

Jean-François Morot-Gaudry, éd.

assimilation de l'azote chez les plantes

aspects physiologique,
biochimique et moléculaire

MIEUX COMPRENDRE

 **INRA**
EDITIONS

18

Synthèse protéique dans les grains et les graines

F.Bénétrix et J.-C. Autran

Les grains et les graines sont des organes de propagation et de dispersion mais représentent également les principaux tissus végétaux récoltés et consommés par l'homme. La teneur en protéines des grains et des graines varie de 10 % (chez les céréales) à 40 % (chez certaines plantes légumineuses ou oléagineuses), ce qui constitue, en termes de quantités synthétisées et de contribution à l'alimentation humaine et animale (200 millions de tonnes par an, pour les seules protéines de céréales), une source majeure de protéines et un enjeu économique considérable (Shewry *et al.*, 1995).

Chez les Angiospermes, la fécondation est double et a lieu dans le sac embryonnaire au sein de l'ovule. L'un des noyaux mâles fusionne avec le noyau principal femelle, cette fusion donnant naissance à un embryon diploïde. L'autre noyau mâle fusionne avec les deux noyaux polaires pour former un noyau triploïde. Ce noyau triploïde est à l'origine de l'albumen, tissu propre aux monocotylédones (notamment aux céréales), qui représente le principal tissu nourricier du grain, et dans lequel sont stockées les réserves. Chez les graines de dicotylédones (notamment les légumineuses), ce sont les cotylédons qui représentent la principale source de réserves. Les réserves des grains et des graines, qui sont principalement constituées d'amidon, de protéines et de lipides, sont destinées à l'alimentation de la plantule au début de la germination.

Biosynthèse des protéines

Alimentation de la graine en azote

Relations photosynthèse-protéosynthèse

Pour que la graine puisse constituer ses réserves (polysaccharides, protéines, lipides), il lui est nécessaire d'avoir à sa disposition tous les éléments de base (carbone, azote) lui permettant de les synthétiser. La nutrition des graines est assurée par la sève élaborée en provenance des feuilles. Ainsi, l'azote est apporté par les acides aminés provenant de la photosynthèse et qui sont entraînés par flux de masse

dans les vaisseaux du phloème de la feuille vers l'embryon et les cotylédons. Les principaux acides aminés transportés sont la glutamine, l'asparagine, la sérine, l'alanine, le glutamate et l'aspartate (Moutot *et al.*, 1986), avec des particularités pour certaines espèces (ex. homosérine du pois) (Rochat et Boutin 1991). Les formes d'acides aminés transportés varient également en fonction des conditions agroclimatiques (nutrition azotée, température...) et de l'origine de l'azote (fixation symbiotique ou assimilation du nitrate) pour les légumineuses.

Mécanismes de transfert

Les mécanismes de transfert des assimilats de la plante-mère à la graine reposent sur la force d'appel des graines en développement, qui constituent alors les principaux puits de la plante. Le transport des assimilats est ainsi fortement dépendant du chargement du phloème dans les feuilles et du déchargement dans les graines. Les assimilats empruntent une voie symplastique du phloème aux tissus maternels, avant d'être libérés dans les cellules de l'embryon et de l'albumen *via* l'apoplaste (milieu extracellulaire). Si le passage des acides aminés dans l'apoplaste se fait par simple diffusion (existence d'un gradient de concentration entre la sève et l'apoplaste), le déchargement à partir des tubes criblés du phloème pourrait faire quant à lui intervenir un cotransport actif acide aminé-proton.

Transformation métabolique des assimilats azotés dans les tissus maternels

Après le déchargement du phloème, les acides aminés subissent des modifications biochimiques avant d'être assemblés sous la forme de protéines de réserve de la graine. Par exemple, grâce à des mécanismes d'interconversion des métabolites primaires, le grain de maïs est capable de synthétiser tous les acides aminés nécessaires à la formation de ses protéines à partir de seulement quelques acides aminés importés du phloème (Pernollet *et al.*, 1986). Par contre, chez le blé, la composition en acides aminés dans le phloème est proche de celle du grain mature, même si certaines modifications se produisent au cours du transfert dans le grain (Fisher et Macnicol, 1986), bien que la présence de cystéine dans l'albumen et son absence dans la sève du phloème laisse supposer que cet acide aminé soit transporté sous une autre forme. Chez le pois, la dégradation enzymatique de l'asparagine dans le tégument libère de l'azote qui est vraisemblablement réutilisé pour la synthèse d'alanine (Rochat et Boutin, 1991).

Les protéines de réserve

Les protéines des grains peuvent être classées en trois groupes selon leur fonction : protéines de réserve, protéines métaboliques et protéines structurales. Le système de classification des protéines de céréales repose toujours en grande partie sur les travaux historiques d'Osborne (1907), qui avait su exploiter les différences de solubilité des protéines dans une séquence de solvants. Quatre fractions avaient ainsi été définies : les albumines (solubles dans l'eau), les globulines (solubles dans les solutions salines

diluées), les prolamines (solubles dans les alcools dilués) et les glutélines (solubles dans les acides ou les bases diluées, dans les solutions d'urée ou de détergents).

Les albumines et les globulines rassemblent de nombreuses protéines possédant une fonction biologique. C'est notamment le cas des enzymes du grain. Au contraire, les prolamines représentent les principales protéines de réserve chez les céréales comme le blé (gliadines), l'orge (hordéines), le seigle (sécalines), ou le maïs (zéines), bien que d'autres céréales (avoine, riz) accumulent préférentiellement des globulines et des glutélines, respectivement (Tab. 18.1).

Tableau 18.1 – Composition protéique des grains de quelques céréales¹ et légumineuses²

| | Protéines (% m.s.) | Albumines* | Globulines* | Prolamines* | Glutélines* |
|---------------------|-----------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Céréales</i> | | | | | |
| Blé tendre | 10-15 | 5-10 | 5-10 | 40-50 | 30-40 |
| Orge | 10-16 | 3-4 | 10-20 | 35-45 | 35-45 |
| Avoine | 8-20 | 5-10 | 50-60 | 10-15 | 5-10 |
| Maïs | 7-13 | 2-10 | 10-20 | 50-55 | 30-45 |
| Sorgho | 9-13 | tr. | tr. | 60-70 | 30-40 |
| Riz | 8-10 | 2-5 | 2-8 | 1-5 | 85-90 |
| <i>Légumineuses</i> | | | | | |
| Soja | 38-40 | 10 | 90 | - | - |
| Pois | 23-27 | 15 | 70 | - | 15 |
| Haricot | 22-35 | 4 | 67 | - | 29 |

* en % des protéines totales ; 1 d'après Pomeranz (1987) ; 2 d'après Mossé et Baudet (1983)

Chez les légumineuses, on ne trouve pas de prolamines et les protéines de réserve majeures sont des globulines (Tab. 18.1). Celles-ci ont été classées en deux groupes d'après leur coefficient de sédimentation : les globulines 7S (ou vicilines) et les globulines 11S (ou légumines), dont l'étude a été particulièrement détaillée chez le pois, le soja, la fève et le haricot. Ces deux groupes présentent d'importantes variations de structure selon l'espèce, mais ils sont toujours (plus particulièrement les 7S) déficients en cystéine et méthionine.

Les grains et les graines peuvent renfermer d'autres catégories de protéines échappant à la classification traditionnelle d'Osborne, qui s'accumulent selon la même cinétique que les protéines de réserve, mais qui possèdent une fonction biologique. C'est le cas de la β -amylase, des thionines (purothionine du blé, hordéothionine de l'orge), qui sont des protéines très riches en soufre et en acides aminés basiques et possédant des activités antifongiques ou antibactériennes, des protéines de transfert des lipides, des inhibiteurs d' α -amylases et de protéases, ainsi que des lectines (Shewry et Mifflin, 1985).

Biosynthèse et accumulation des protéines de réserve dans les grains

Localisation de la biosynthèse

Les protéines de réserve sont synthétisées au niveau de ribosomes localisés au contact de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Le passage dans la lumière du RER se fait en même temps que l'élongation du polypeptide selon un mécanisme cotraductionnel. Les protéines de réserve, comme les protéines sécrétoires animales, sont synthétisées sous forme de préprotéines (précurseurs directs de la protéine) qui diffèrent du produit définitif par une séquence additionnelle d'une vingtaine d'acides aminés (dite séquence signal), du côté N-terminal, et de nature très hydrophobe (Fig. 18.1). Cette séquence s'associe à des protéines intégrées à la membrane du réticulum pour former un tunnel traversant la bicouche lipidique de la membrane. Après son passage dans la lumière du réticulum, la séquence signal est excisée pendant que pénètre la séquence protéique en cours d'élongation. Le tunnel est stabilisé par la grosse sous-unité ribosomale qui demeure fixée aux protéines de la membrane pendant la durée de pénétration de la chaîne.

La lumière du réticulum endoplasmique est également considérée comme le site du repliement des chaînes des protéines de réserve et de la formation des liaisons disulfures qui stabilisent leur structure tertiaire, mécanismes auxquels contribuent des protéines spécifiques résidentes de la lumière du RER : chaperonines, cyclophilines et PDI (Protein Disulfide Isomerase) (Shewry, 1995).

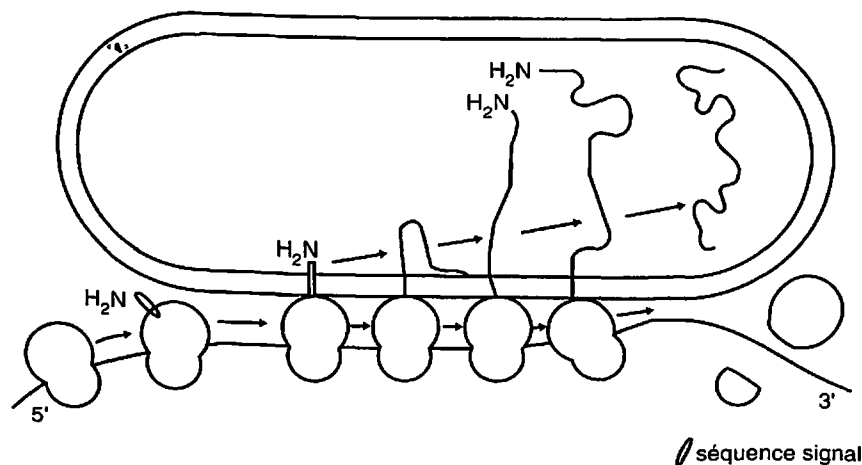


Figure 18.1 – Schéma de la biosynthèse des protéines de réserve au niveau de ribosomes localisés au contact de la membrane du réticulum endoplasmique : passage dans la lumière, élongation du polypeptide, clivage de la séquence signal.

Modifications co et post-traductionnelles

Chez les céréales, les protéines de réserve sont pratiquement synthétisées sous leur forme définitive, du moins en ce qui concerne leur structure primaire. Leurs gènes ne contiennent généralement pas d'introns et seule une modification cotraductionnelle intervient pour éliminer la région N-terminale de la molécule. À l'exception de la formation de liaisons disulfures, ces protéines ne subissent pas de modifications post-traductionnelles au cours de leur transport et de leur stockage dans le grain.

Si les protéines de réserve des légumineuses subissent également la perte de leur peptide signal, elles se caractérisent en outre par l'existence de plusieurs modifications biochimiques. Ainsi, les globulines de type viciline (7S), qui sont des glycoprotéines, subissent une glycosylation qui a lieu de manière co- et post-traductionnelle ; les légumineines 11S se caractérisent par la formation d'un pont disulfure entre les deux sous-unités acide et basique (Christpeels, 1984) ; les polypeptides 7S et 11S s'assemblent, peu après leur synthèse, pour former des trimères à l'intérieur du RER ; les polypeptides 11S subissent une protéolyse permettant le clivage de la chaîne polypeptidique initiale en ses deux sous-unités qui restent reliées par un pont disulfure, protéolyse qui est suivie de l'assemblage des trimères en hexamères (Shotwell et Larkins, 1989).

Lieu d'accumulation des protéines de réserve

Les polypeptides nouvellement synthétisés sont ensuite transportés dans les « corps protéiques » qui sont des sites intracellulaires d'accumulation temporaire des protéines de réserve du grain. Ces corps protéiques sont des organites sphériques entourés d'une membrane, dont le diamètre varie de 0,2 à 20 μm , et qui sont localisés dans les cellules du parenchyme des cotylédons des légumineuses, ou de l'albumen des céréales. Chez les légumineuses et les céréales (hors triticeées), les corps protéiques sont encore visibles dans l'albumen mature. Par contre, chez le blé, l'orge et le seigle, les corps protéiques disparaissent à partir de la phase de dessiccation du grain, laissant place à une matrice protéique localisée entre les grains d'amidon (Pernollet, 1985).

Selon l'espèce botanique ou le tissu considéré, il existe deux voies possibles d'accumulation des protéines de réserve : la voie réticulaire (RER) et la voie vacuolaire (Fig. 18.2). Les globulines des légumineuses sont ainsi accumulées, *via* l'appareil de Golgi, dans la vacuole centrale de la cellule. C'est cette vacuole qui se fragmente ensuite pour donner naissance aux corps protéiques (Spencer, 1984). Les glutélines du riz s'accumulent selon un schéma similaire. Chez le maïs et le sorgho, la formation des corps protéiques résulte de l'accumulation directe des protéines dans la lumière du réticulum. Chez les triticeées, la situation est plus complexe car les deux voies d'accumulation sont probablement utilisées pour des protéines différentes au sein du même tissu, et peut-être pour la même protéine à des stades de maturation différents. Par exemple, chez l'orge, l'origine vacuolaire a été largement soutenue par l'équipe de Carlsberg, Cameron-Mills et von Wettstein (1980) ayant observé des protéines passant sous forme de vésicules de la lumière du réticulum endoplasmique vers des expansions vésiculaires des dictyosomes de l'appareil de Golgi, puis dans des vacuoles, où elles sont finalement agrégées et accumulées. Chez le blé, le réticulum endoplasmique et les vésicules

de l'appareil de Golgi semblent simultanément impliqués dans la formation des corps protéiques. Dès 1989, Kreis et Shewry avaient émis l'hypothèse d'un transport des protéines *via* le RER et les dictyosomes vers des corps protéiques d'origine vasculaire aux premiers stades du développement du grain, les corps protéiques ne se formant directement dans la lumière du RER qu'aux stades ultérieurs. Plus récemment, Galili *et al.* (1994) ont montré que la synthèse des gliadines pouvait se faire par l'une ou l'autre voie alors que celle des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (HMW) empruntait spécifiquement la voie réticulaire.

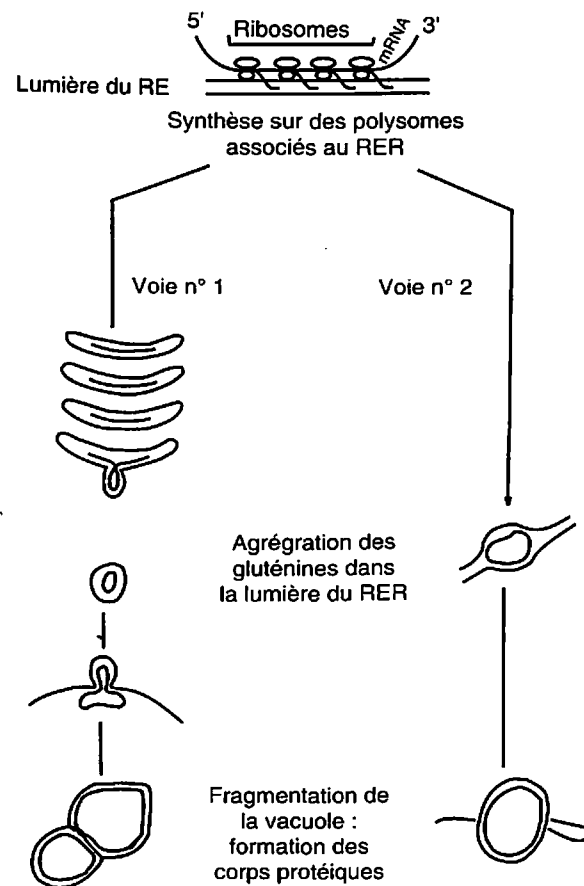


Figure 18.2 – Schéma des deux voies d'accumulation des protéines de réserve chez les grains de céréales. La voie n° 1 pourrait concerner les globulines de réserve et certaines prolamines de l'orge et du blé. La voie n° 2 pourrait concerner les prolamines du maïs et du riz et certaines prolamines de l'orge et du blé (d'après Shewry, 1995).

Caractéristiques biochimiques et physiologiques des protéines de réserve

La seule fonction biologique connue des protéines de réserve est de fournir des acides aminés à la jeune plantule lors de la germination. D'où leur synthèse et leur accumulation en quantités très élevées au cours de la maturation (elles représentent à maturité jusqu'à 80 % de l'ensemble des protéines du grain) et leur dégradation sélective aux premiers stades de la germination.

Les caractéristiques générales de ces protéines sont naturellement en rapport avec la fonction de réserve. Elles doivent permettre de constituer une réserve maximale d'azote (d'où la prédominance des résidus Gln et Pro) sous un faible volume dans les corps protéiques (d'où leur faible teneur en acides aminés chargés - limitant ainsi les forces de répulsion - et leur tendance à la formation d'agrégats). La dessiccation progressive du grain les amène au contact d'environnements de moins en moins aqueux (d'où leur faible solubilité dans l'eau et leur relative hydrophobicité : solubilité dans les alcools).

Par ailleurs, toutes les familles de protéines de réserve présentent une variation génotypique considérable au niveau du nombre, des proportions et des propriétés de leurs constituants polypeptidiques. Un tel niveau de polymorphisme, particulièrement bien décrit chez le blé, l'orge, le maïs, le pois et le tournesol, indique que les contraintes rencontrées au cours de l'évolution des protéines de réserve ont dû être relativement faibles, autorisant un grand nombre de mutations non létales. Ainsi, le maintien de structures rigoureusement déterminées pour remplir la fonction biologique de protéine de réserve n'est probablement pas essentiel, à la différence d'autres protéines (par exemple, les enzymes) dont la fonction est étroitement liée à des motifs structuraux extrêmement précis. Dans le cas des prolamines de céréales, le polymorphisme de composition semble avoir pour seule origine la présence de familles multigéniques, bien que le nombre exact de copies de gènes soit difficile à déterminer du fait que certaines séquences génomiques correspondent à des pseudogènes non exprimés (Shewry, 1995). Les globulines de légumineuses sont également codées par des familles multigéniques. Casey *et al.* (1993) ont ainsi identifié chez le pois 10 gènes de légumine et au minimum 24 gènes de viciline. En outre, la protéolyse post-traductionnelle et la glycosylation (cas de la famille 7S) contribuent au polymorphisme de ces globulines de légumineuses.

Composition en acides aminés

La composition en acides aminés des protéines de réserve peut différer considérablement entre les diverses céréales et légumineuses (Tab. 18.2). Il ne semble pas qu'il y ait à cela d'explication fonctionnelle, cela pouvant simplement résulter d'une évolution à partir de protéines ancestrales différentes et de mécanismes d'évolution différents.

Tableau 18.2 – Composition en acides aminés de quelques familles de protéines de réserve des céréales et des légumineuses.

| Acide aminé | Blé ¹ | | Orge ¹ | Maïs ¹ | Pois ² | |
|-------------|---------------------|----------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| | γ 2-gliadine | HMW-1Dx2 | C-hordéine | Zéine | Légumine | Viciline |
| Asp | 1,8 | 0,6 | 1,0 | 3,9 | 11,7 | 13,4 |
| Thr | 2,0 | 2,9 | 0,9 | 3,2 | 3,7 | 3,0 |
| Ser | 4,9 | 5,7 | 3,0 | 5,9 | 6,3 | 7,8 |
| Glu | 39,1 | 36,3 | 38,9 | 20,7 | 17,6 | 18,2 |
| Pro | 18,7 | 15,8 | 32,5 | 13,0 | 5,1 | 4,4 |
| Gly | 2,7 | 20,0 | 0,7 | 3,8 | 7,8 | 5,2 |
| Ala | 3,0 | 2,9 | 0,7 | 11,3 | 5,9 | 4,5 |
| Cys | 1,9 | 0,6 | 0,0 | 1,9 | 0,7 | 0,05 |
| Val | 3,4 | 0,6 | 1,3 | 4,5 | 5,8 | 5,7 |
| Met | 1,7 | 0,0 | 0,2 | 1,9 | 0,8 | 0,13 |
| Ile | 3,7 | 0,6 | 3,2 | 2,9 | 4,5 | 5,5 |
| Leu | 7,2 | 4,5 | 4,0 | 15,3 | 8,3 | 11,3 |
| Tyr | 0,5 | 5,7 | 2,0 | 3,9 | 2,2 | 2,3 |
| Phe | 5,2 | 0,5 | 8,6 | 3,8 | 3,8 | 5,0 |
| His | 1,4 | 0,5 | 0,8 | 2,1 | 2,1 | 1,6 |
| Lys | 0,7 | 0,9 | 0,1 | 0,2 | 5,5 | 7,2 |
| Arg | 1,5 | 1,0 | 0,8 | 1,7 | 7,7 | 5,7 |
| Trp | 0,6 | 0,6 | 1,3 | 0,0 | 0,7 | 0,05 |

¹ d'après Shewry et Milfin, 1985 ; ² d'après Pernollet et Mossé, 1983

Les principales familles de protéines de réserve des céréales sont toutefois caractérisées par la prédominance, dans leur chaîne polypeptidique, de domaines consistant en des motifs répétés et hautement conservés de résidus Pro et Gln, conférant à ces protéines une exceptionnelle richesse en proline et glutamine (d'où le nom de prolamine), avec une faible proportion d'acides aminés basiques et une nette déficience en lysine.

Depuis un^e dizaine d'années, il est également devenu fréquent de classer les protéines de réserve des triticiées en trois groupes en faisant appel à la richesse relative en soufre : les prolamines pauvres en soufre (représentées chez le blé par les ω -gliadines et chez l'orge par les C-hordéines), les prolamines riches en soufre (gliadines et LMW-gluténines chez le blé, B-hordéines chez l'orge), et les prolamines de haut poids moléculaire (HMW-gluténines du blé et D-hordéine de l'orge) (Shewry *et al.*, 1984).

Plus généralement, la présence quasi systématique chez les différentes espèces de céréales et de légumineuses de deux types de protéines de réserve présentant des niveaux très différents d'acides aminés sulfurés (méthionine et cystéine) est d'ailleurs le seul trait de la composition en acides aminés qui pourrait avoir une signification biologique. De même que des prolamines riches en soufre (γ -gliadines, B-hordéines) et pauvres en soufre (ω -gliadines, C-hordéines) existent chez les différentes céréales, on trouve, chez les légumineuses, des globulines 11S, relativement riches en soufre, et des globulines 7S, très pauvres en soufre. Ce type de composition pourrait avoir une importance biologique en permettant à la plante de maintenir un niveau élevé de synthèse en protéines de réserve face à de grandes variations de la disponibilité en soufre dans l'environnement.

Homologies de structure

En dépit du polymorphisme important des protéines de réserve signalé ci-dessus, il existe de nombreuses homologies de structure entre prolamines d'une même espèce et entre prolamines d'espèces différentes, avec conservation de certains motifs de la séquence des acides aminés. Ainsi, les comparaisons de séquences ont permis de démontrer l'homologie entre les prolamines riches en soufre du blé, du seigle et de l'orge, qui sont toutes caractérisées par des domaines N-terminaux constitués de motifs répétés (Fig. 18.3). Dans le type γ , on observe une répétition de la séquence Pro.Gln.Gln.Pro.Phe.Pro.Gln et, dans le type α , une répétition de la séquence Pro.Gln.Gln.Pro.Tyr, séquences théoriquement capables de constituer des structures tridimensionnelles en coudes β . Au contraire, la région C-terminale montre une conservation des résidus cystéines (8 par molécule) qui sont supposés former des liaisons disulfures intramoléculaires chez les α et les γ -gliadines, ou intermoléculaires chez les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire (LMW-gluténines).

Dans le cas des prolamines pauvres en soufre, la molécule est essentiellement constituée d'octopeptides répétés (Pro.Gln.Gln.Pro.Phe.Pro.Gln.Gln) qui se retrouvent à la fois chez les ω -gliadines, les ω sécalines et les C-hordéines. Quant aux prolamines de haut poids moléculaire, elles montrent (notamment grâce à la possibilité de réaliser des hybridations croisées entre ADNc de différentes espèces) de fortes homologies de séquence entre le blé (HMW-gluténines), le seigle (HMW-sécalines) et l'orge (D-hordéine) avec présence d'hexapeptides répétés Pro.Gly.Gln.Gly.Gln.Gln supposés constituer des superstructures en β -spirales, analogues à celles de l'élastine (Kasarda *et al.*, 1994).

Chez les légumineuses, les structures moléculaires des globulines 11S et 7S subissent peu de variations parmi les différentes espèces. Leurs gènes sont généralement constitués de régions codantes (exons) et de régions non-codantes (introns) (Fig. 18.4). Il est intéressant de noter que les positions des introns au niveau des gènes de la légumine 11S

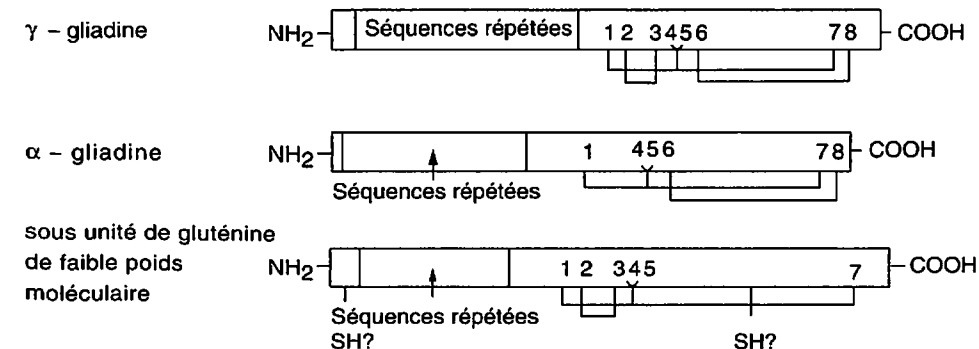


Figure 18.3 – Schéma des différents domaines de la structure des prolamines riches en soufre du blé, indiquant la distribution des résidus cystéines et la position supposée des liaisons disulfures (d'après Shewry *et al.*, 1994).

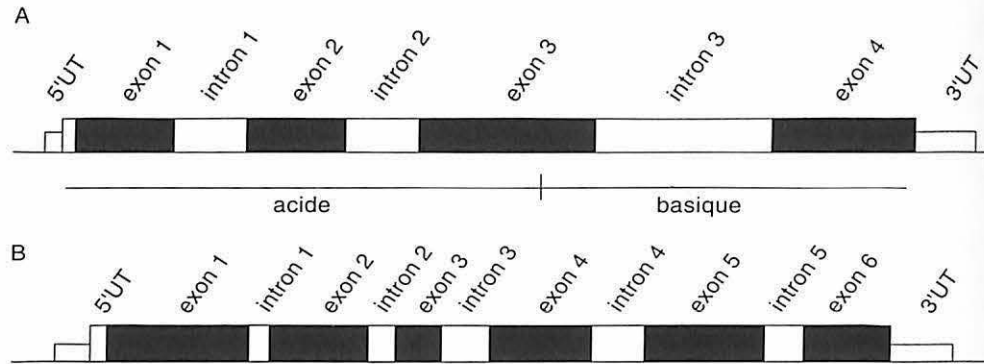


Figure 18.4 – Schéma des gènes codant pour les globulines de réserve du haricot : (A) fraction 11S, (B) fraction 7S. Les régions correspondant aux polypeptides acides et basiques des fractions 11S sont indiquées (A) (d'après Shotwell et Larkins, 1989).

du pois sont identiques à celles observées chez les glutélines du riz, ces gènes dérivant probablement de segments d'ADN ancestraux (Okita *et al.*, 1989)

Cinétique d'accumulation des protéines

Les premiers travaux ont concerné l'orge et ont montré que les protéines salino-solubles, présentes dès les tous premiers jours après anthèse (j.a.a.), sont majoritaires dans le grain jeune mais cessent de s'accumuler quand l'albumen a atteint la moitié de son poids final pour former seulement 15 % de l'azote total à maturité. La fraction glutéline est également synthétisée très tôt, mais continue à s'accumuler tout au long du

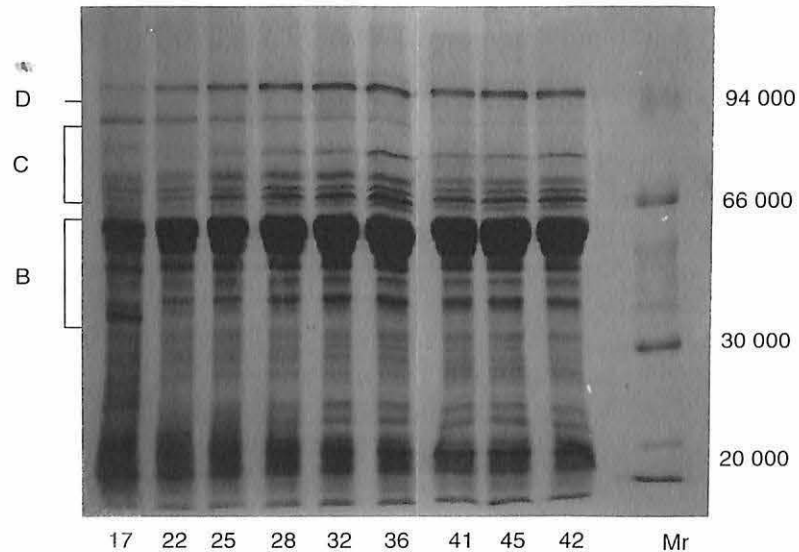


Figure 18.5 – Électrophorégramme (SDS-PAGE) des protéines totales réduites du grain d'orge (variété Traill) en cours de maturation. j.a.a. : jours après anthèse ; Mr : marqueurs de poids moléculaire (d'après Bénétrix, 1993)

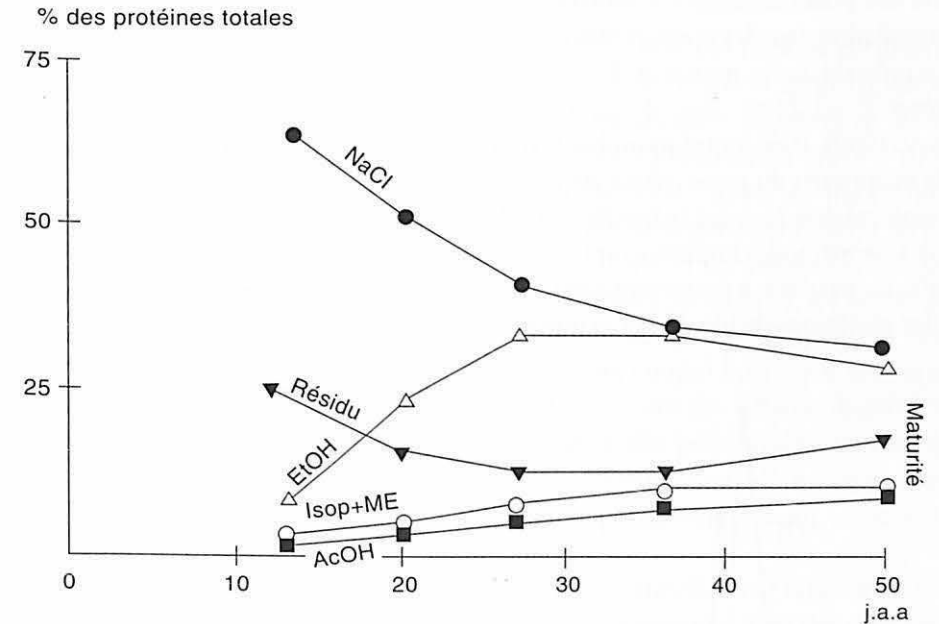


Figure 18.6 – Évolution des différentes fractions protéiques du grain de blé dur au cours de la maturation. j.a.a. : jours après anthèse ; NaCl : fraction soluble dans les solutions salines (albumines-globulines) ; EtOH : fraction soluble dans l'éthanol (principalement, gliadines) ; Ac-OH, Isop+ME et résidu : fractions gluténines (d'après Galterio *et al.*, 1987).

développement pour atteindre plus de 30 % de l'azote total. La fraction hordéine fait l'objet d'une synthèse très active entre 14 et 18 j.a.a. et s'accumule rapidement et de manière linéaire jusqu'à maturité pour former environ 40 % du total des protéines (Landry, 1979). L'électrophorèse montre toutefois que les différents types d'hordéines ne s'accumulent pas à la même vitesse au cours du développement et de la maturation du grain avec une proportion plus importante de C-hordéines aux stades précoces et une accumulation plus tardive de B-hordéines (Fig. 18.5).

Des phénomènes semblables ont été observés chez les légumineuses. Ainsi, chez le pois, les sous-unités de la viciline sont synthétisées plus rapidement que celles de la légumine, mais l'accumulation de ces dernières persiste plus longtemps : jusqu'à 14 et 20 j.a.a., respectivement, la maturité complète du grain se situant à 24 j.a.a. (Boulter, 1983).

Par contre, chez le blé, l'ensemble des gliadines apparaît de manière synchrone dès les stades les plus précoces. La teneur en gliadines croît ensuite très vite jusqu'au 35^e j.a.a., puis régresse, tandis que la teneur en gluténines suit une évolution inverse (Fig. 18.6)

Dans l'ensemble, ces cinétiques d'accumulation restent assez fortement dépendantes des conditions de culture et notamment de la fertilisation azotée.

Formation des agrégats

Chez le blé et chez l'orge, l'importance technologique des structures protéiques agrégées observée dans le grain mature a initié de nombreux travaux visant à étudier la formation

des agrégats au cours de la maturation des grains. Le repliement des prolamines et la formation des ponts disulfures semblent ainsi se produire dans la lumière du RER, avant l'accumulation dans les corps protéiques, ce qui va dans le sens d'une hypothèse d'agrégation précoce de ces protéines. Les motifs répétés de la structure primaire des protéines de réserve semblent être d'importants déterminants de ce repliement (Kreis et Shewry, 1989). Il est toutefois probable qu'un second niveau d'agrégation intervienne en fin de maturation du grain (phase de dessiccation) et mettant en jeu soit des liaisons SS intermoléculaires (cas des B-hordéines) soit des interactions hydrophobes (cas des gluténines). Une méthode chromatographique (SE-HPLC) qui permet de suivre les différences de taille moléculaire a été récemment utilisée pour relier l'évolution du niveau d'agrégation des gluténines du blé dur à l'expression de la qualité technologique (Fig. 18.7).

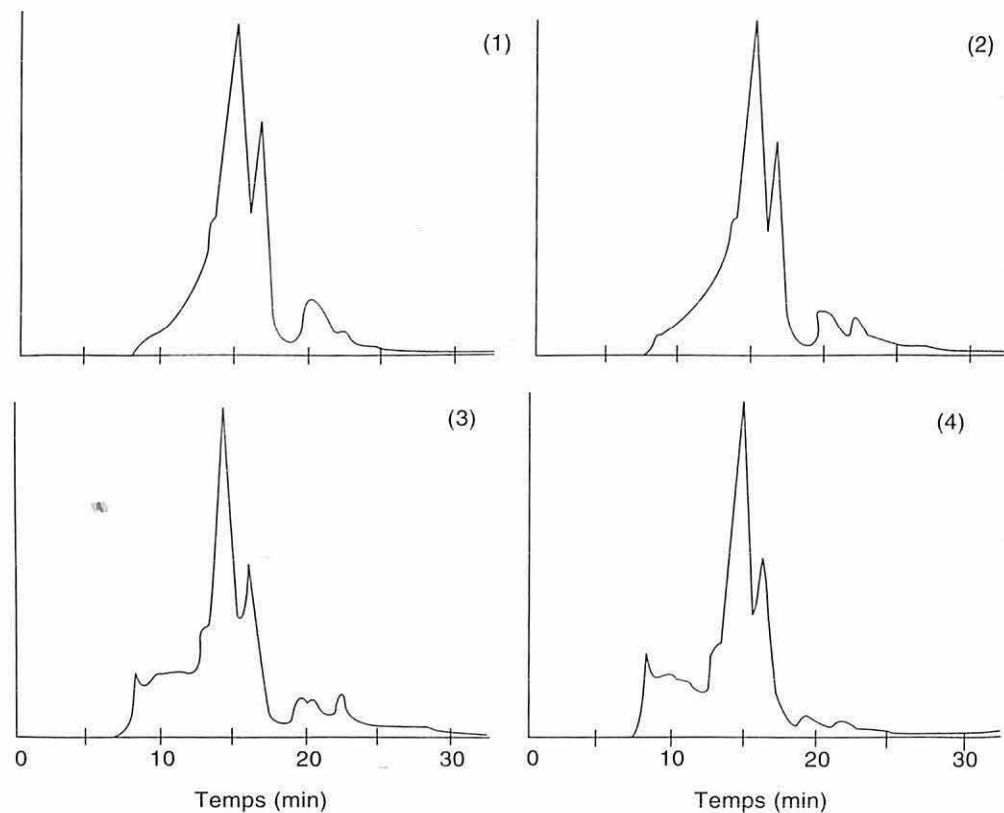


Figure 18.7 – Évolution du profil d'éluion en chromatographie d'exclusion-diffusion (SE-HPLC) des protéines du grain de blé dur (variété Capdur) au cours de la maturation, montrant la formation progressive d'agrégats de poids moléculaire élevé. (1) 200 degrés-jours (d.j.) ; (2) 400 d.j. ; (3) 610 d.j. ; (4) maturité (d'après Bénétrix *et al.*, 1994a).

Signalons enfin que les lectines de certaines espèces de légumineuses peuvent se trouver en proportion élevée dans le grain et sont souvent présentes dans les corps protéiques. Elles pourraient participer à l'incorporation des glycoprotéines dans les corps protéiques grâce à leur aptitude à former des liaisons avec les glycoprotéines des graines.

Localisation des protéines dans le grain : distribution différentielle et ultrastructure

Le rapport amidon/protéines augmente de façon importante des régions périphériques aux régions centrales du grain, soulignant l'existence d'un gradient de distribution des protéines au sein du grain (Gallant *et al.*, 1991). Par abrasion progressive du grain, Millet *et al.* (1991) ont ainsi mis en évidence une organisation du grain d'orge en multi-couches concentriques des protéines de réserve, avec un maximum de concentration dans la zone sous-aleuronique. Depuis la périphérie jusqu'au centre du grain, se succèdent, pour une variété donnée, les zones d'accumulation suivantes : les hordéines B, concentrées dans la couche sous-aleuronique externe, les hordéines C, dans la couche sous-aleuronique interne et l'hordéine D, dans l'albumen central. Baxter (1980) a utilisé la microscopie électronique sur coupes lavées par des séries de solvants, pour suggérer que les hordéines B impliquées dans des liaisons disulfures formeraient une matrice adhérente essentiellement autour des petits grains dans la région sous-aleuronique de l'albumen. Par contre, Martel (1988) considère que ce sont les C-hordéines, fortement hydrophobes, qui seraient préférentiellement associées aux grains d'amidon.

L'étude de l'ultrastructure des protéines *in situ* a été essentiellement réalisée au niveau des corps protéiques afin de comprendre les schémas d'accumulation des protéines du grain en cours de développement. Ainsi, l'examen en microscopie électronique à transmission des corps protéiques au cours de la maturation du grain d'orge a montré l'existence de dépôts homogènes intégrés dans une matrice fibrillaire ou granulaire et

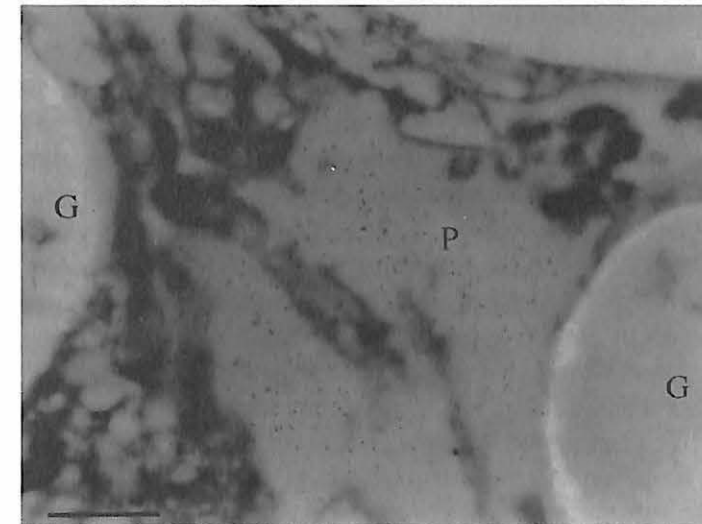


Figure 18.8 – Immunocytochimie de l'albumen d'orge avec observation en microscopie électronique à transmission (contraste acétate d'uranyle). Le marquage des protéines est localisé dans les zones lisses et faiblement contrastées (P) situées entre les grains d'amidon (G). L'échelle indiquée correspond à 1 μ m (d'après Bénétrix, 1993).

fréquemment associés à des entités sphériques denses aux électrons. Chez le mutant d'orge Risø 56, quasi-déficient en hordéines B, la proportion de matrice fibrillaire est considérablement accrue par rapport aux dépôts homogènes, indiquant que la morphologie ultrastructurale des corps protéiques apparaît comme une représentation de leur composition polypeptidique (Cameron-Mills et von Wettstein, 1980). En outre, un travail récent utilisant l'immunocytochimie (l'une des méthodes les plus puissantes que l'on possède actuellement dans le domaine de l'analyse ultrastructurale) a permis de préciser l'ultrastructure et la localisation des protéines de réserve de l'orge dans le grain mature (Fig. 18.8).

Régulation de l'expression des gènes de la biosynthèse des protéines

La proportion des polypeptides qui forment les protéines de réserve et la proportion de chaque classe de protéines sont génétiquement déterminées. Ces proportions peuvent toutefois subir des variations. Les variations de la composition des protéines de réserve peuvent provenir de modifications génétiques dues à une mutation, à une sélection naturelle ou induite, ou à une régulation au cours du développement.

Contrôle des mécanismes de biosynthèse

Bien que plusieurs systèmes de régulation existent pour déclencher et contrôler la synthèse des différentes protéines de réserve, la régulation de la protéosynthèse est essentiellement transcriptionnelle. L'albumen des grains de céréales est le seul et unique site de la synthèse et de l'accumulation des protéines de réserve, et les ARNm correspondant aux divers types de prolamines existent uniquement dans l'albumen, indiquant que les gènes des prolamines obéissent à un contrôle strict qui est à la fois spécifique du tissu et du stade de développement (Kreis *et al.*, 1987). La traduction est en principe uniquement contrôlée par la disponibilité des ribosomes, plus ou moins saturés par les ARNm. Dans le cas de l'orge, les deux principales sous-familles de gènes de B-hordéines (B1 et B3) sont présentes au même locus multigénique, mais elles sont exprimées différemment au cours du développement de l'albumen. La population d'ARNm des B1-hordéines s'accroît de 10-15 fois alors que ceux des B3- ainsi que ceux des C-hordéines ne s'accroît que d'un facteur 4 (Rahman *et al.*, 1984). D'une façon générale, les différences d'accumulation de différents groupes de protéines de réserve sont reliées à l'abondance des ARNm correspondants. Outre ce contrôle de type tout ou rien, l'expression des gènes est modulée par les facteurs d'environnement, notamment la nutrition azotée ou soufrée, et par des gènes à action « trans ». Ainsi, chez l'orge ou le blé, une carence en soufre se traduit par une faible accumulation des prolamines riches en soufre et une abondance d'ARNm correspondant aux prolamines pauvres en soufre (C-hordéines et ω -gliadines) (Shewry et Mifflin, 1985).

En vue d'une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires qui expliquent cette régulation, des séquences génomiques de prolamines ont été isolées et leur expression a été étudiée dans des systèmes homologues et hétérologues. L'attention s'est notamment portée sur le rôle de certaines régions 5' (situées à environ -300 pb du codon d'initiation ATG) qui sont apparues conservées entre les gènes de prolamines de blé, de maïs et d'orge (Kreis *et al.*, 1987).

Mutations

La valeur nutritionnelle relativement faible des céréales résulte principalement de la forte proportion de prolamines (exceptionnellement riches en glutamine et proline, mais très déficientes en lysine et tryptophane) dans leurs protéines de réserve.

Un criblage intensif de nombreuses ressources génétiques a permis de découvrir des mutants naturels dans lesquels l'expression des gènes des protéines de réserve est modifiée et qui présentent des teneurs deux à trois fois plus élevées en acides aminés indispensables. C'est le cas des mutants opaque-2 ou floury-2 du maïs, IS11758 du sorgho et Hiproly, Risø 56 ou Risø 1508 de l'orge. L'étude de ces mutants a permis de comprendre en partie certains mécanismes de régulation de la biosynthèse. En effet, ces différents mutants se caractérisent par une réduction de la synthèse des prolamines, contrebalancée par une quantité plus importante de protéines riches en lysine (globulines et glutélines). L'expression des B-hordéines est également affectée par le gène *lys 3a* à action « trans » du mutant Risø 1508.

Plantes transgéniques

L'une des percées de la recherche en biologie végétale ces dernières années a été la possibilité de transformer des végétaux d'intérêt économique par génie génétique dans le but de les rendre plus résistants aux parasites, de modifier la composition en acides aminés des grains pour améliorer la qualité nutritionnelle ou la valeur d'utilisation technologique, ou encore d'utiliser la capacité de synthèse des grains pour leur faire produire des protéines d'intérêt technologique ou pharmaceutique. La réalisation de telles plantes transgéniques s'est longtemps heurtée à des obstacles techniques (méthodologie de transformation, difficulté de régénérer des plantes à partir d'embryons ou de cals) et scientifiques (faible nombre de promoteurs spécifiques de la graine, difficulté de réaliser les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité biologique, méconnaissance des gènes réellement intéressants).

Toutefois, depuis environ trois ans, la transformation de plusieurs espèces de céréales est couramment réalisée dans plusieurs laboratoires par « bombardement » par des microparticules d'ADN de cultures de tissus dérivées de scutellum immature, avec pour objectif principal de modifier la composition protéique des grains (Lazzeri et Shewry, 1993 ; Shewry *et al.*, 1995). Le moyen le plus souvent retenu pour améliorer la qualité technologique des blés est ainsi d'augmenter le nombre de gènes de sous-unités HMW-gluténines exprimées, tout en conservant leurs promoteurs naturels. Ceci s'est

traduit par la production d'un pourcentage plus élevé de polymères gluténines de haut poids moléculaire (Anderson *et al.*, 1994).

Dans d'autres séries d'expériences, des gènes de HMW-gluténines subtilement modifiés au niveau du nombre et de la distribution des résidus cystéines ont été introduits, ce qui devrait permettre de contrôler la taille et le type de réticulation des polymères gluténines. De la même façon, en introduisant des gènes au sein desquels la longueur des domaines répétitifs a été augmentée ou diminuée, on devrait pouvoir évaluer le rôle exact des liaisons hydrogènes et améliorer la connaissance des mécanismes fondamentaux de l'élasticité des gluténines. Ces résultats préliminaires démontrent que la manipulation des propriétés fonctionnelles des protéines de réserve des céréales par génie génétique est désormais possible. Cette méthodologie permettra au cours de la prochaine décennie une meilleure compréhension des propriétés rhéologiques du gluten et de la pâte ; ce qui aura un impact considérable sur la maîtrise de la qualité technologique des céréales (Shewry *et al.*, 1995).

Influence des facteurs agroclimatiques sur la synthèse et l'accumulation des protéines

Les facteurs d'environnement, tout comme les facteurs génétiques décrits précédemment, peuvent affecter l'accumulation des protéines de réserve au cours de la maturation du grain.

Influence de l'alimentation minérale et hydrique de la plante

Chez les légumineuses, l'azote de la plante provient de l'azote atmosphérique fixé par les bactéries des nodosités (fixation symbiotique) et du nitrate du sol absorbé par les racines. Les conséquences particulières de l'absorption de nitrate en fin de cycle sur l'alimentation en azote des graines ont été soulignées chez le pois où 70 % de l'azote nitrique absorbé après floraison se trouvent concentrés dans les grains.

L'effet de la nutrition azotée sur l'accumulation des réserves protéiques des grains a également été largement étudié chez les céréales. A côté des variations quantitatives, on observe des variations relatives entre classes protéiques ; les principales caractéristiques envisagées étant principalement de type technologique, par exemple en vue de la malterie (Bénétrix *et al.*, 1994b).

Des teneurs plus élevées en azote du grain sont à la fois dues à une meilleure remobilisation de l'azote à partir des parties végétatives (acides aminés provenant de l'hydrolyse des protéines) et/ou à une meilleure assimilation directe de l'azote. Même à des stades tardifs, les mouvements d'azote des feuilles vers l'épi se poursuivent. Les

différences de teneurs protéiques du grain seraient à relier aux activités des enzymes impliquées dans la dégradation des protéines des tissus végétatifs.

Influence de la température au cours du remplissage des grains : protéines de choc thermique

Des conditions de température élevées au cours de la phase de remplissage du grain de Blé sont apparues exercer une influence sur la composition protéique et la qualité du grain. En champ comme en serre, des températures dépassant 35 °C peuvent ainsi stimuler la synthèse des gliadines aux dépens des polymères gluténines, affectant le rapport entre monomères et agrégats protéiques et se traduisant par une pâte boulangère davantage extensible et moins tenace. Cette réponse est apparue résulter de la présence d'éléments de choc thermique (peptides dont la synthèse est induite sous l'effet de la chaleur) dans les gènes de certaines gliadines, analogues aux protéines de choc thermique communes à de nombreux organismes (Blumenthal *et al.*, 1990).

Rôle et intérêt des protéines des grains

La semence est porteuse d'un complexe génétique et technologique. Ainsi, la germination est très largement conditionnée par tout ce qu'a pu subir le porte-graines et on parle de « mémoire » de la semence.

La teneur en protéines du grain a une influence significative sur la vitesse de germination et la vigueur des plantules, des teneurs élevées augmentant l'activité de la plantule. Toutefois, ce phénomène est surtout vrai si le milieu sur lequel se développe la plantule a reçu un faible apport azoté. En champ, et contrairement à certaines idées reçues, l'énergie germinative et la vigueur des plantules ne semblent pas affectées par la quantité protéique du grain puisque les différences peuvent être compensées par la disponibilité en azote du sol. D'autre part, au cours de la germination, les vitesses globales de dégradation des protéines de réserve sont différentes pour chacun des groupes (albumines, globulines, prolamines, glutélines) et la dégradation des protéines de réserve se déroule par étapes successives.

Le grain constitue une source de molécules pour l'alimentation et l'industrie et la quantité ou la composition des protéines du grain ont des effets importants sur la qualité nutritionnelle et technologique. Une connaissance plus approfondie de la biosynthèse, de l'accumulation et de la structure des protéines du grain permettra (outre une garantie de valeur germinative) de mieux maîtriser sa valeur d'utilisation industrielle (alimentaire ou non-alimentaire).

Bibliographie

- ANDERSON O.D., BLECHL A.E. et WEEKS J.T. 1994 - Biotechnological approaches to wheat protein improvement. in: *Proceedings of the International Meeting "Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects"*, September 28-30, Viterbo (Italy), pp. 101-108.
- BAXTER E.D., 1980 - Sulphur-containing hordeins and their importance in malting and brewing. *Brew. Dig.*, **55**, 45-47.
- BÉNÉTRIX F., 1993 - Étude biochimique, ultrastructurale et agronomique de la qualité de l'orge: rôle des hordéines. Thèse de Doctorat, École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 125p.
- BÉNÉTRIX F., KAAH F. et AUTRAN J.C., 1994 a. Changes in protein complexes of durum wheat in the developing seed. *Crop Science*, **34** (2), 462-468.
- BÉNÉTRIX F., SARRAFI A. and AUTRAN J.C., 1994 b - Effects of genotype and nitrogen nutrition on protein aggregates in barley. *Cereal Chem.*, **71** (1), 75-82.
- BLUMENTHAL C.S., BATEY I.L., WRIGLEY C.W. et BARLOW E.W.R. 1990 - Involvement of a novel peptide in the heat shock response of Australian wheats. *Aust. J. Plant Physiol.*, **17** (4), 441-449.
- BOULTER D., 1983 - Regulation of storage protein synthesis and deposition in developing legume seeds. In: *Seed Proteins, Phytochemical Society of Europe Symposia*, Series n° 20 (J. Daussant, J. Mossé and J. Vaughan, eds.), Acad. Press, 12, pp. 219-222.
- CAMERON-MILLS V. et VON WETTSTEIN D., 1980 - Protein body formation in the developing barley endosperm. *Carlsberg Res. Commun.*, **45**, 577-594.
- CASEY R., DOMONEY C. et SMITH A.M., 1993 - Biochemistry and molecular biology of seed products. In: *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology* (R. Casey and D.R. Davies, eds.), CAB International, Wallingford, pp. 121-164.
- CHRISTPEELS M.J., 1984 - Biosynthesis, processing and transport of storage proteins and lectins in cotyledons of developing legume seeds. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B 304**, 309-322.
- FISHER D.B. et MACNICOL P.K. 1986 - Amino acid composition along the transport pathway during grain filling in wheat. *Plant Physiol.*, **82**, 1019-1023.
- GALILI G., ALTSCHULER Y., LEVANOY H., GIORINI-SILFEN S., SHIMONI Y., SHANI N. et KARCHI H., 1994 - Synthesis, processing and targeting of wheat seed storage proteins. In: *Proceedings of the Symposium "Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects"*, September 28-30, Viterbo (Italy) pp.151-152.
- GALLANT D.J., de MONREDON F., BOUCHET B., TACON P. et DELORT-LAVAL J., 1991 - *Cytochemical study of intact and processed barley grain*. In: *New Trends in Barley Quality for Malting and Feeding*, Proceedings of the Barcelona Seminar (J.L. Molina-Cano and J. Brufau, eds.), CIHEAM, 15-16 November 1990, pp. 31-34.
- GALTERIO G., BIANCOLATTE E. et AUTRAN J.C., 1987 - Proteins deposition in developing durum wheat. Implications in technological quality. *Genet. Agr.*, **41**, 461-480.
- KASARDA D.D., KING G. et KUMOSINSKI T.F., 1994 - Comparison of spiral structures in wheat high molecular weight subunits and elastin by molecular modelling. In: *Computer Molecular Modelling (T.F. Kumosinski and M. Liebman, eds.)*, American Chem. Soc., Washington D.C., pp. 209-220.
- KREIS M. et SHEWRY P.R., 1989 - Unusual features of cereal seed protein structure and evolution. *BioEssays*, **10** (6), 201-207.
- KREIS M., WILLIAMSON M.S., FORDE J., CLARK J., BUXTON B., PYWELL J., MARRIS C., GALLOIS P. et SHEWRY P.R., 1987 - Structure and regulation of expression of seed protein genes in barley. *Plant Physiol. Biochem.*, **25** (3), 291-302.
- LANDRY J., 1979 - Extraction séquentielle des protéines du grain d'orge. *C. R. Acad. Sci.*, **288**, série III, 907-909.
- LAZZERI P.A. et SHEWRY P.R., 1993 - Biotechnology of cereals. *Biotechn. Gen. Engineering Revi.*, **11**, 79-146.
- MARTEL C., 1988 - Étude du caryopse de l'orge au cours du développement et du maltage. Evolution des amyloplastes et de l'amidon. Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, 239p.
- MILLET M.O., MONTEBAULT A. et AUTRAN J.C., 1991. Hordein composition differences in various anatomical regions of the kernel between two different barley types. *Sciences des Aliments*, **11** (1), 155-161.
- MOSSÉ J. et BAUDET J., 1983. Crude protein content and amino acid composition of seeds: variability and correlations. In: *Plant Proteins for Human Foods* (C.E. Bodwell and L. Petit, eds.), M. Nijhoff and W. Junk, The Hague, pp. 225-245.
- MOUTOT F., HUET J.C., MOROT-GAUDRY J.F. et PERNOLLET J.C., 1986. Relationship between photosynthesis and protein synthesis in Maize. I. Kinetics of translocation of the photoassimilated carbon from the ear leaf to the seed. *Plant Physiol.*, **80**, 211-215.
- OKITA T.W., HWANG Y.S., HNILO J., KIM W.T., ARYAN A.P., LARSON R. et KRISHNAN H.B., 1989. Structure and expression of the rice glutelin multigene family. *J. Biol. Chem.*, **264** (21), 12 573-12 581.
- OSBORNE T.B., 1907 - *The proteins of the wheat kernel*. Carnegie Inst. Washington, Washington DC., Pub. No 84.
- PERNOLLET J.C., 1985 - Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. *Physiol. Vég.*, **23** (1), 45-49.
- PERNOLLET J.C. et MOSSÉ J., 1983 - Structure and location of legume and cereal storage proteins. In: *Seed proteins, Annual proceedings of the phytochemical society of Europe*, n° 20 (J. Daussant, J. Mossé and J. Vaughan, eds.), Acad. Press, pp. 151-191.
- PERNOLLET J.C., HUET J.C., MOUTOT F. et MOROT-GAUDRY J.F., 1986 - Relationship between Photosynthesis and Protein synthesis in Maize. II. Interconversions of the photoassimilated carbon in the ear leaf and ioteins and starch. *Plant Physiol.*, **80**, 216-222. storage proteins and starch. *Plant Physiol.*, **80**, 216-222.
- POMERANZ Y., 1987 - *Modern Cereal Science and Technology*, VCH Publishers, New York, 486p.
- RAHMAN S., KREIS M., FORDE B.G., SHEWRY P.R. et MIFLIN B.J., 1984 - Hordein gene expression during development of the barley (*Hordeum vulgare* L.) endosperm. *Biochem. J.*, **233**, 315-322.
- ROCHAT C. et BOUTIN J.P., 1991 - Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of fruit of nodulated or nitrate-fed pea plants (*Pisum sativum* L.). *J. Exp. Bot.*, **42**, 207-214.
- SHEWRY P.R., 1995 - Plant storage proteins. *Biol. Rev.*, **70**, 375-426.
- SHEWRY P.R., MILES M.J. et TATHAM A.S., 1994 - The prolamin storage proteins of wheat and related species. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **61** (1), 37-59.
- SHEWRY P.R., NAPIER J.A. et TATHAM A.S., 1995 - Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 945-956.
- SHEWRY P.R., MIFLIN B.J. et KASARDA D.D., 1984 - The structural and evolutionary relationships of the prolamin storage proteins of barley, rye and wheat. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B 304**, 297-308.
- SHEWRY P.R. et MIFLIN B.J., 1985 - Seed storage proteins of economically important cereals. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. 7, (Y. Pomeranz, ed.), American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minn., USA, pp. 1-83.
- SHOTWELL M.A. et LARKINS B.A., 1989 - The biochemistry and molecular biology of seed storage proteins. In: *The biochemistry of plants* (P.K. Stumpf and W.E. Cohn, Eds), Academic Press, San Diego, **15**, 298-245.
- SPENCER D., 1984 - The physiological role of storage proteins in seeds. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B**, **304**:275-285.