

ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE DES PROTEINES DE RESERVE DES CEREALES ET  
LEUMINEUSES: APPLICATION PARTICULIERE AUX PROTEINES BASIQUES.

Jean-Claude AUTRAN

Laboratoire de Technologie des Céréales. I.N.R.A.  
2 Place Viala. 34060 Montpellier Cedex 1

L'importance nutritionnelle et technologique des protéines de réserve des graines de céréales et de légumineuses, ainsi que leurs principales caractéristiques biochimiques et physiologiques, sont rappelées. Certaines de ces caractéristiques (synthèse en quantité très élevée au cours de la maturation du grain, avec un faible nombre de constituants polypeptidiques majeurs) peuvent rendre l'étude électrophorétique des protéines de réserve plus simple en comparaison de celle des protéines d'organes végétatifs. Par contre, d'autres caractéristiques (faible solubilité, très faible teneur en acides aminés chargés, hydrophobicité élevée, tendance à la formation d'agrégats (mettant en jeu des interactions hydrophobes ou des liaisons S-S intermoléculaires), existence de mélanges complexes et polymorphes de polypeptides correspondant à des familles de gènes étroitement liés et présentant de nombreuses homologies), sont à l'origine de difficultés dans l'analyse électrophorétique, ce qui amène souvent à modifier les protocoles classiques de séparation bidimensionnelle.

L'étude fine de la composition polypeptidique des graines de différentes céréales (blé, orge, seigle, maïs) et légumineuses (pois, haricot, soja) est illustrée au moyen des différents systèmes bidimensionnels décrits dans la littérature récente: PAGE x SDS-PAGE, PAGE (pH 3) x PAGE (pH 9), SDS-PAGE (non réduit) x SDS-PAGE (réduit), IEF x SDS-PAGE, NEPHGE x SDS-PAGE, IPG x SDS-PAGE.

Quelques exemples de problèmes de nature biochimique et génétique étudiés avec succès grâce à l'introduction des techniques bidimensionnelles sont également développés: identification des variétés et des espèces, notamment distinction de génotypes étroitement apparentés, à partir du polymorphisme des prolamines et glutélines de céréales; relations structurales et homologies entre les différentes catégories de protéines de réserve (blé, orge, seigle); identification de protéines présentant des propriétés fonctionnelles intéressantes en technologie alimentaire et exploitables en tant que marqueurs pour la sélection de nouvelles variétés (blé dur); études génétiques: localisation chromosomique des gènes de structure des polypeptides de réserve, relations phylogénétiques entre génomes, distances génétiques avec des marqueurs de caractères agronomiques ou technologiques, identification de chromosomes étrangers dans des espèces cultivées; exploitation des diagrammes 2D par analyse d'images en vue de l'étude du contrôle de l'expression des gènes (pois, maïs); microséquençage de protéines pures après transfert sur membrane des spots correspondants.

Le cas particulier des protéines de nature basique et agrégative (également très sensibles à l'oxydation), telles que les glutélines de faible poids moléculaire (LMWG) du blé ou les B-hordéines de l'orge, est plus particulièrement détaillé. Cette catégorie de protéines ne pénètre pas dans les gels IEF classiques, d'où le développement d'une nouvelle IEF en milieu réducteur pour permettre leur migration et leur séparation. Il s'agit d'un système de gels ultra-minces sur support polyester, pouvant être lavés (élimination du persulfate d'ammonium et des monomères d'acrylamide), séchés, puis réhydratés au moment de l'emploi par une solution contenant: ampholytes, urée et DTE. Après focalisation, les bandes de gel sont découpées avec leur support et directement utilisées pour la seconde dimension SDS-PAGE.

## 1. INTRODUCTION

Les protéines de réserve des grains de céréales et des graines de légumineuses présentent une importance alimentaire (nutritionnelle et technologique) considérable.

Il suffit de rappeler qu'au niveau mondial, les protéines végétales et, en particulier, celles des céréales et légumineuses, représentent en moyenne les deux tiers de notre consommation alimentaire. Par exemple, en considérant les seules protéines de céréales, avec une production avoisinant les 1.8 milliards de tonnes et une teneur des grains en protéines de 8 à 15 %, cela représente environ 200 millions de tonnes de protéines produites annuellement. La majeure partie est constituée de protéines de réserve. C'est dire l'importance de toutes les études entreprises dans le but de connaître leur composition, leur structure, leur biosynthèse, leur variabilité génétique, ceci naturellement en vue de les améliorer. Quel intérêt y a-t-il à les améliorer ? Il est double :

### FIGURE 1

- il est naturellement d'ordre nutritionnel compte tenu de leur importance alimentaire (et compte tenu que beaucoup de protéines de réserve (celles de céréales) sont pauvres en lysine et autres acides aminés essentiels (trp dans le maïs, thr dans l'orge), faisant que les grains et farines des céréales n'ont que de médiocres qualités nutritionnelles pour l'homme et les animaux monogastriques.

- il est aussi, ce qui est souvent moins connu, d'ordre technologique. En effet, les propriétés de ces protéines de réserve déterminent la possibilité d'opérer certains processus de transformation industrielle ou artisanale des grains: possibilité de fabriquer le pain ou les pâtes grâce aux caractéristiques viscoélastiques uniques des protéines du gluten de blé, possibilité de fabriquer des aliments texturés grâce aux propriétés fonctionnelles remarquables des protéines de légumineuses (soja, pois).

Ces protéines de réserve constituent enfin un modèle précieux pour l'étude du contrôle de l'expression spécifique et temporelle des gènes.

Les principales protéines de réserve ont donc fait l'objet d'études approfondies (biochimiques, génétiques, physiologiques, technologiques) au moyen de toutes les techniques possibles et ces études ont donc mis à profit les techniques d'électrophorèse bidimensionnelle à haute résolution, et ceci dès 1970 avec les travaux historiques de Colin WRIGLEY, 5 ans avant O'FARRELL ! (pour une fois, l'étude des protéines végétales n'était pas été en retard sur celle des protéines animales ou humaines).

### FIGURE 2

L'introduction de techniques à haute résolution était d'autant plus nécessaire que les génomes végétaux sont souvent (allo) polyploïdes et qu'il y a généralement redondance de l'information, avec de nombreux phénomènes de duplication de gènes.

Nous allons voir tout ceci avec une série d'exemples tirés de la littérature récente, les uns appliqués, les autres fondamentaux, touchant à la fois aux céréales (blé tendre, blé dur, orge, maïs,...) qu'aux légumineuses (pois, soja, luzerne), en distinguant successivement les différentes problématiques suivantes:

- L'étude fine de la composition polypeptidique

- Des problèmes de nature génétique et biochimique
  - Identification de variétés et des espèces
  - Etudes génétiques (relations phylogénétiques, localisation chromosomique des gènes)
  - Contrôle de l'expression des gènes
  - Relations structurales et homologies
  - Microséquençage des protéines
- Le cas particulier des protéines basiques et agrégatives, qui a récemment fait l'objet d'un développement particulier de l'électrophorèse 2D dans notre Laboratoire.

Mais cet exposé ne sera pas seulement une succession d'exemples, nous nous proposons de faire ressortir les problèmes spécifiques posés par l'étude bidimensionnelle de ces protéines de réserve.

## 2. QUELQUES RAPPELS SUR LES PROTEINES DE RESERVE DES CEREALES ET LEGUMINEUSES

Voyons tout d'abord quelles sont les particularités des protéines de réserve des grains, aux plans biochimique, physico-chimique et physiologique.

Il ne s'agit pas de protéines banales.

### FIGURE 3

Voyons, par exemple, comment se présente une protéine de la famille des oméga-gliadines du blé, ou des C-hordéines de l'orge (KREIS et al., 1985). On est ici très loin des protéines de type métabolique, enzymatique ou de structure et on conçoit que l'étude de telles protéines puisse poser des difficultés particulières.

On peut préciser de la façon suivante les principales caractéristiques biochimiques et physiologiques, qui sont propres à la fonction de réserve:

Ces protéines ont en commun le fait d'être synthétisées dans la nature pour constituer des réserves qui s'accumulent dans les graines et de pouvoir être dégradées à la germination afin de servir de nourriture à la jeune plantule. Voyons quelles sont ces propriétés caractéristiques de la fonction de réserve:

### FIGURE 4

- Synthèse en grandes quantités (200 millions de tonnes! Une toute autre échelle que celle des protéines enzymatiques ou des récepteurs d'hormones) dans l'albumen ou les cotylédons pendant la maturation du grain

- Modifications post-synthétiques: peptide signal (protéines excrétées), glycosylation, clivage protéolytique,...

- Protéines accumulées (compactées, confinées) dans des corpuscules protéiques (à l'abri du turn-over normal des protéines métaboliques)

- Evolution dans des environnements de plus en plus secs (dessiccation du grain)

- Destinées à la nourriture de la jeune plantule (germination)

- Pas d'autre fonction biologique connue

Tout ceci a de nombreuses conséquences au niveau de la méthodologie à mettre en oeuvre pour les étudier en électrophorèse bidimensionnelle :

#### FIGURE 5

- Faible nombre de polypeptides majeurs (contrairement au cas des organes végétatifs): pas de problème de sensibilité de détection (le Coomassie Blue suffit), mais problèmes de saturation du colorant.

- Séries de spots additionnels dus à des modifications post-synthétiques (glycosylations: modifications de charge, clivages: modifications de masse), souvent difficiles à distinguer des produits de plusieurs gènes différents.

- Protéines compactées sous un faible volume (corpuscules protéiques), d'où 1) une faible charge électrique (répulsion minimum) qui entraîne des difficultés en raison de leur lenteur à migrer ou à focaliser, et 2) un degré d'agrégation élevé via des liaisons S-S et des interactions hydrophobes avec parfois un caractère basique très marqué, d'où des difficultés à entrer dans les gels d'IEF classiques.

- Grande richesse en Gln et Pro: nombreuses liaisons hydrogènes

- L'évolution dans des environnements de plus en plus secs offre l'avantage de la stabilité du matériel d'étude (pas de problème de conservation, peu de protéases ou d'autres systèmes enzymatiques actifs). Mais ceci entraîne aussi des difficultés d'extraction car l'albumen ou les cotylédons d'un grain sec ne contiennent plus de structures cellulaires intactes, sont bourrés de granules d'amidon, tandis que les protéines y sont très minoritaires (8-15 %) et constituent souvent une matrice entourant les granules d'amidon. Le plus souvent, ces protéines sont alors faiblement solubles dans l'eau, avec au contraire une meilleure extractibilité dans les alcools dilués (PROLAMINES), les acides dilués ou les détergents (GLUTELINES), une hydrophobicité élevée (exposition des régions hydrophobes vers l'extérieur dans le grain mature) et une tendance à s'associer avec les lipides.

- Pas de relation étroite structure/fonction et donc vraisemblablement tolérance d'un plus grand nombre de mutations (comparativement aux protéines enzymatiques). Un polymorphisme élevé, l'existence de nombreux variants alléliques, l'existence de familles multigéniques (divergence à partir d'une séquence ancestrale par duplication de gènes, mutations ponctuelles, crossing-over asymétriques, insertions, délétions,...), expliquent le fait qu'on a affaire à des mélanges de protéines étroitement apparentées.

En résumé, certaines de ces caractéristiques (synthèse en quantité très élevée au cours de la maturation du grain, avec un faible nombre de constituants polypeptidiques majeurs; organes secs, ne posant pas de problèmes de conservation: peu de systèmes enzymatiques actifs, peu de protéases qui dégradent les protéines) et par ailleurs renfermant peu de pigments et de composés phénoliques) peuvent rendre l'étude électrophorétique des protéines de réserve plus simple en comparaison de celle des protéines d'organes végétatifs (qui renferment souvent un très grand nombre de spots mineurs et dont la richesse en pigments divers et en composés phénoliques pose parfois de problèmes en électrophorèse).

Par contre, d'autres caractéristiques (faible solubilité, très faible teneur en acides aminés chargés, hydrophobicité élevée, tendance à la formation d'agrégats (mettant en jeu des interactions hydrophobes ou des liaisons S-S intermoléculaires), peptide signal (excrétés/ RER), existence de mélanges complexes et polymorphes de polypeptides correspondant à des familles de gènes étroitement liés et présentant de nombreuses homologies), sont à l'origine de

difficultés dans l'analyse électrophorétique, ce qui amène souvent - comme on va le voir ci-dessous - à modifier les protocoles classiques de séparation bidimensionnelle (extraction, dissociants, NEPHGE, réducteurs, doses élevées d'ampholytes, gels lavés et séchés,...).

Rappelons encore que dans la plupart des céréales (à l'exception de l'avoine), les principales protéines de réserve sont les prolamines et les glutélines. Chez les légumineuses, les principales protéines de réserve sont au contraire des globulines 11S et 7S et ces espèces ne renferment jamais de prolamines.

FIGURE 6

### 3. RESULTATS

#### 3.1 - Etude fine de la composition polypeptidique

Voici quelques exemples d'études fines de la composition polypeptidique des graines de différentes céréales et légumineuses, études rendues récemment possibles par l'emploi de différents systèmes bidimensionnels: PAGE x SDS-PAGE, PAGE (pH 3) x PAGE (pH 9), SDS-PAGE (non réduit) x SDS-PAGE (réduit), IEF x SDS-PAGE, NEPHGE x SDS-PAGE, IPG-DALT.

FIGURE 7

Voici tout d'abord quelques exemples de séparations dues à Peter SHEWRY et al. (1988) avec le système classique IEF x SDS-PAGE de Patrick O'FARRELL (1975) dans le cas des fractions prolamines de plusieurs espèces: blé tendre, seigle, orge, avoine. Ceci illustre bien le nombre relativement faible de polypeptides majeurs (spots intenses) pour toutes ces protéines de réserve, particulièrement dans le cas des espèces diploïdes (orge, seigle, avoine) en comparaison de l'espèce hexaploïde (blé tendre), ainsi que l'existence de fractions homologues (pHi et Mr) parmi des familles de polypeptides appartenant à des espèces différentes: HMW-glutélines, HMW-sécalines, D-hordéines,...

FIGURE 8

Par comparaison avec les protéines de réserve de l'albumen, voici un exemple des diagrammes obtenus dans l'équipe de Dominique DE VIENNE (DAMERVAL et al., 1986, 1987; DE VIENNE et al., 1988) pour d'autres types de tissus où existe un métabolisme ralenti ou actif (embryon de pois, graine imbibée d'eau, plantule), montrant un tout autre ordre de grandeur du nombre de spots protéiques.

FIGURE 9

Un autre résultat plus détaillé obtenu avec ce même système IEF x SDS-PAGE dans le cas des protéines de réserve (ou encore protéine du gluten) d'un blé extraites à l'aide de myristate de sodium illustre les problèmes rencontrés. On observe ainsi, d'une part, des traînées horizontales, qui sont dues à une insuffisance de focalisation (dans la première dimension) des protéines les plus agrégatives (glutélines, certaines albumines) et, d'autre part, l'impossibilité de séparer les fractions agrégées les plus basiques (LMW-glutélines), absentes du diagramme.

FIGURE 10

Peter PAYNE et al. (1985), à Cambridge, ont tenté de surmonter ce problème en mettant en oeuvre deux premières dimensions différentes, une IEF normale et une variante décrite sous le nom de NEPHGE par Patricia O'FARRELL et al. (1977), d'où la caractérisation, non seulement des différentes familles de protéines (albumines, globulines, etc., mais aussi la caractérisation d'un groupe supplémentaire de spots correspondant précisément aux LMW-gluténines.

#### FIGURE 11

Voici un autre système, moins classique mais efficace, développé aux USA par Dale MECHAM et al. (1978), puis en Italie par Domenico LAFIANDRA et al. (1987), qui intègre les différences de charge à deux pH différents en mettant en jeu deux électrophorèses successives à pH 3.1 dans la première dimension, puis à pH 9.2 dans la deuxième. On sépare ici les prolamines en une quarantaine de spots, beaucoup de bandes séparées à pH acide renfermant plusieurs espèces moléculaires séparables à leur tour à pH alcalin. Mais cette expérience n'est possible qu'avec les fractions prolamines car le problème, ici, est l'impossibilité de faire migrer les fractions agrégées: les gluténines, qui forment un "bruit de fond" visible dans le diagramme de la première dimension, et qui ne migrent plus dans la deuxième.

#### FIGURE 12

Ce cliché, dû également à SHEWRY et al. (1988), donne un exemple de diagrammes bidimensionnels obtenus par l'utilisation de SDS-PAGE en conditions respectivement non réduites et réduites. On y distingue notamment les protéines monomériques qui migrent sur une diagonale et les protéines à tendance agrégative (HMW-gluténines, HMW-sécalines) qui donnent des dimères, trimères et tétramères, ainsi que des traînées horizontales continues correspondant à des séries d'oligomères de taille croissante.

### 3.2 - Problèmes de nature biochimique et génétique:

Nous poursuivrons avec quelques exemples de problèmes de nature biochimique et génétique étudiés avec succès grâce à l'introduction des techniques bidimensionnelles:

#### 3.2.1 Identification des variétés et des espèces

Cette identification est réalisée couramment et à grande échelle au niveau du commerce des grains par des techniques 1D. Mais les techniques 2D - naturellement plus lourdes et donc peu applicables à grande échelle sur des produits à faible valeur ajoutée - n'en sont pas moins précieuses dès lors qu'il s'agit de distinguer des matériels génétiques qui, de plus en plus souvent, se révèlent étroitement apparentés (et plus difficilement différenciables par simple électrophorèse 1D)

#### FIGURE 13

Chez les céréales, on fait généralement appel aux fractions qui présentent le polymorphisme le plus élevé, c'est-à-dire les prolamines et les gluténines (AUTRAN, 1986). Ce cliché illustre la possibilité offerte par le polymorphisme des prolamines (gliadines) pour l'identification des variétés de blé tendre en simple PAGE.

#### FIGURE 14

Ce cliché illustre l'apport de l'électrophorèse bidimensionnelle (à deux pH différents) dans le cas précis de deux variétés de blé dur extrêmement apparentées mais appartenant néanmoins à des catégories commerciales différentes.

Le problème a été traité également dans le cas de légumineuses comme le pois où les électrophorégrammes de protéines de réserve (légumine, viciline) sont souvent semblables d'une variété à l'autre et où ni des variétés étroitement apparentées (ni d'ailleurs des variations d'ordre pathologique) ne peuvent être différenciées par électrophorèse 1D. Une méthode à haute résolution est donc requise ici également. La solution adoptée par WESER et al. (1986) est l'utilisation de gels IPG (en gradient immobilisé), ultra-minces lavés, séchés et réhydratés avec des ampholytes porteurs et de l'urée dans la 1<sup>o</sup> dimension et de gels SDS-PAGE à gradient de concentration dans la deuxième.

FIGURE 15

### 3.2.2 - Etudes génétiques:

Le généticien a un intérêt fondamental dans la connaissance des variations occasionnées, par exemple, par les produits de différents allèles à un locus donné, ou de différents membres d'une famille multigénique. Dans tous les cas, il lui faut séparer des mélanges de protéines qui se trouvent naturellement étroitement apparentées au plan structural

Voici donc quelques exemples d'études génétiques: relations phylogénétiques entre génomes, localisation chromosomique des gènes de structure des polypeptides de réserve, identification de chromosomes étrangers dans des espèces cultivées, distances génétiques avec des marqueurs de caractères agronomiques ou technologiques,... ayant mis en jeu l'électrophorèse 2D.

#### a) Cas des relations phylogénétiques entre génomes

Une proportion importante (plus d'un tiers) des espèces végétales, notamment beaucoup de plantes de grande culture, possèdent des génomes (allo)polyploïdes. Encore actuellement, les relations d'homéologie et la phylogénie de ces génomes constitutifs des espèces polyploïdes restent des questions incomplètement résolues, y compris dans le cas du blé (où l'origine du cytoplasme et celle du génome B des tétra- et hexaploïdes demeure l'objet de controverses actives.

FIGURE 16

Comme les protéines de réserve classiques (prolamines, glutélines) sont ici peu adaptées (en raison de leur polymorphisme intra-spécifique élevé), une approche possible pour identifier les espèces donneuses des différents génomes d'une espèce polyploïde est l'analyse par électrophorèse 2D d'autres familles de protéines présentant, elles, une faible variabilité intraspécifique. On peut citer l'exemple de l'utilisation des albumines ou encore des protéines tétramériques de faible Mr (GARCIA-OLMEDO et al. (1988). Mais une tout autre approche récente a été utilisée par THIELLEMENT et al. (1989) qui considèrent au contraire un ensemble davantage exhaustif des protéines de la plantule - on sort ici du thème protéines de réserve - (457 spots exactement), au sein desquels il a été identifié des spots "caractéristiques" ou "spécifiques" de chacun des 3 génomes, d'où la construction d'un arbre de parenté des différents donneurs possibles des génomes.

FIGURE 17

b) Localisation chromosomique des gènes codant pour les protéines de réserve.

Le cas typique est celui du blé où l'on dispose grâce au travail de E.R. SEARS (1954) de séries de lignées nulli-tétrasoniques et ditélosomiques. (On rappelle que dans les nulli-tétra, chaque paire de chromosome de l'un des trois génomes a été enlevée et compensée par deux doses d'un chromosome homéologue de l'un des deux autres génomes, d'où 42 combinaisons génétiques possibles. Dans chacune des lignées ditélosomiques, c'est seulement l'un des bras chromosomique qui est absent, et ceci pour chacune des 21 paires chromosomiques). Ceci a permis une exploration systématique de toute l'information génétique nucléaire. Par exemple, chez les blés hexaploïdes, il a été possible d'identifier tous les bras chromosomiques portant des gènes de protéines de réserve

FIGURE 18

et de préciser la localisation chromosomique de tous les polypeptides majeurs

FIGURE 19

- Identification de chromosomes étrangers dans des espèces cultivées:

Voici par exemple l'illustration de la localisation dans l'électrophorogramme 2D des protéines de réserve du blé, des protéines apportées suite à l'introggression du bras chromosomique 6 Ep (B) de l'espèce sauvage *Elytrigia* (= *Agropyrum*) dans le génome d'un blé cultivé (DVORAK et al., 1986).

FIGURE 20

Un autre exemple classique est celui de l'identification des protéines provenant spécifiquement du parent seigle dans l'ensemble des protéines de réserve des Triticale (MEI GUEY LEI et REECK, 1986).

3.2.3 Etude du contrôle de l'expression des gènes:

Les diagrammes électrophorétiques 2D ont fait l'objet d'une exploitation par analyse d'images en vue de l'étude du contrôle de l'expression des gènes, notamment chez le pois et le maïs.

En effet, les techniques 2D sont particulièrement adaptées pour l'étude de l'expression quantitative *in vivo* des protéines car elles permettent à la fois de révéler un très grand nombre de produits d'expression des gènes et de faire des mesures directes des quantités relatives de chacun d'eux, soit par coloration non spécifique, soit par autoradiographie. Nous renvoyons pour cela à l'exposé suivant de Dominique DE VIENNE qui va concerner les variations de composition des protéines exprimées entre différents organes du maïs.

D'autre part, l'électrophorèse 2D a été également utilisée pour identifier avec certitude des produits de traduction *in vitro* (BARTELS et THOMPSON (1986)).

FIGURE 21

Dans tous ces exemples, il demeure cependant une difficulté importante: comment faire la part des spots qui correspondent à l'expression d'un gène et de d'éventuels spots artefactuels? Une réponse a été apportée grâce à la



très belle expérience réalisée par Norman ANDERSON et al. (1985) à partir des sous-unités HMW gluténines du blé tendre, indiquant que les spots multiples observés avec la même masse et des pIs différents, pouvaient provenir de modifications séquentielles de charge, probablement post traductionnelles.

FIGURE 22

### 3.2.4 Etude des relations structurales et des homologies entre protéines:

Une autre application est l'étude des relations structurales et homologies entre les différentes catégories de protéines de réserve (blé, orge, seigle).

Nous prendrons pour cela l'exemple des protéines de l'orge. Parmi celles-ci, le groupe des B-hordéines (80 % des hordéines totales, 30 % des protéines totales du grain d'orge) est très difficile à étudier en électrophorèse 1D car il renferme une double série de polypeptides, certains majeurs très intenses et se recouvrant partiellement en raison d'un polymorphisme au niveau des pIs et d'autres très mineurs. D'autre part, ces protéines présentent un caractère très basique et agrégatif.

En analysant en électrophorèse 2D (IEF x SDS-PAGE) les B-hordéines extraites d'un ensemble de variétés mélangées 2 à 2, SHEWRY et al. (1988) ont pu identifier par leur pIs et leur Mrs 47 polypeptides B-hordéines différents, chaque variété en renfermant entre 8 et 16, certains polypeptides se trouvant présent dans la plupart des variétés, d'autres étant au contraire limités à 1 seule variété de la collection.

FIGURE 23

Signalons que SHEWRY et al. (1988) ont ensuite précisé les homologies structurales entre ces protéines séparées en électrophorèse 2D en soumettant les spots directement excisés des gels à un clivage au bromure de cyanogène et en séparant les peptides obtenus par SDS-PAGE en gradient de concentration d'acrylamide.

Ces problèmes de relations structurales peuvent encore être illustrés grâce au travail réalisé sur les protéines de réserve de la luzerne par KROCHKO et al. (1988), qui associe une PAGE non dénaturante à une SDS-PAGE après réduction. Ce système permet de dissocier et de séparer des protéines oligomériques en leurs constituants. L'alignement vertical de polypeptides suggère que ceux-ci sont des sous-unités du même oligomère. La quantification de ces spots peut permettre d'approcher la stoechiométrie du complexe oligomérique.

FIGURE 24

Une approche comparable du problème a été menée par GARCIA-OLMEDO et al. (1988) sur des protéines tétramériques de faible poids moléculaire en utilisant cette fois différentes combinaisons : 1A) SDS-PAGE réduit/non réduit, 1B) IEF non réduit (urée 8M) x SDS-PAGE non réduit, 1C) IEF non réduit x SDS-PAGE réduit, 1D) IEF réduit x SDS-PAGE réduit. La comparaison de ces différentes combinaisons permet d'identifier:

FIGURE 25

- les polypeptides liés par des S-S (lignes verticales au dessous de la diagonale du 1A)

- le pHi et le Mr d'oligomères (2A) et le Mr de leurs sous-unités (1C)

- toutes les sous-unités réduites par leurs pI et Mr apparents (1D)

Signalons enfin le travail de LAWRENCE et PAYNE (1985) qui, grâce au traitement par le dihydrochlorhydrate de cystamine (réactif positivement chargé), a permis d'identifier quatre résidus cystéines des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire du blé. Le fait que chacun des spots de la série diffère par une seule charge supplémentaire fixée à la fois est vraisemblablement rendu possible par la disponibilité des SH et donc leur capacité à participer à des réactions d'échange de groupement -SH.

FIGURE 26

### 3.2.5 - Microséquençage de protéines après transfert sur membrane de spots d'électrophorèse 2D:

Les protéines de réserve, en raison de leurs caractéristiques d'homologie et de codage par des familles multigéniques (degré d'homologie considérable), sont souvent difficiles à obtenir à l'état pur par les méthodes préparatives (chromatographie) classiques. D'où l'intérêt de pouvoir récupérer des constituants (très purs) par transfert à partir de gels 2D, ceci le plus souvent à des fins de séquençage des acides aminés. (Ceci supposant que des conditions optimales d'électro-transfert aient pu être développées pour chaque type de protéine). Un tel travail a été réalisé avec certains spots LMW-gluténines du blé tendre par KASARDA et al. (1988), qui ont ainsi pu séquencer jusqu'à 14 résidus à partir d'un seul spot 2D d'une sous-unité LMW (environ 10 picomoles éluées à partir d'un spot d'environ 20 pm).

FIGURE 27

Cependant, la possibilité existe d'un blocage de l'extrémité N-terminale en raison d'une réaction entre le groupement amine et un ou plusieurs des réactifs utilisés lors de l'IEF, de la SDS-PAGE, ou de l'éluion à partir du gel. Récemment, cependant, des micro-séquençage ont été réussis à partir de 7 picomoles seulement de protéine fixée sur membrane de PVDF ou de fibre de verre après électro-transfert. La séquence peut être réalisée à partir des spots ou des bandes colorées, sans éluion des protéines à partir de la membrane et sans élimination du colorant, en insérant directement le fragment de membrane contenant la protéine dans la chambre du séquenceur.

### 3.3. - Cas des protéines de nature basique et agrégative

On trouve des protéines de nature très basique et agrégative (qui sont également très sensibles à l'oxydation), chez les céréales. Ce sont en particulier les gluténines de faible poids moléculaire (LMWG) du blé ou les B-hordéines de l'orge, dont l'étude a fait l'objet d'un développement particulier dans notre laboratoire INRA de Montpellier.

Il a été montré (AUTRAN et al., 1987) que les fractions LMWG intervenaient directement dans l'explication des propriétés viscoélastiques du gluten et peut-être simplement par la proportion des protéines codées par les différents allèles (LMW1 et LMW2).

FIGURE 28

D'où la possibilité de prédire cet aspect de la qualité en quantifiant les protéines appartenant à ce groupe après électrophorèse. Malheureusement, cette famille protéique (bien que représentant 30-40 % des protéines totales) est extrêmement mal caractérisée en raison :

- de son caractère basique très marqué (difficulté de les faire pénétrer dans les gels IEF classiques)
- du caractère très agrégatif de leurs constituants, même à l'état réduit (échec de toutes les tentatives de purification) et de leur sensibilité à l'oxydation in vitro, par exemple au cours d'une IEF
- de la similitude de Mr de leurs sous-unités avec ceux de la famille des gliadines: d'où la difficulté de les caractériser et de les quantifier par simple électrophorèse 1D.

D'où l'intérêt de développer un système 2D adapté à la séparation et à la quantification de ces protéines que nous considérons comme très importantes en technologie alimentaire.

L'idée retenue (MOREL et AUTRAN, 1988, 1990) est fondée sur une nouvelle IEF en milieu réducteur. Le système de gels ultra-minces sur support polyester, pouvant être lavés (élimination du persulfate d'ammonium et des monomères d'acrylamide), séchés, puis réhydratés au moment de l'emploi par une solution contenant: ampholytes, urée et DTE. Après focalisation, les bandes de gel sont découpées avec leur support et directement utilisées pour la seconde dimension SDS-PAGE.

#### FIGURE 29

Ce système 2D permet de caractériser avec précision, parmi l'ensemble des protéines de réserve, les polypeptides appartenant à la famille des LMW. Il va devenir également possible de quantifier spécifiquement ces spots (grâce au système d'analyse d'images dont notre laboratoire vient d'être pourvu: scanner + station VAX 2500 + logiciel KEPLER) en vue de préciser le rôle de marqueur de qualité des blés de ces protéines.

#### FIGURE 30

### CONCLUSIONS

#### FIGURE 31

La grande variété de procédés 2D rapportés ces dernières années dans la littérature témoigne de la remarquable flexibilité de cette technique de séparation en tant qu'outil de haute résolution et qui peut être utilisé non seulement au plan qualitatif, mais également à des fins quantitatives et préparatives.

Les techniques 2D sont les seules à permettre la résolution de plusieurs centaines de produits d'expression des gènes et, dans plusieurs cas tels que certaines études structurales, elles permettent un gain de temps et de dépenses considérables par rapport à d'autres procédés.

#### FIGURE 32

Leur sensibilité particulièrement élevée permet l'analyse du phénotype biochimique d'un individu tel que la graine, (en travaillant sur une faible partie de l'albumen) sans détruire la capacité de celle-ci à germer et à donner une descendance, ce qui est idéal pour des études génétiques.

Le choix du procédé de séparation est dicté par le problème étudié et il ne peut pas être fait de recommandation générale (quoil que spécificité des protéines de réserve impose certaines contraintes). Il peut cependant être souligné que le SDS-PAGE est plus utile pour les études structurales, (où les Mrs apparents présentent un intérêt) que dans les études génétiques où les groupes de protéines de la même taille doivent être absolument séparés les

uns des autres. Dans ce dernier cas, la combinaison de deux méthodes de séparation fondées sur la charge des molécules dans deux situations différentes (i.e. IEF, NEPHGE, ou acide/basique, présence/absence de dissociant ou de réducteur) donne habituellement une meilleure résolution.

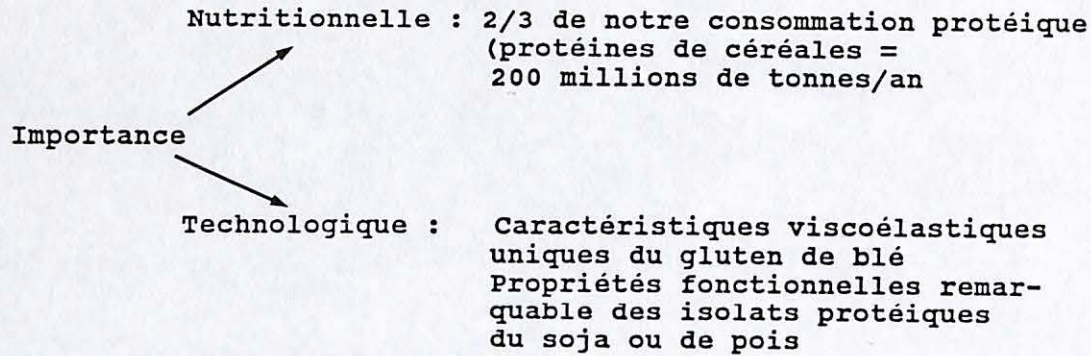
Malgré le faible nombre de polypeptides majeurs qui caractérise les protéines de réserve des graines de céréales et légumineuses, les systèmes 2D sont de plus en plus souvent nécessaires pour résoudre les problèmes génétiques et physiologiques (et même certains problèmes du commerce des grains !), en raison de l'existence de familles multigéniques complexes et aussi d'un nombre croissant de génotypes étroitement apparentés.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON N.G., TOLLAKSEN S.L., PASCOE F.H. and ANDERSON L. - 1985. Two-dimensional electrophoretic analysis of wheat seed proteins. *Crop Sci.*, 25 (4), 667-674.
- AUTRAN J.C. - 1986. Identification des céréales et autres plantes par électrophorèse. *Biofutur*, 51, 121-126.
- AUTRAN J.C., LAIGNELET B. and MOREL M.H. - 1987. Characterization and quantification of low-molecular-weight glutenins in durum wheats. *Biochimie*, 69 (6-7), 699-711.
- BARTELS D. and THOMPSON R.D. - 1986. Synthesis of mRNAs coding for abundant endosperm proteins during wheat grain development. *Plant Sci. (Limerick, Irel.)*, 46 (2) 117-125.
- DAMERVAL C., DE VIENNE D., ZIVY M. and THIELLEMENT H. - 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7 (1), 52-54.
- DAMERVAL C., ZIVY M., GRANIER F. and DE VIENNE D. - 1987. Two-dimensional electrophoresis in plant biology. *Adv. Electrophor.*, 2, 263-340.
- DE VIENNE D., LEONARDI A. and DAMERVAL C. - 1988. Genetic aspects of variation of protein amounts in maize and pea. *Electrophoresis*, 9, 742-750.
- DVORAK J., KASARDA D.D., DIETLER M.D., LEW E.J.L., ANDERSON O.D., LITTS J.C. and SHEWRY P.R. - 1986. Chromosomal location of seed storage protein genes in the genome of *Elytrigia elongata*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28 (5), 818-830.
- FIELD M. and SHEWRY P.R. - 1987. Prolamin subunit interactions in hexaploid and octoploid triticales and their wheat and rye parents. *J. Cereal Sci.*, 6, 199-210.
- GARCIA-OLMEDO F., SALCEDO G., ARAGONCILLO C., SANCHEZ-MONGE R., COLLADA C. and GOMEZ L. - 1988. Two-dimensional electrophoresis as a tool for structural and genetic studies of seed proteins from Poaceae and Fagaceae. *Electrophoresis*, 9 (11), 719-727.
- KASARDA D.D., TAO H.P., EVANS P.K., ADALSTEINS A.E. and YUEN S.W. - 1988. Sequencing of protein from a single spot of a 2-D gel pattern: N-terminal sequence of a major LMW-glutenin subunit. *J. Exp. Bot.*, 39, 204, 899-906.
- KERBY K., KUSPIRA J. and JONES B.L. - 1988. Biochemical data bearing on the relationship between the genome of *Triticum urartu* and the A and B genomes of the polyploid wheats. *Genome*, 30 (4), 576-581.
- KREIS M., SHEWRY P.R., FORDE B.G., FORDE J. and MIFLIN B.J. - 1985. Structure and evolution of seed storage protein and their genes with particular reference to those of wheat, barley and rye. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology*, 2, 253-317.
- KROCHKO J.E. and BEWLEY J.D. - 1988. Use of electrophoretic techniques in determining the composition of seed storage proteins in alfalfa. *Electrophoresis*, 9 (11), 751-763.

- LAFIANDRA D., COLAPRICO G., KASARDA D.D. and PORDEDDU E. - 1987. Null alleles for gliadin blocks in bread and durum wheat genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 610-616.
- LAWRENCE G.J. and PAYNE P.I. - 1985. The half-cystine content of glutenin subunits of wheat determined by reaction with cystamine dihydrochloride and two-dimensional electrophoresis. *J. Cereal Sci.*, 2, 225-239.
- MEI GUEY LEI and REECK G.R. - 1986. Two-dimensional electrophoretic analysis of kernel proteins of triticales and their parental durum wheats and ryes. *Cereal Chem.*, 63 (2), 116-123.
- MOREL M.H. et AUTRAN J.C. - 1989. Electrofocallisation des protéines de réserve hautement agrégatives du blé (Triticum durum L.). *Pharmacia Actualités*, 10, 16.
- MOREL M.H. and AUTRAN J.C. - 1990. Separation of durum wheat proteins by ultra-thin IEF: a new tool for the characterization and quantification of low-molecular-weight glutenins. *Electrophoresis*, (accepted).
- O'FARRELL P.H. - 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250, 4007-4021.
- O'FARRELL P.Z., GOODMAN H.M. and O'FARRELL P.H. - 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12, 1133-1142.
- PAYNE P.I., HOLT L.M., JARVIS M.G. and JACKSON E.A. - 1985. Two-dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (Triticum aestivum): Biochemical and genetic studies. *Cereal Chem.*, 62 (5), 319-326.
- SHEWRY P.R., PARMAR S. and FIELD J.M. - 1988. Two-dimensional electrophoresis of cereal prolamins: Applications to biochemical and genetic analysis. *Electrophoresis*, 9 (11), 727-737.
- SHEWRY P.R., PARMAR S. and PAPPIN D.J.C. - 1987. Characterization and genetic control of the prolamins of Haynaldia villosa: Relationship to cultivated species of the Triticeae (rye, wheat, and barley). *Biochem. Genet.*, 25 (3-4), 309-325.
- THIELLEMENT H., SEGUIN M., BAHRMAN N. and ZIVY M. - 1989. Homoeology and phylogeny of the A, S, and D genomes of the Triticeinae. *J. Mol. Evol.*, 29 (1), 89-94.
- WESER J., POSTEL W., GUNTHER S. and GORG A. - 1986. Horizontal high resolution IPG-DALT of pea proteins. In: *Electrophoresis '86* (M.J. Dunn, Ed.), CCH, Weinheim, RFA, pp.607-610.
- WRIGLEY C.W. - 1970. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis: Application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. *Biochem. Genet.*, 4, 509-516.

PROTEINES DE RESERVE DES GRAINS  
(CEREALES ET LEGUMINEUSES)



Nécessité d'études biochimiques, génétiques, physiologiques  
approfondies



Introduction des techniques bidimensionnelles à haute  
résolution (Colin Wrigley, 1970).

FIGURE 1

Colin W. Wrigley, 1970

Triticum aestivum L.

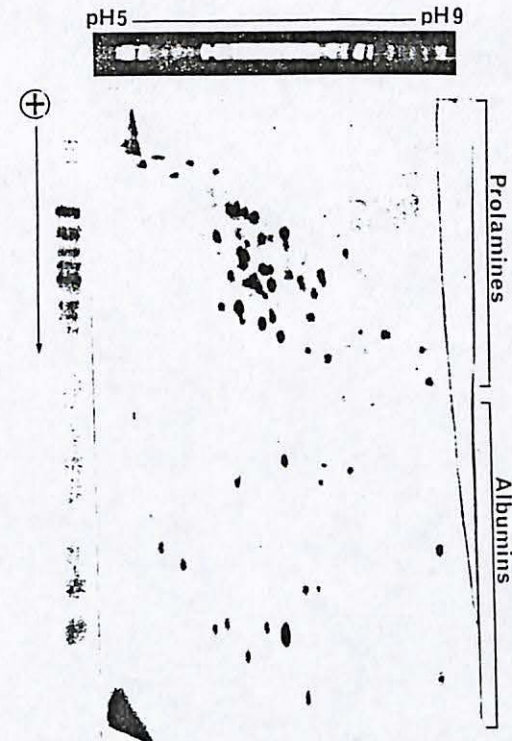


Fig. 1. Combined gel isoelectric focusing and electrophoresis of proteins from wheat endosperm.

FIGURE 2

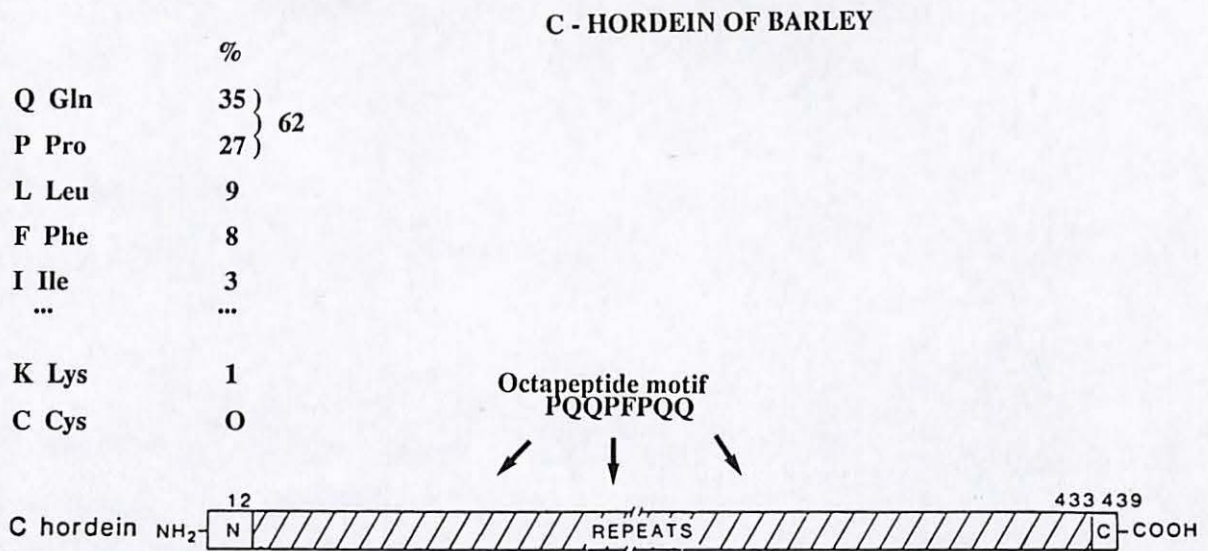


FIGURE 3

### CARACTERISTIQUES DES PROTEINES DE RESERVE DES GRAINS

- Synthèse en grandes quantités pendant la maturation du grain.
- Modifications post-synthétiques : peptide signal (protéines excrétées), glycosylation, clivage protéolytique,...
- Accumulation dans des corpuscules protéiques
- Accumulation dans des environnements de plus en plus secs (dessiccation du grain).
- Destinées à la nourriture de la jeune plantule (germination).
- Pas d'autre fonction biologique connue.

FIGURE 4





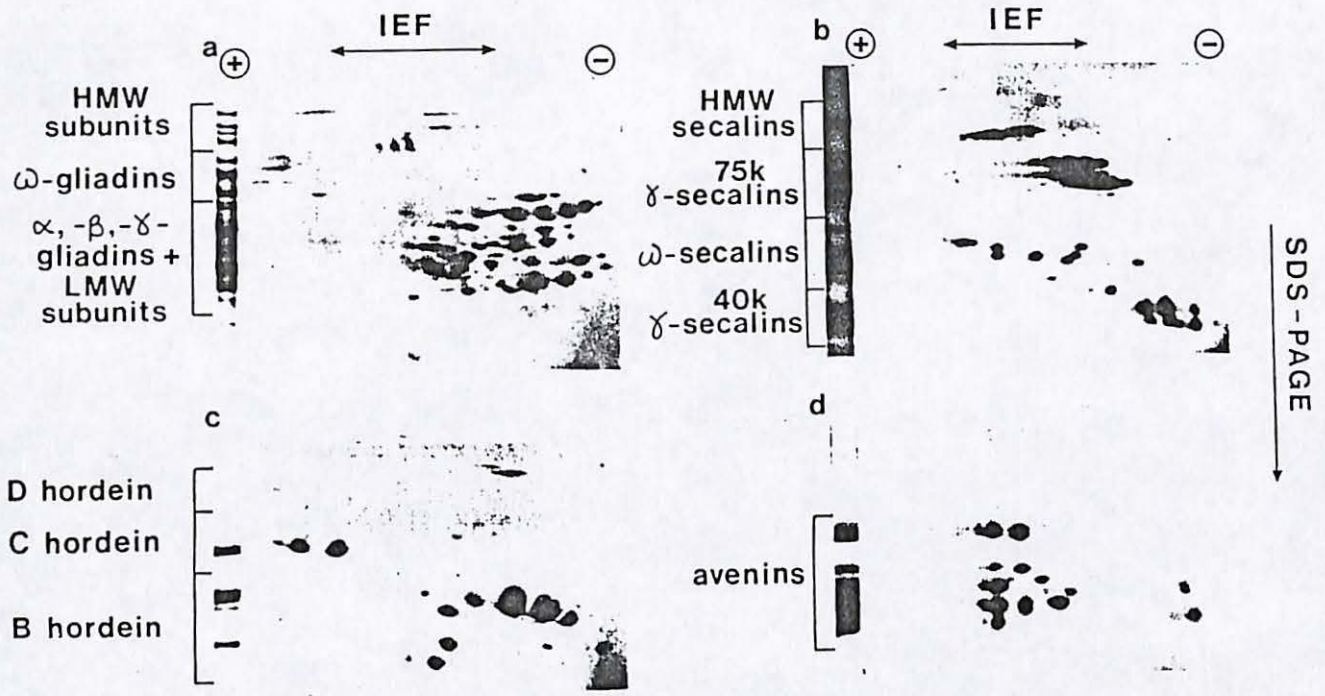
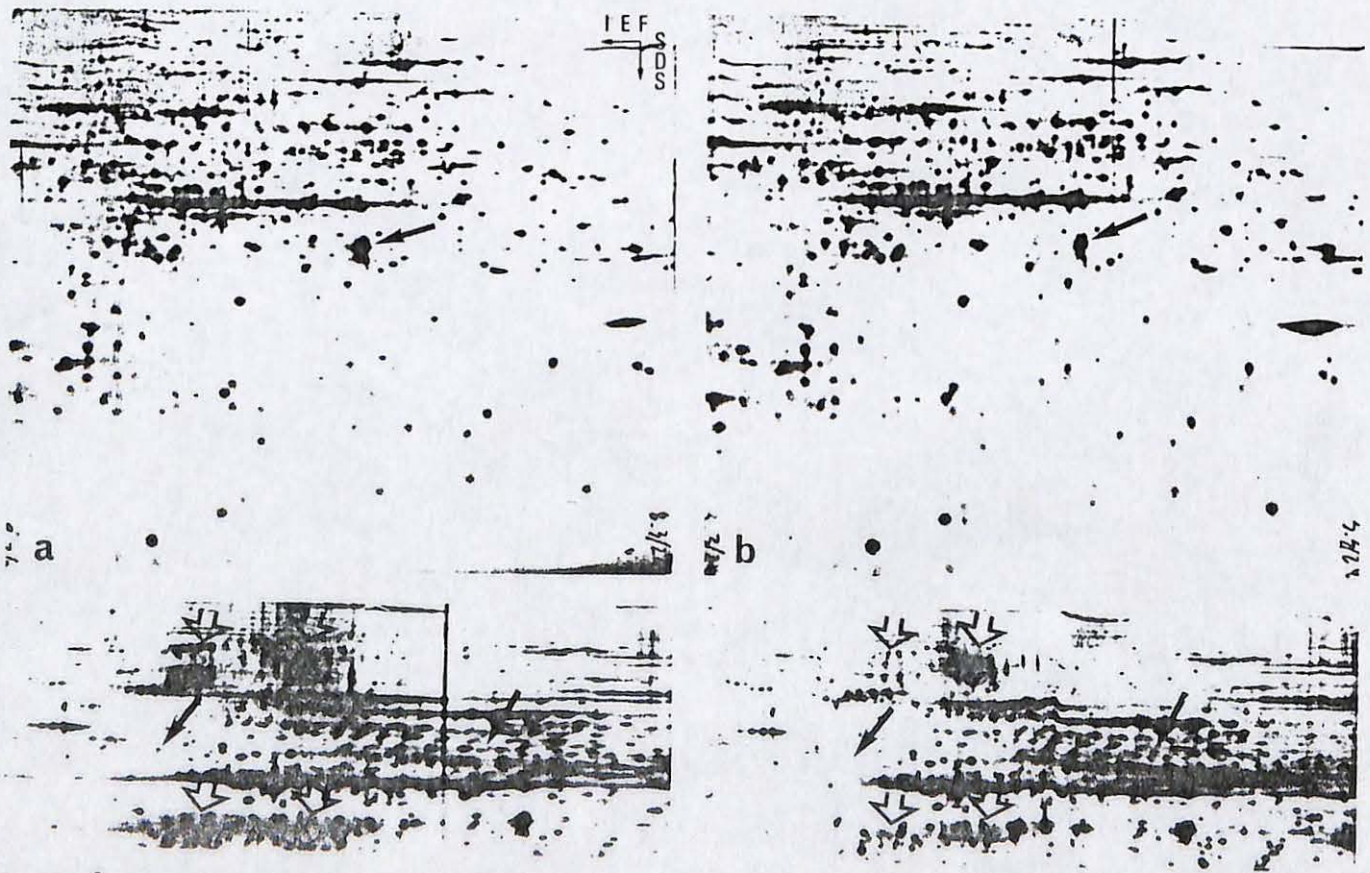


Figure 2. 2-D IEF/SDS-PAGE (modified Laemmli system) separations of reduced and pyridylethylated total prolamins (*i. e.* prolamins I + II) fractions from (a) wheat (cv. Chinese Spring), (b) rye (inbred line MP1 209), (c) barley (line P12/1) and (d) oats (cv. Goodland). IEF in the pH range 3.5-10 for (a), (c) and (d), and pH 5-9 for (b). (a) is from [70], (b) from [12], (c) from [77] and (d) is previously unpublished.

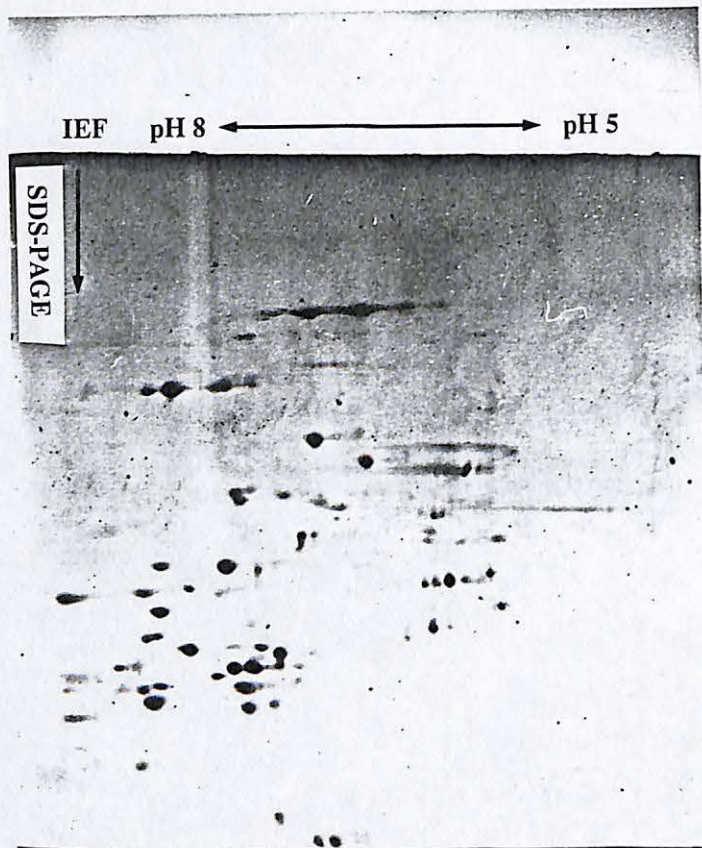
( from SHEWRY et al., 1988 )

FIGURE 7



from DE VIENNE et al., 1988

FIGURE 8



Protéines du gluten de blé  
Extraction : myristate de sodium

FIGURE 9

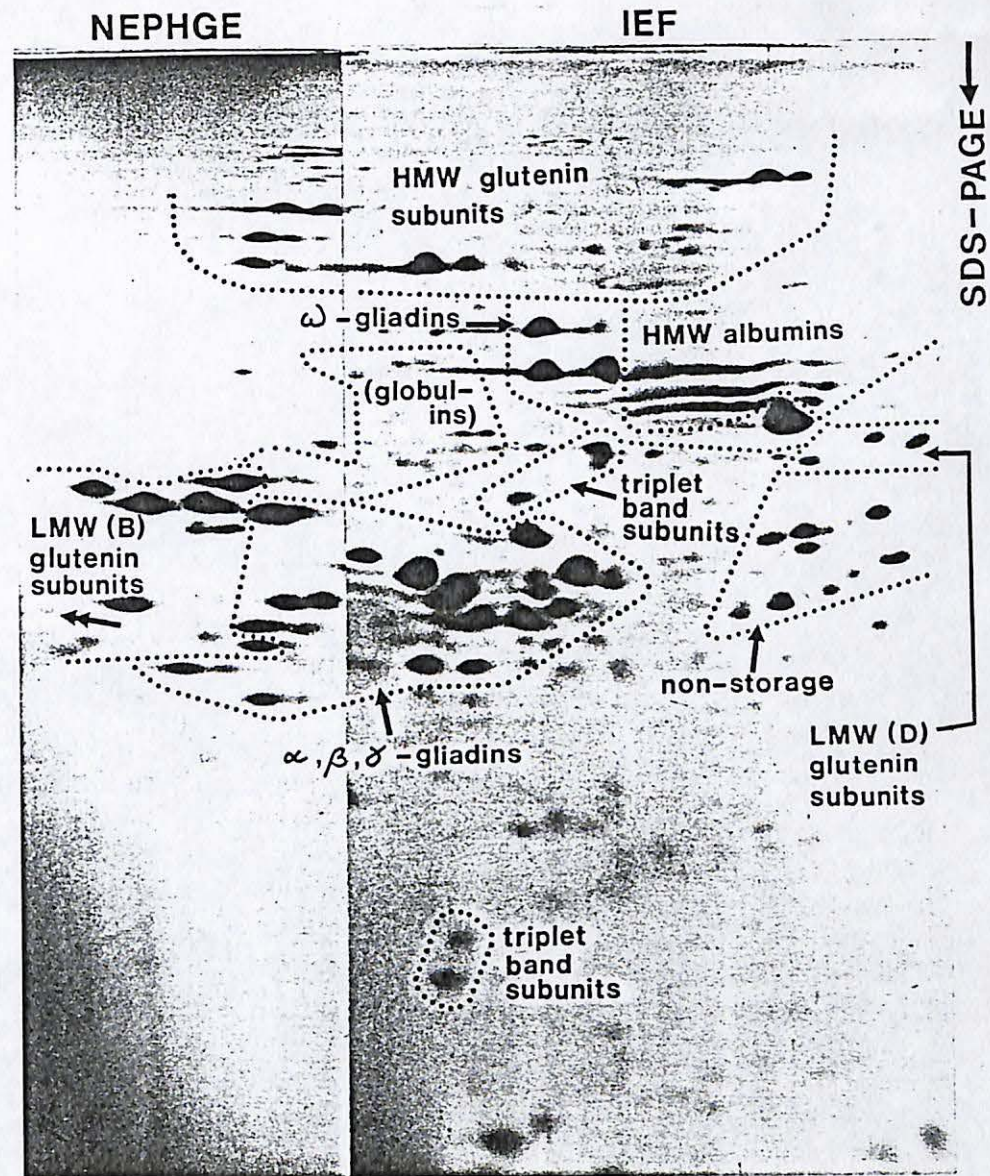
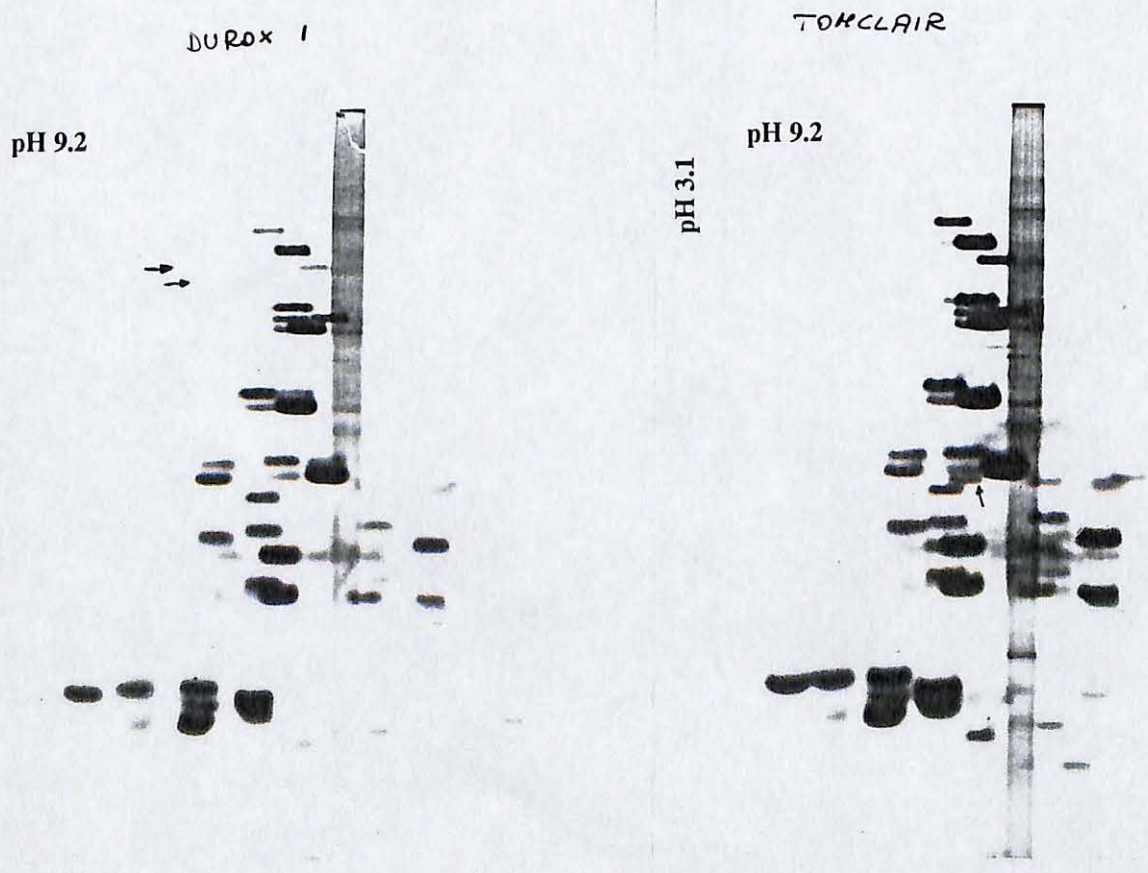
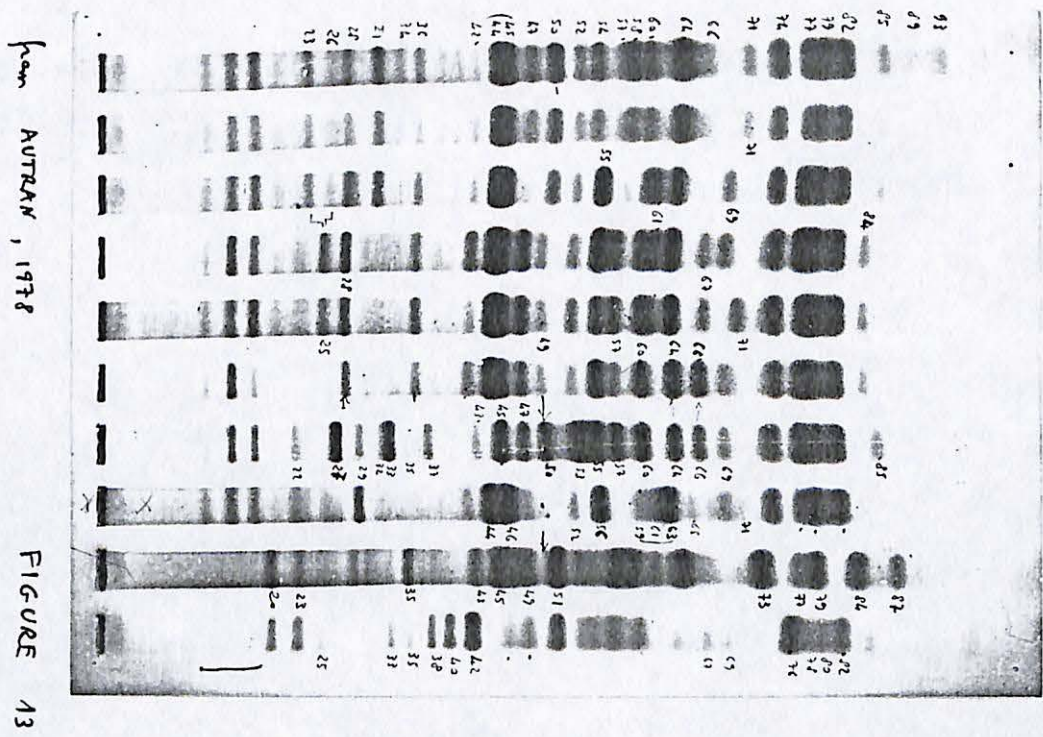


FIGURE 10





from LAFIAN DRA and AUTRAM, unpublished results

FIGURE 14



Fig. 1. Horizontal IPG-Dalt of seed proteins of *Pisum sativum*, Sprite. 1st dimension: IPG-CA 5.5 - 6.5, 2nd dimension: SDS pore gradient electrophoresis T = 12-17 % together with a stacking gel T = 8 %.



Fig. 2. Horizontal IPG-Dalt of seed proteins of *Pisum sativum*, Platinum. 1st dimension: IPG-CA 5.5 - 6.5, 2nd dimension: SDS pore gradient electrophoresis T = 12-17 % together with a stacking gel T = 8 %.

FIGURE 15

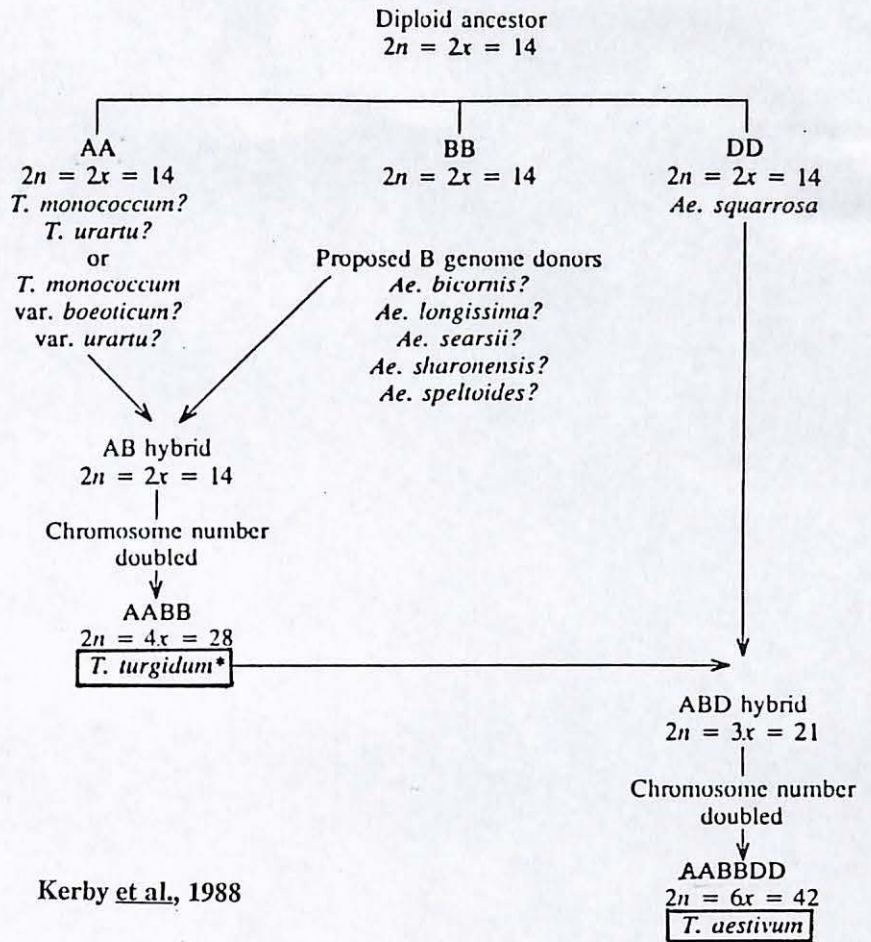


FIGURE 16

Graine de pois imbibée d'eau Weser et al., 1986

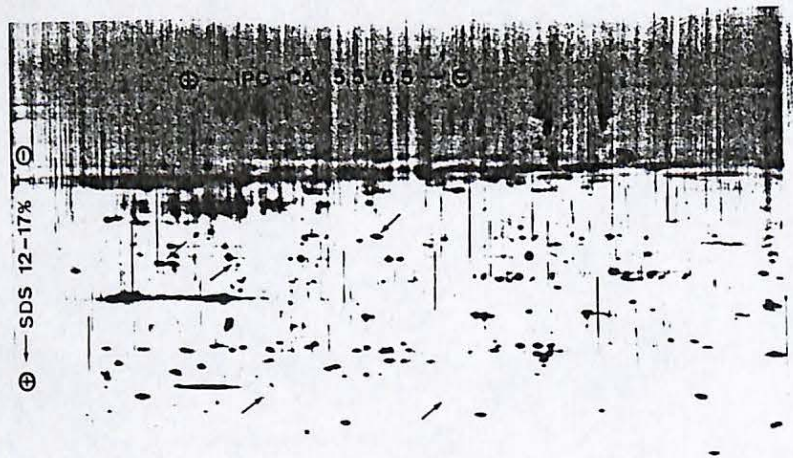
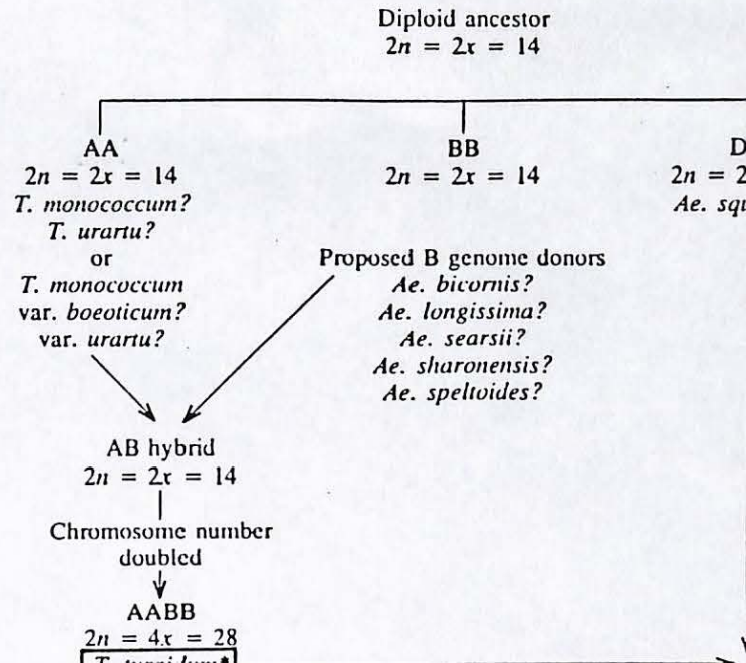
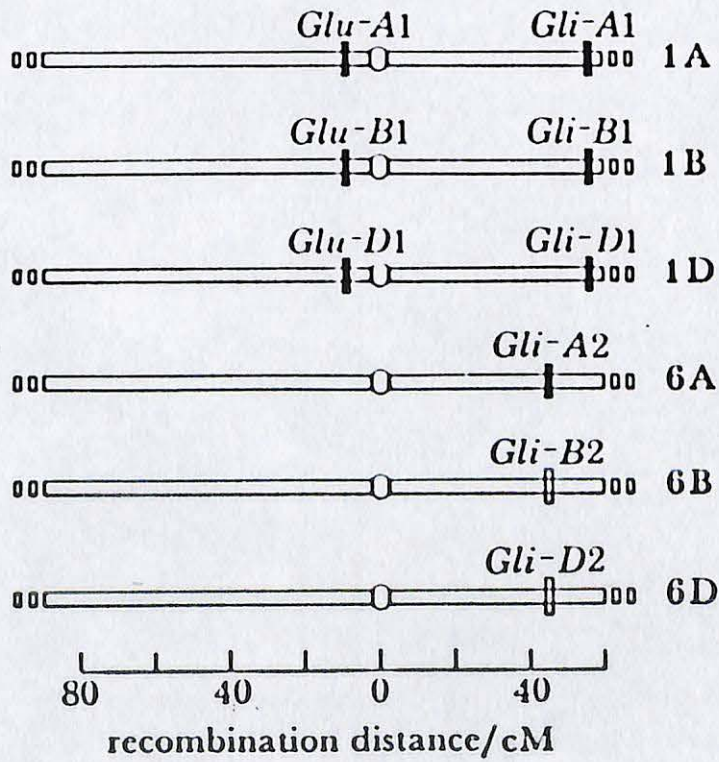
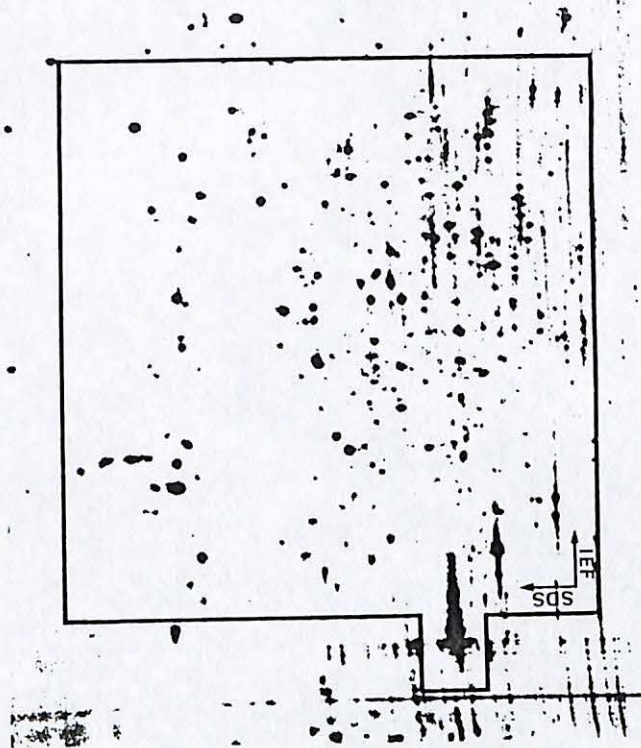


Fig. 1. Horizontal IPG-Dalt of seed proteins of *Pisum sativum*, Sprite. 1st dimension: IPG-CA 5.5 - 6.5, 2nd dimension: SDS pore gradient electrophoresis T = 12-17 % together with a stacking gel T = 8 %.



Thiellement et al., 1989

FIGURE 17



Chromosomal location of the storage protein genes in wheat.

Payne et al., 1984





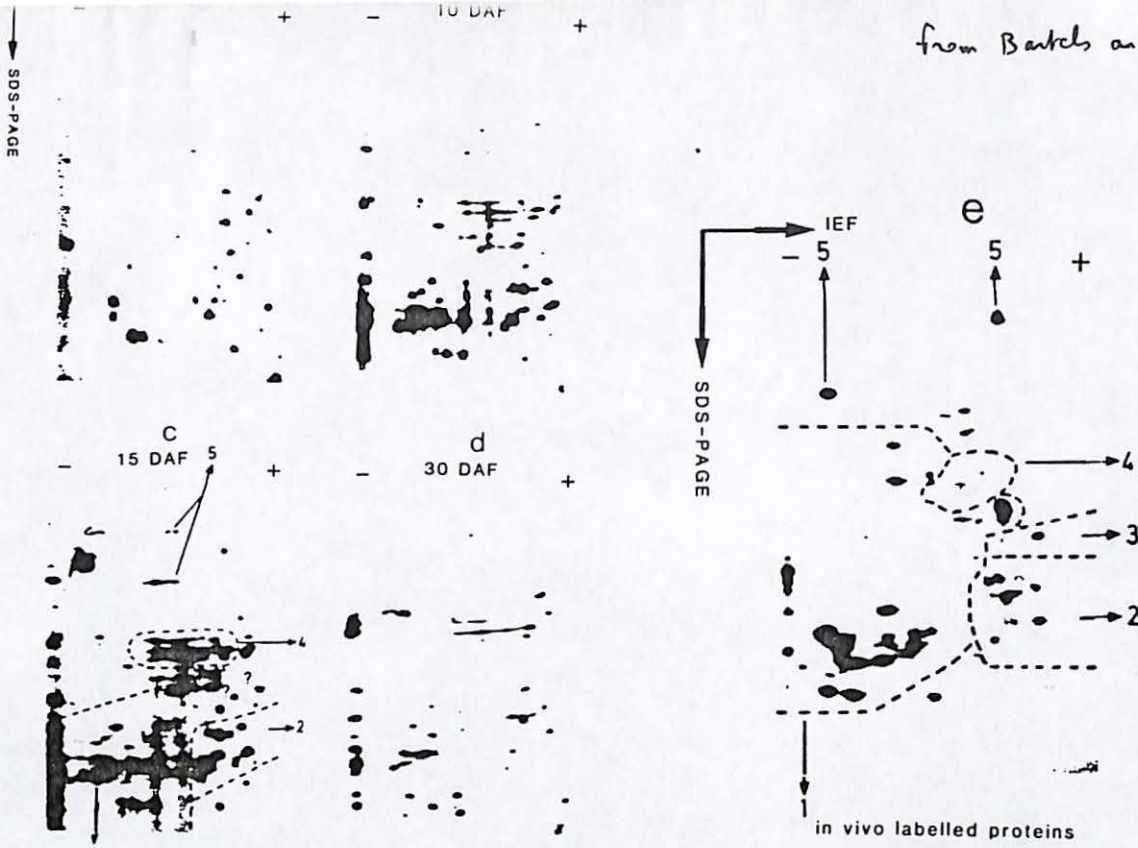
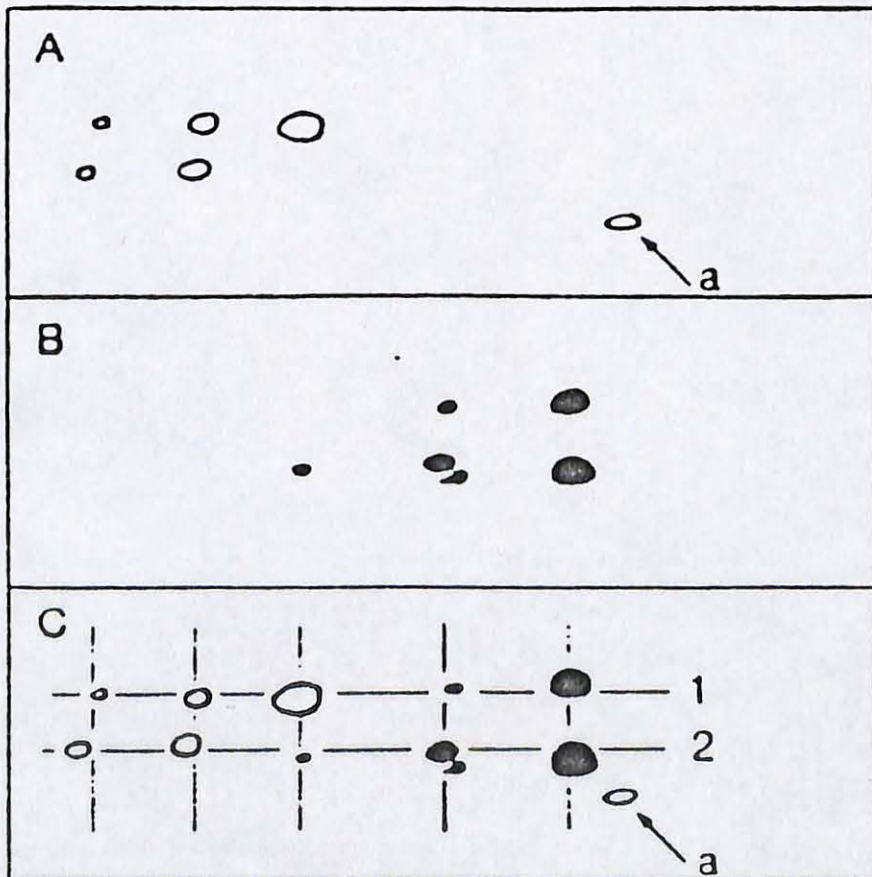


Fig. 3. 2-Dimensional separation of in vitro and in vivo proteins. Equal amounts of poly A<sup>+</sup> RNAs from grains of different developmental stages (as indicated in Fig. 3a-d) were translated in vitro using [<sup>3</sup>H]proline and [<sup>3</sup>H]leucine as labelled amino acids. A 20- $\mu$ l sample buffer (10% v/v  $\beta$ -mercaptoethanol, 10% w/v SDS and 20% v/v glycerol) was added to an equal volume of in vitro translation assay. The sample was placed onto a prefocused rod gel for isoelectrofocusing for 15 h at 400 V and 1 h at 800 V. For the second dimension the rod gels were placed on to the stacking gel of a 10% SDS-polyacrylamide slab gel. The gels were fixed in 6% trichloroacetic acid, 5% ethanol before fluorography. (e) Grains from 15 DAF were labelled in vivo using [<sup>3</sup>H]proline and [<sup>3</sup>H]leucine as labelled amino acids. The proteins were extracted and separated by 2-dimensional fractionation (IEF  $\times$  10% SDS-PAGE). In (c) and (e) the different protein groups are indicated: 1 =  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadins, 2 = 'non-storage' proteins, 3 = LMW-glutenins, 4 = HMW albumins, 5 = HMW-glutenins.

121

FIGURE 21

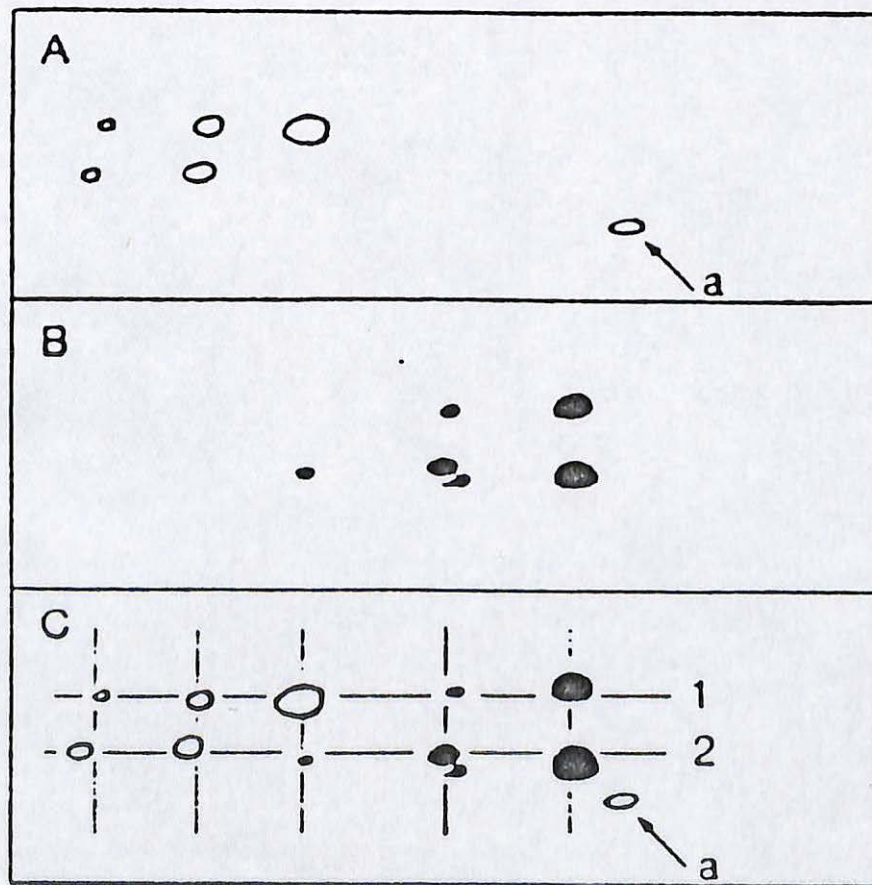


Charge modification in HMW subunits of *T. aestivum*

Anderson et al., 1985

FIGURE 22

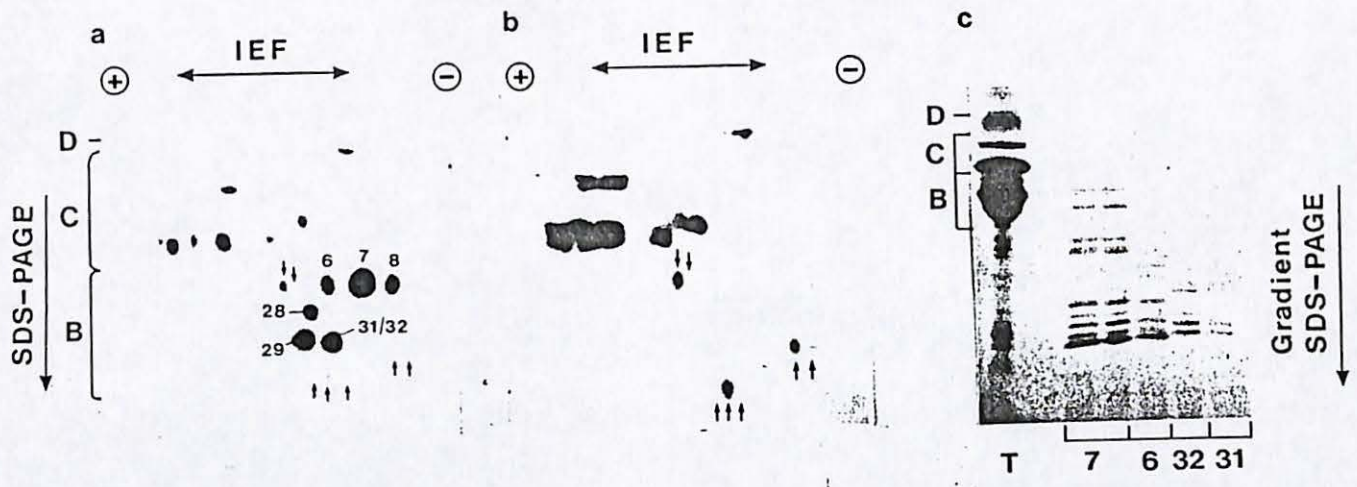
FIGURE 21



Charge modification in HMW subunits of *T. aestivum*

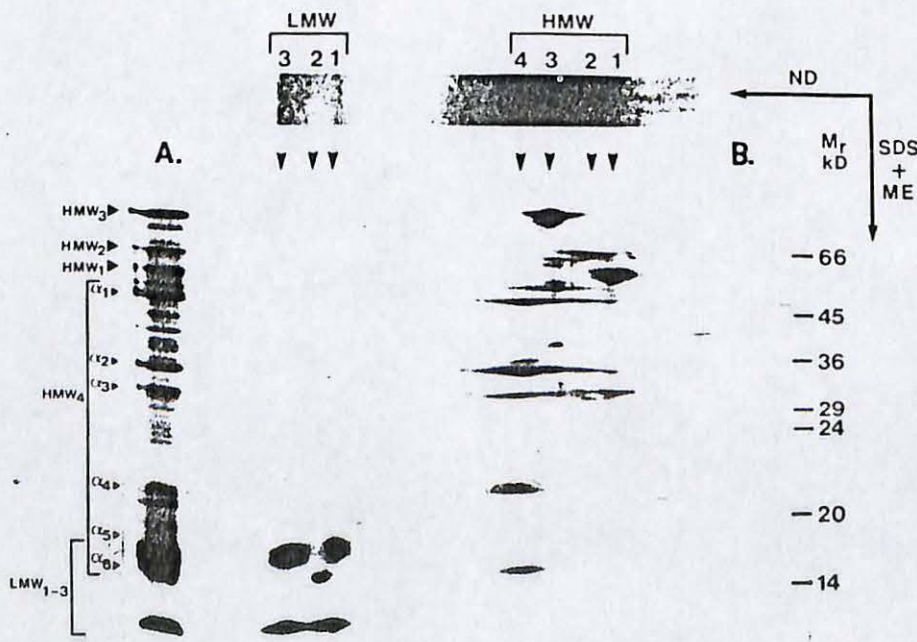
Anderson et al., 1985

FIGURE 22



Shewry et al., 1988

FIGURE 3



Krochko et Bewley, 1988

Figure 4. Subunit analysis of S-1 fraction proteins by 2-D electrophoresis. (A) One-dimensional gel electrophoresis of reduced and dissociated polypeptides of S-1 fraction proteins (SDS-PAGE + ME, 12 %T). (B) 2-D gel electrophoresis of S-1 fraction proteins. First dimension: ND-PAGE (7 %T). Second dimension: electrophoresis under denaturing conditions with a reducing agent (SDS-PAGE + ME, 12 %T). The reduced and dissociated polypeptides of the major proteins as indicated (see text).

FIGURE 24

García-Olmedo et al., 1988  
 CM-protéines de *Triticum aestivum* L.

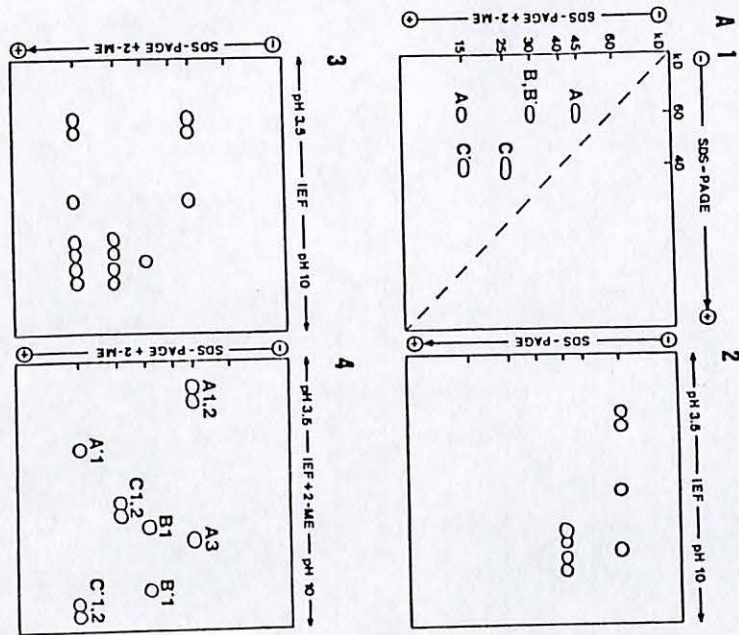
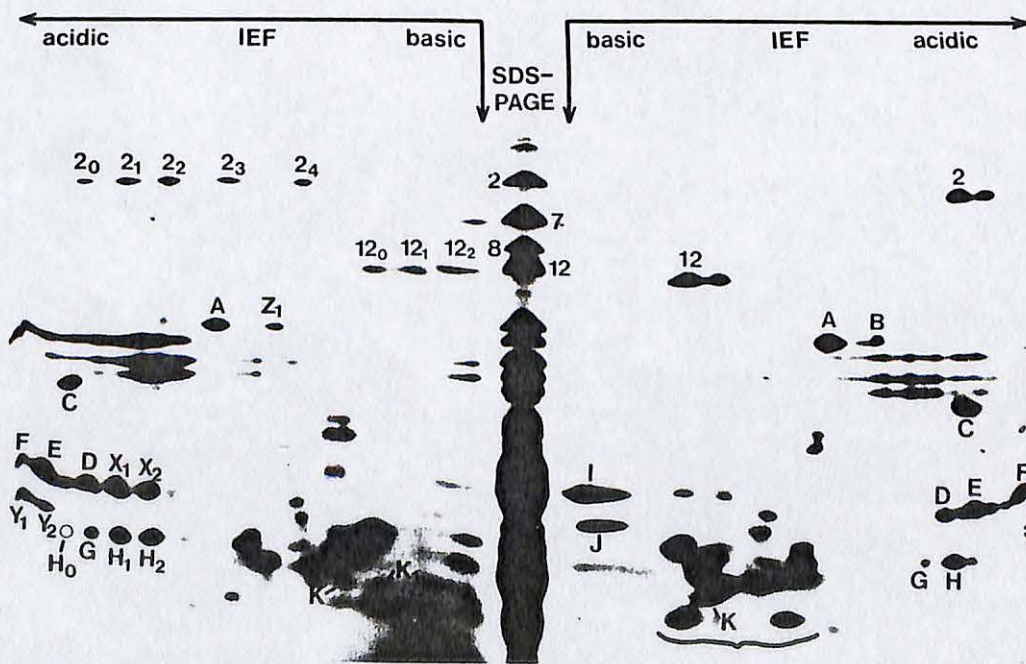


FIGURE 25



HALF-CYSTEINE CONTENT OF GLUTENIN SUBUNITS

Payne et al., 1985

Détermination des résidus cystéines chez *Triticum aestivum* L.

FIGURE 26

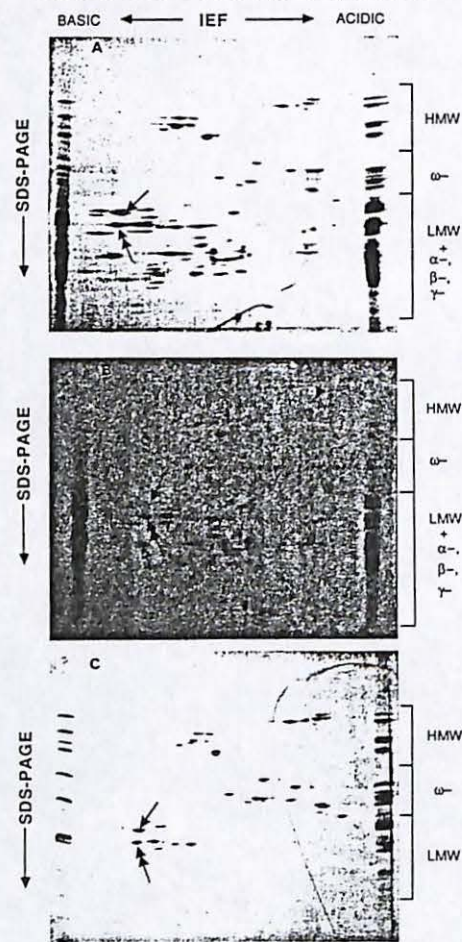
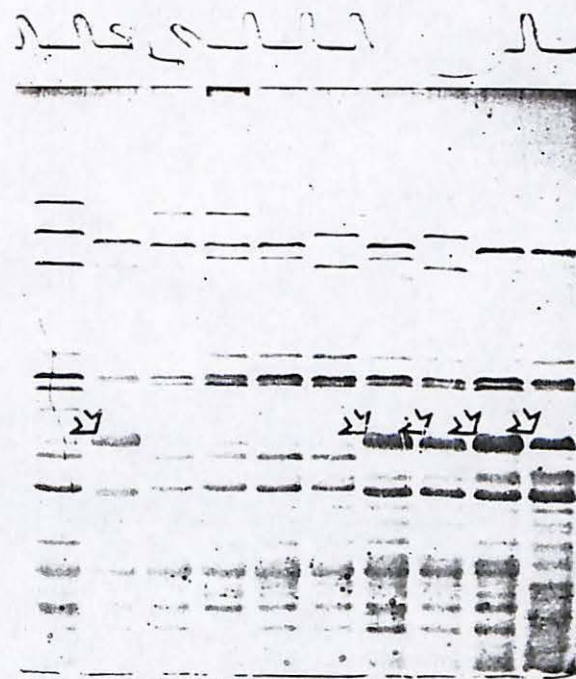


FIG. 1. (A) Two-dimensional electrophoretic separation of a mixture (approximately 50:50) of proteins from the wheat cultivars 'Anza' and 'Yecora Rojo'. The first dimension is IEF and the second, SDS-PAGE. The approximate regions corresponding to the various types of storage proteins (HMW-glutenin subunits,  $\omega$ -gliadins, LMW-glutenin subunits,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -gliadins) are shown. These regions correspond approximately to the following MW ranges: HMW-glutenin subunits, 80 000-110 000;  $\omega$ -gliadins, 55 000-75 000; LMW-glutenin subunits +  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -gliadins, 30 000-55 000. Reference one-dimensional SDS-PAGE patterns of total proteins from the two cultivars studied were included on the gels; 'Anza' on the left and 'Yecora Rojo' on the right. (B) Proteins from gel equivalent to that shown in Fig. 1A electroblotted to a polyvinylidene difluoride membrane and stained with amido black. (C) Polyacrylamide gel after electroblotting of proteins to membrane of Fig. 1B, stained with Coomassie Brilliant Blue R250.

FIGURE 27



LMW subunits of glutenin  
Triticum durum Desf.

FIGURE 28

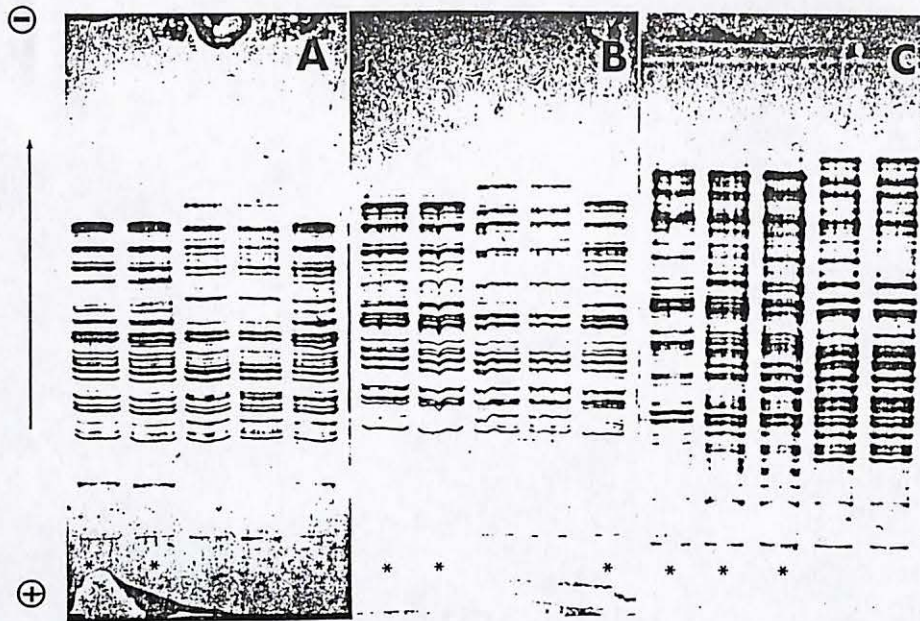


FIGURE 29

Figure 3: Effect of various DTE concentrations on band resolution of wheat storage proteins extracted by a water/acetonitrile/mercapto-ethanol (40/50/10) solvent from five durum genotypes. Dried gels were rehydrated with 8 M urea, 2.4 % carrier ampholytes (pH 4-9) and: A) 5 mM DTE, B) 50 mM DTE, C) 100 mM DTE. Labelled (\*) patterns correspond to 'Y-45' wheat genotypes.

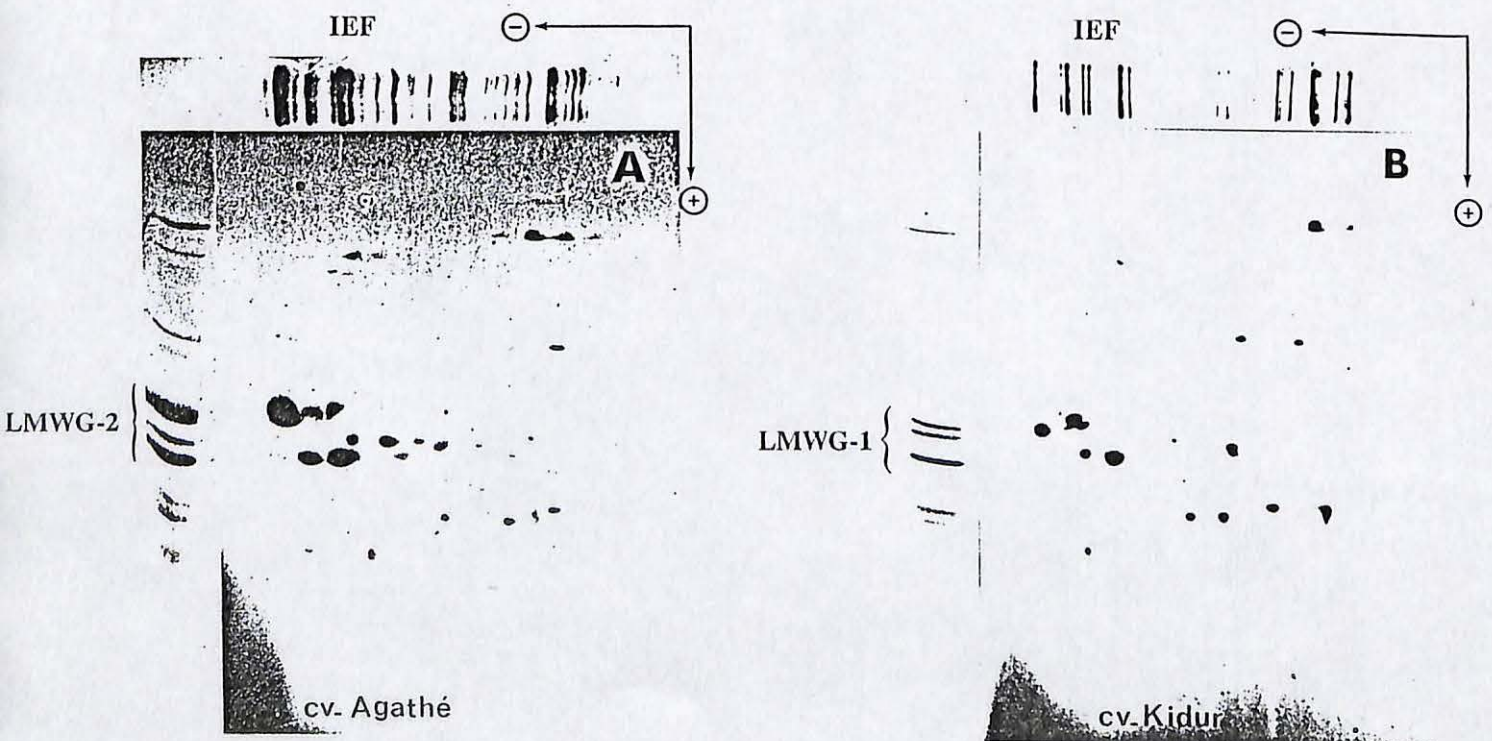


Figure 5: Characterization of LMWG subunits from two-dimensional (IEF x SDS-PAGE) electrophoretic patterns of wheat storage proteins sequentially extracted by a water/acetonitrile/mercapto-ethanol (40/50/10) solvent (after removal of from water-soluble fractions): A) cv. 'Agathe' (LMWG-2 allelic type) and B) cv. 'Kidur' (LMWG-1 allelic type).

FIGURE 30

## CONCLUSIONS

- OUTIL DE TRES HAUTE RESOLUTION : le seul à permettre la résolution de plusieurs centaines de produits d'expression des gènes
- SENSIBILITE : permet l'analyse du phénotype d'un individu (graine), sans détruire la capacité de celle-ci à germer ---> études génétiques
- REMARQUABLE FLEXIBILITE : le choix du procédé est dicté par le problème étudié ; pas de recommandation générale
- La SPECIFICITE DES PROTEINES DE RESERVE peut faciliter les études bidimensionnelles : quantités élevées, faible nombre de polypeptides majeurs, graines faciles à manipuler et à conserver
- Mais impose CERTAINES CONTRAINTES car : faible solubilité, faible charge électrique, hydrophobicité, tendance à l'agrégation ---> adaptation des techniques, particulièrement dans le cas des protéines basiques

|| FIGURE 31

- L'électrophorèse bidimensionnelle a été très développée pour de NOMBREUSES ETUDES DES PROTEINES DE RESERVE DES GRAINES et commence à contribuer à l'AMELIORATION de ces dernières
  - . Etudes fines de la composition polypeptidique
  - . Etudes génétiques (phylogénie, localisation chromosomique)
  - . Etudes physiologiques
  - . Etudes structurales (homologies structurales, purification en vue d'un microséquençage)
  - . Applications : identification variétale, sélection, identification de gènes d'intérêt agronomique

### PERSPECTIVES : Exploitation des techniques d'ANALYSE D'IMAGE

- expression des protéines au cours du développement de la plante et dans ses différents organes ou tissus ---> contribution au contrôle de l'expression des gènes
- Identification et quantification précises de protéines spécifiques de la qualité d'utilisation du grain

|| FIGURE 32.