.** (1993). A fifth 2S albumin isoform is present in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **101**, 1415-16.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, and Schnell, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall inducing ability. *Nature* **252**: 169-170.
- Wathelet, J.P., M. Marlier, M. Severin, A. Boenke and Wagstaffe P.J.** (1995). Measurement of glucosinolates in rapeseeds. *Natural Toxins*. **3**(4): 299-304.

www.amsol.asso.fr

www.genoplante.org

www.inra.fr

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.nsf.gov

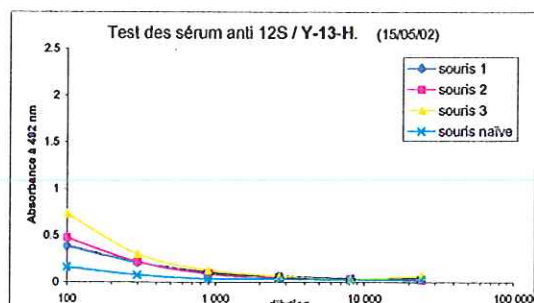
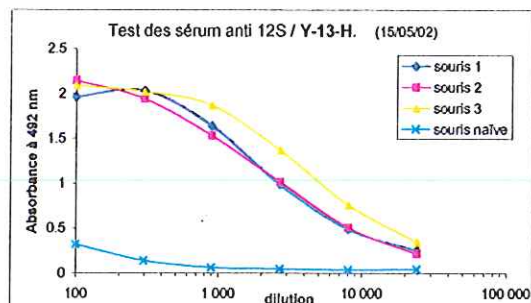
www.user.imaginet.fr/~pol/2cul-ara.htm

ANNEXE

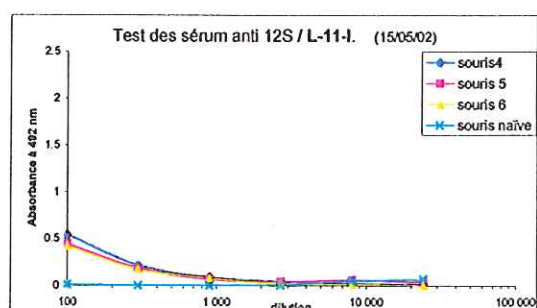
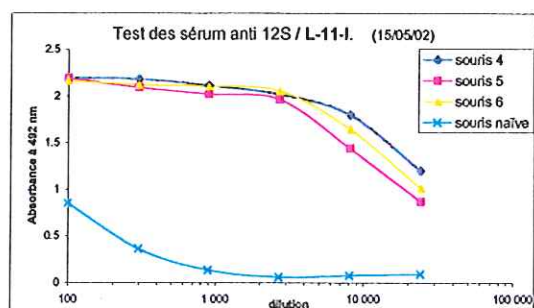
Coating avec Ag

Contrôle sans Ag

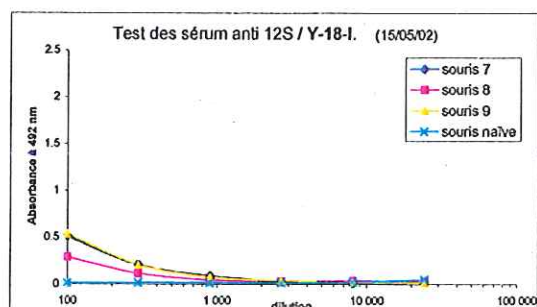
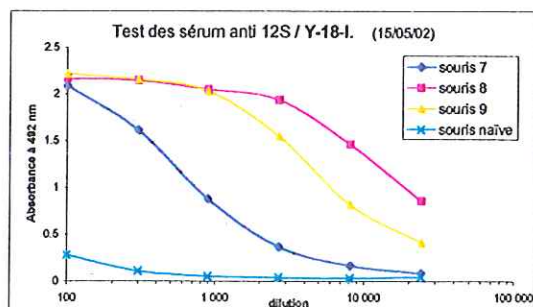
KLH-Y13H



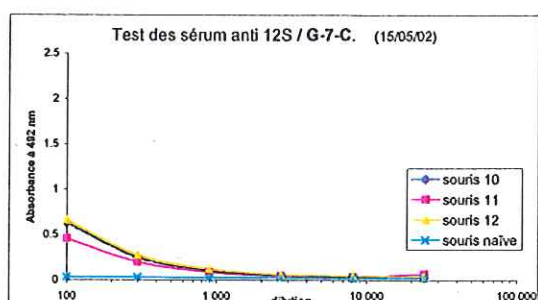
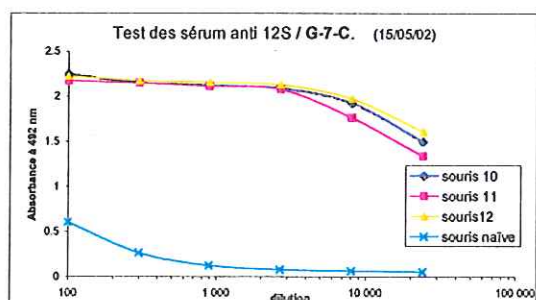
KLH-L11I



KLH-Y18I



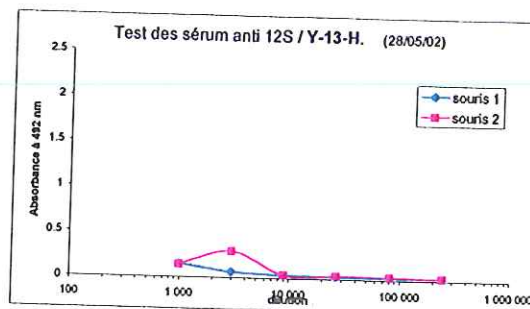
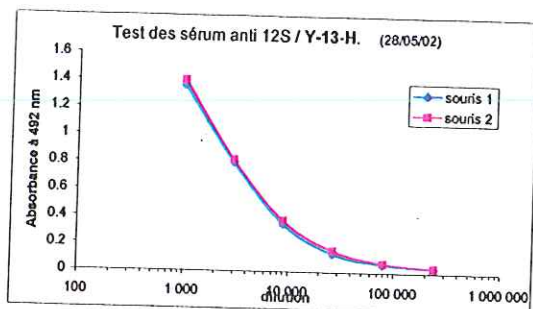
KLH-G7C



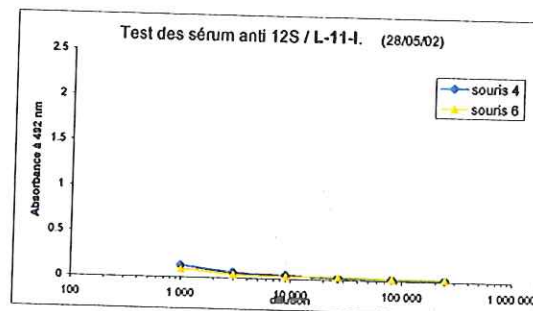
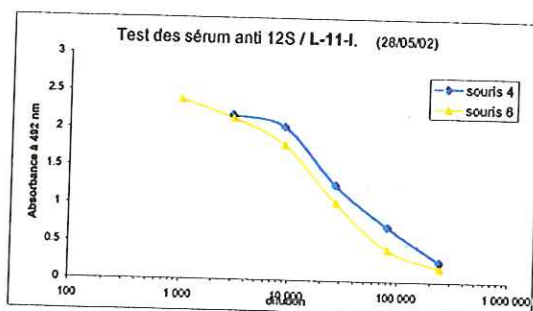
Coating avec BSA-peptide

Coating BSA

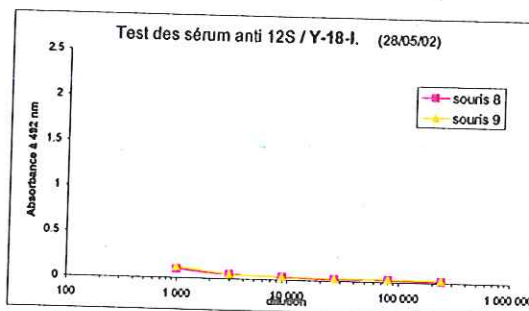
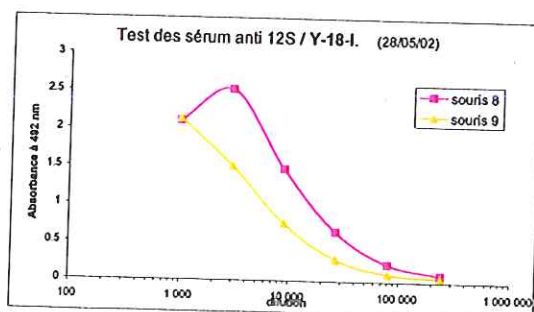
KLH-Y13H



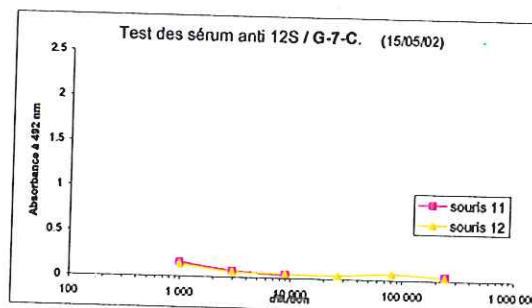
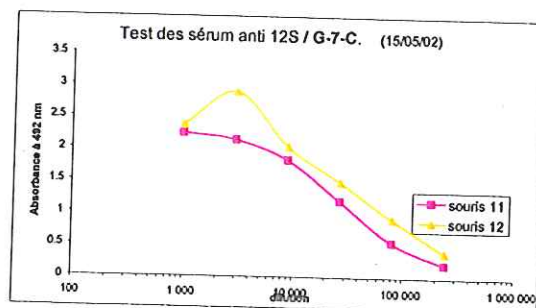
KLH-L11I



KLH-Y18I



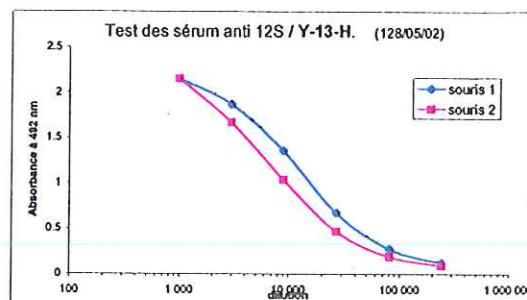
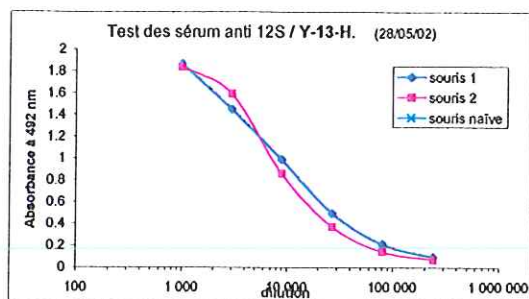
KLH-G7C



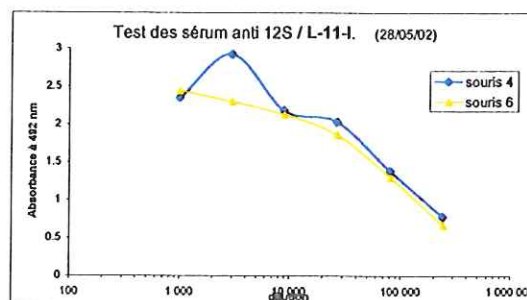
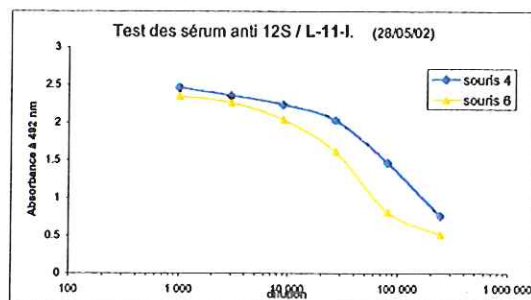
Coating avec KLH-peptide

Coating KLH

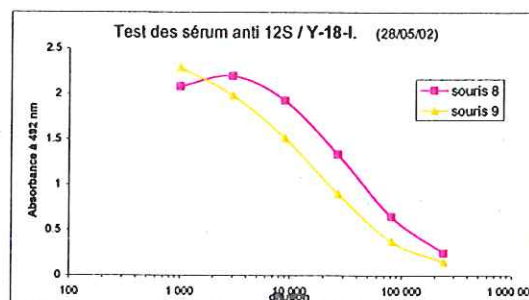
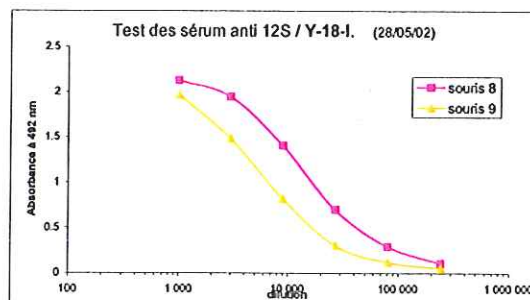
KLH-Y13H



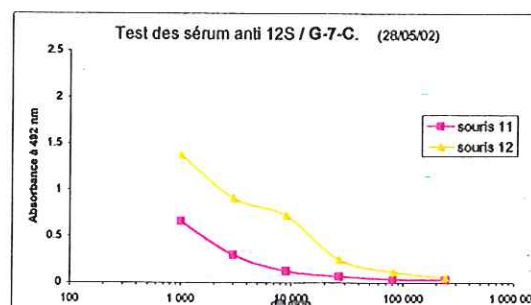
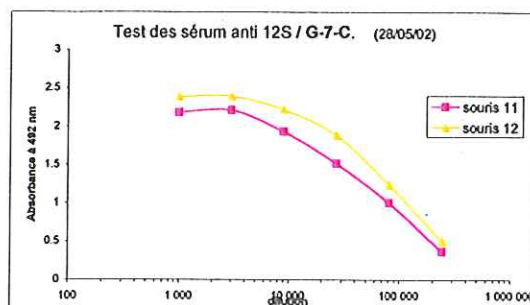
KLH-L11I



KLH-Y18I



KLH-G7C



Nom – Prénom : ARTUR Fabien

Titre de la thèse : Etude des protéines d'*Arabidopsis thaliana*, un modèle pour l'amélioration génétique du colza.

Résumé :

Une partie du programme Génoplante (INRA), vise à mettre en évidence les gènes impliqués dans le remplissage des graines de colza en vue d'améliorer leur qualité. Un rappel des avantages agronomiques et des différentes utilisations actuelles et futures du colza est décrit. L'emploi d'une espèce modèle pour cette étude s'avère nécessaire : *Arabidopsis thaliana*. L'objectif principal du travail expérimental est de comparer et de discriminer des mutants d'*Arabidopsis* du point de vue de la composition protéique de leurs graines par la technique d'électrophorèse 2-D suivie d'une analyse d'images. 4 mutants ont été retenus pour des investigations approfondies ultérieures. Une étude en électrophorèse 1-D de graines sauvages en développement montre que la maturation de certaines graines de mutants n'est pas totalement aboutie. Afin de poursuivre l'étude des protéines de réserve ainsi que leur métabolisme, une production d'anticorps polyclonaux a débuté.

MOTS CLES : colza (nom latin Colza), *Arabidopsis thaliana*, protéines de réserve de graines, électrophorèse 2-D, analyse d'images, anticorps anti-peptide.

JURY :

PRESIDENT : Monsieur **POUCHUS Yves, François**, Professeur de Botanique et de Cryptogamie, de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Nantes

ASSESSEURS : Monsieur **BIARD Jean-François**, Professeur de Pharmacognosie, de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Nantes

Madame **LARRE Colette**, Ingénieur de Recherche à l'URPVI du centre INRA de Nantes, (rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 NANTES Cedex 3)

Adresse de l'auteur : 1, rue du Calvaire, 85430 AUBIGNY