

Thèse de Doctorat

Nathalie ANCIAUX-GENEIX

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : VENAM

Discipline : *Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie*

Unité de recherche : *Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, Nantes*

Soutenue le 10 Mai 2016

Interactions protéines-protéines et construction de la texture du grain de blé

JURY

Rapporteurs : **Thierry AUSSENAC**, Directeur de Recherche, Institut Polytechnique LaSalle, Beauvais
Thierry MICHON, Directeur de Recherche, INRA, Bordeaux

Examineurs : **Marie-Bernard LASCOMBE**, Chargée de Recherche, CNRS, Paris Descartes
Philippe SIMIER, Professeur, Université, Nantes

Directeur de Thèse : **Didier MARION**, Directeur de Recherche, INRA, Nantes
Co-encadrant de Thèse : **Khalil ELMORJANI**, Ingénieur de Recherche, INRA, Nantes

Il est admis que la texture du grain est un paramètre clé de la valeur d'usage du blé. La dureté, qui décrit cette texture (caractère « hard » ou « soft ») est associée à un locus contenant les gènes des puroindolines (PINs), PINA et PINB, protéines spécifiques de l'albumen. Les mécanismes physico-chimiques associés à ces relations génétiques sont inconnus. Dans ce contexte, l'étude de l'auto-association des PINs montrent qu'une simple mutation de la PINB modifie ses propriétés agrégatives et indirectement celles de la PINA avec laquelle les formes mutées de la PINB interagissent. Ces interactions sont en parfaite adéquation avec l'expression des phénotypes « hard » ou « soft » du blé tendre et soulignent l'importance des interactions protéines-protéines dans l'expression de la texture du grain. En raison de la co-localisation des PINs et des protéines de réserve, au sein de l'albumen de blé, les interactions entre les gliadines et la PINA ont été étudiées. La PINA interagit avec les gliadines selon un phénomène hautement coopératif conduisant à la formation de gros agrégats protéiques. Cette interaction impliquerait préférentiellement les α -gliadines et notamment leur domaine répété. Ces résultats montrent pour la première fois que les interactions protéines-protéines sont vraisemblablement un mécanisme important dans l'expression de la texture du grain. En accord avec ce mécanisme nous avons observé que le niveau de surexpression de la PINA dans un fond génétique « Hard » est significativement et linéairement corrélé au PSI (Particle Size Index), un indicateur de la dureté et indirectement des forces associant matrice protéique et grain d'amidon au sein de l'albumen.

Mots clés : Blé, dureté, puroindoline, gliadine, interaction protéines-protéines.

Abstract

The texture of wheat kernel is essential for its end-uses. Hardness, the main parameter describing kernel texture (“hard” and “soft” phenotypes), is closely related to a locus containing the genes encoding puroindolines (PINs), PINA and PINB, proteins located in the starch-protein matrix of the wheat endosperm. The physicochemical mechanisms, which accounts for these relationships are still matter of debate. In this context, the self-association of PINs shows that a single mutation of PINB changes its aggregative properties and indirectly, those of PINA. These interactions fit well with the expression of the “hard” and “soft” phenotype and emphasize the significant role of protein-protein interactions in the expression of kernel texture. In regard to the co-localisation of PINs and prolamins, storage proteins of wheat, within the endosperm, we investigated the interactions between PINA and gliadins, a protein fraction of prolamins. The interaction of PINA with gliadins is a highly cooperative phenomenon leading to the growth of large protein aggregates. This interaction could specifically involve α -gliadins and especially their repeat domain. These results show, for the first time, that protein-protein interactions are seemingly a significant mechanism for the expression of kernel texture. In agreement with this mechanism, we observed a close and linear relationship between the expression level of PINA in a “hard” genetic background through PSI (Particle Size Index) measurements, a marker of grain hardness and indirectly of the strengths that control the assembly of the endosperm starch-protein matrix.

Key Words: Wheat, hardness, puroindoline, gliadin, protein-protein interaction.

Sommaire

Abréviations	1
Table des illustrations	3
Partie 1. Bibliographie	5
1. Le grain de blé	8
1.1 <i>Origine et phylogénie du blé tendre</i>	8
1.2 <i>Structure histologique du grain</i>	9
1.3 <i>Transformation du grain en farine.</i>	10
2. Les constituants de l'albumen amylo-protéique : structure et polymorphisme biochimique.....	11
2.1 <i>L'amidon</i>	11
2.2 <i>Les protéines</i>	13
2.3 <i>Les lipides</i>	19
3. Propriétés fonctionnelles des constituants du grain : de la première à la seconde transformation.....	21
3.1 <i>L'amidon</i>	21
3.2 <i>Les lipides</i>	21
3.3 <i>Les protéines, réseau viscoélastique du gluten.</i>	23
4. Texture du grain et valeur d'usage des blés.....	25
4.1 <i>Texture du grain : dureté et vitrosité</i>	25
4.2 <i>Texture du grain : qualité des farines.</i>	26
4.3 <i>Dureté : bases physicochimiques et moléculaires.</i>	27
5. Les puroindolines et la texture du grain de blé tendre.....	28
5.1 <i>Variabilité génétique.</i>	28
5.2 <i>Propriétés physico-chimiques des puroindolines.</i>	29
5.3 <i>Interactions des puroindolines en relation avec la texture du grain.</i>	31
6. Références.....	35
Partie 2. Matériels et Méthodes	41
1. Extraction et purification des protéines.....	43
1.1. <i>Les puroindolines</i>	45
1.2. <i>Les gliadines</i>	46
2. Méthodes de contrôle.....	47
2.1. <i>Analyse par électrophorèse</i>	48
2.2. <i>Analyse par Western Blot</i>	50
2.3. <i>Dosage par ELISA</i>	50
2.4. <i>Analyse par HPLC en phase inverse</i>	51
2.5. <i>Analyse par spectrométrie de masse</i>	51

Sommaire

3. Méthodes de caractérisation des interactions protéines-protéines.	52
3.1. <i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i>	52
3.2. <i>Laser Light Diffraction</i>	56
3.3. <i>Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4)</i>	57
3.4. <i>Chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)</i>	61
3.5. <i>Résonance Plasmonique de Surface (RPS)</i>	62
3.6. <i>Electrophorèse 2D, BN-PAGE/SDS-PAGE</i>	68
4. Références.....	70

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines **71**

1. Résumé.....	73
2. Mise en évidence d'interactions puroindoline-puroindoline.	74
3. Comportement agrégatif des puroindolines en solution.....	77
3.1. <i>Introduction</i>	77
3.2. <i>Materials and methods</i>	79
3.3. <i>Results and discussion</i>	83
3.4. <i>Conclusion</i>	95
3.5. <i>Supplemental datas</i>	97
4. Références.....	100

Partie 4-Résultats-Interactions puroindolines-gliadines **105**

1. Résumé.....	107
2. Mise en évidence des interactions PINA-gliadines par SPR.	109
3. Mise en évidence des interactions PINA-gliadines par HPSEC.....	110
4.-Article: Dose-response effect of puroindoline A on grain hardness and possible relationships with prolamin aggregation.....	110
4.1 <i>Introduction</i>	110
4.2 <i>Materials and methods</i>	112
4.3 <i>Results and discussion</i>	117
4.4 <i>Conclusion</i>	127
4.5 <i>Supplemental datas</i>	128
5. Références.....	129

Partie 5-Conclusion et perspectives **133**

Abréviations

AF4	Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation
BN	Blue Native
CM	CarboxyMethyl
DGDG	DiGalactosylDiGlycéride
DLS	Dynamic Light Scattering
EDC	Ethyl Dimethyl propyl-Carboimide
EDTA	Acide Ethylene Diamine Tétracétique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electro-Spray Ionisation
GL	GlycoLipid
GSP	Grain Softness Protein
Ha	locus Hardness
HBS	Hepes Buffer Saline
HMW	High Molecular Weight
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPSEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
JAA	Jour Après Anthèse
kDa	kilo Dalton
LMW	Low Molecular Weight
LPC	Lyso-Phosphatidyl Choline
LPE	Lyso-Phosphatidyl Ethanolamine
MALS	Multi Angular Light Scattering
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MGDG	MonoGalactosylDiGlycéride
MM	Masse Moleculaire
MS/MS	Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry
NAPE	N-AcylPhosphatidylEthanolamine
NHS	N-Hydroxy-Succinimide
NPL	Non Polar Lipid
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Phosphatidyl Choline
PE	Phosphatidyl Ethanolamine
PI	Phosphatidyl Inositol
Pi	Point isoélectrique
<i>Pina</i>	Puroindoline-a gene
PINA	Puroindoline A protein
<i>Pinb</i>	Puroindoline-b gene
PINB	Puroindoline B protein
PL	PhosphoLipid

Abréviations

PSI	Particle Size Index
QTL	Quantitative Trait Loci
RE	Réticulum Endoplasmique
RPS	Résonance Plasmonique de Surface
RU	Resonance Unit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TFA	TriFluoroAcetic
TRD	Tryptophan Rich Domain
UPR	Unfolded Protein Response

Table des illustrations

Tableau 1. 1 : Taxonomie du blé tendre	8
Tableau 1. 2 : Caractérisation des prolamines.....	15
Tableau 1. 3 : La valeur boulangère en panification française définie par l'alvéographe	25
Tableau 1. 4 : Principaux allèles Pina-D1 et Pinb-D1.....	29
Tableau 2. 1: Variétés de blé tendre utilisées.....	43
Tableau 2. 2: Programmes utilisés pour la séparation en AF4 des petites et grosses molécules	60
Tableau 2. 3 :Masse moléculaire et R_H des protéines standards utilisées en HPSEC	62
Figure 1. 1 : Multiplication des chromosomes du blé tendre.....	9
Figure 1. 2 : Anatomie schématique du grain de blé, proportion.....	10
Figure 1. 3 : Image en microscopie électronique à balayage et lumière polarisée (insert).....	12
Figure 1. 4 : a) Structure chimiques de l'amylose, b) Structure en grappe	12
Figure 1. 5 : Classification des protéines du blé et répartition dans le grain.....	13
Figure 1. 6 : Images en microscopies confocale à balayage laser et électronique	14
Figure 1. 7 : Classification des prolamines	15
Figure 1. 8 : Séquences des gliadines.....	16
Figure 1. 9 : Séquences des gluténines et du domaine β -spiral.....	17
Figure 1. 10 : Séquence des puroindolines PINA-D1a et PINB-D1a	19
Figure 1. 11 : Prédiction de structure de la PINA (I-TASSER).	19
Figure 1. 12 : Composition et distribution des lipides dans le grain de blé	20
Figure 1. 13 : Transformation de la farine en pain ; hypothèse de la formation d'un film.....	23
Figure 1. 14 : Réseau viscoélastique du gluten	24
Figure 1. 15 : Diagramme alvéographe de Chopin de différents types de farine	25
Figure 1. 16 : (A) Distribution de la taille des particules de la farine.....	27
Figure 1. 17 : Accumulation des PINs, de l'amidon et des protéines.....	34
Figure 2. 1: Schéma de purification des α -gliadines	47
Figure 2. 2: Corrélogrammes typiques pour un échantillon.	53
Figure 2. 3 :Intensité diffusée vs rayon hydrodynamique (R_H)	55
Figure 2. 4 :Distribution de taille en intensité et en volume	55
Figure 2. 5 :Résumé du principe de fonctionnement de la DLS.....	56
Figure 2. 6 :Shéma de principe du processus séparatif dans le canal de l'AF4.....	58
Figure 2. 7 :Courbes d'étalonnage pour le calcul du R_H et de la masse moléculaire en HPSEC ...	62
Figure 2. 8 : Shéma de principe de la résonance plasmonique de surface.....	63
Figure 2. 9 : Schéma illustrant un sensorgramme.....	64
Figure 2. 10 : Activation des groupements amines des protéines par le cocktail EDC/NHS	66
Figure 2. 11 :Mesures cinétiques et d'affinité	67
Figure 2. 12 :Schéma représentatif de l'électrophorèse 2D associant BN-PAGE/SDS-PAGE.....	69

Partie 1. Bibliographie

Selon les projections de l'ONU, 2,4 milliards de personnes supplémentaires seront à nourrir dans le monde sur la période de 2010 à 2050. Cette forte croissance démographique (+35%) se traduira, entre autres phénomènes, par une augmentation de près de 50 % de la demande de céréales (soit 1 milliard de tonnes supplémentaires pour atteindre 3 MdsT en 2050). Cette hausse de la demande va aboutir à un objectif supplémentaire de production de +6.5 millions de tonnes/an pour le blé (+ 13,7 Mt/an pour le maïs et autres céréales, hors riz). Le maïs est la céréale la plus produite au monde et représente 38% de la production mondiale, suivi du blé (29%) et du riz (21%). La majeure partie de la production de céréales en France se concentre sur 4 espèces : le blé tendre (4.86 M ha cultivés, 35.5 Mt produits), le maïs grain, l'orge et le blé dur (0.44 M ha cultivés, 2.38 Mt produits). La France est le premier producteur et le premier exportateur de blé tendre de l'Union Européenne (5 Mt/an de blé tendre sont transformés en farine) et le deuxième producteur de blé dur ([FAOSTAT, 2010](#)).

Un peu plus de 90% du blé utilisé en alimentation humaine est transformé en produits cuits. Par ailleurs, 60% de la production de farine sont destinés à la panification. Les autres industries comme la biscuiterie et la biscotterie en utilisent 29%. Environ 6% de la farine, distribuées en sachets sont utilisées pour la consommation individuelle. Les céréales ne sont pas uniquement une source d'énergie mais contribuent également de façon significative à l'apport de fibres et de micronutriments dans la ration alimentaire (vitamines, minéraux). Les atouts nutritionnels des produits céréaliers dépendent essentiellement des procédés technologiques utilisés pour le fractionnement des grains et dans une moindre mesure des variétés cultivées. Créer et sélectionner des variétés de blé à la fois très productives et d'une meilleure qualité d'utilisation constituent donc un objectif permanent pour les filières céréaliers françaises et européennes depuis les années 70. Outre les qualités technologiques des blés, les différents constituants du grain sont déterminants pour les deux valeurs de sa qualité ; valeur nutritionnelle et valeur d'usage. La valeur d'usage associe i) la valeur meunière où la texture des grains est importante pour la transformation en farine et ii) la valeur boulangère ou biscuitière où la teneur et la nature des protéines influencent la transformation de la farine en produits transformés cuits. Les grains de blé subissent une première transformation où le blé tendre devient farine et le blé dur semoule, puis une seconde transformation pour obtenir les produits de consommation courante : pains, pâtes alimentaires, couscous ou encore biscuits. La diversité des produits céréaliers de cuisson est principalement liée à la capacité des protéines de blé à former en présence d'eau, un réseau

insoluble, le gluten, qui assure la cohésion des grains d'amidon dans la pâte et lui confère ses propriétés rhéologiques uniques de ténacité, d'extensibilité et d'élasticité. Ces propriétés jouent un rôle clé dans la texture des produits céréaliers cuits. Les protéines ne sont pas les seuls constituants nécessaires à l'obtention d'aliments de bonne qualité, les lipides et les polysaccharides pariétaux (arabinoxylanes et β -glucanes) contribuent aussi à la texture et la saveur des produits finis.

1. Le grain de blé

1.1 Origine et phylogénie du blé tendre

Originaire de Mésopotamie (aujourd'hui Irak), le blé est une des plus anciennes plantes cultivées dans le monde, tout d'abord à l'état sauvage puis domestiquée au VIII^e millénaire avant Jésus-Christ. Le blé est une plante annuelle, monocotylédone de la famille des *Poaceae* (anciennement graminées), (**Tableau 1.1**). Il appartient à la sous-famille des *Triticeae* et au genre *Triticum*. Au sein du genre *Triticum*, il existe de nombreuses espèces, cependant, seuls *Triticum aestivum* (le blé tendre) et *Triticum durum* (le blé dur) ont une réelle importance économique et de ce fait sont les plus cultivées et plus particulièrement le blé tendre par ses nombreuses utilisations en alimentation humaine.

Tableau 1. 1 : Taxonomie du blé tendre

Ordre	Poales
Famille	Poacées
Espèce	<i>Triticum aestivum</i> L.
Sous-espèce	<i>Ssp. aestivum</i>
Nom commun	Blé tendre ou froment

Ces espèces de blé ont été générées par des événements successifs de polyploïdisation intervenant après des croisements interspécifiques entre trois espèces ancestrales diploïdes amenant les trois génomes présents dans le blé tendre : A, B et D (**Figure 1.1**). Une première hybridation entre un parent donneur du génome A ($2n=14$, AA) *Triticum monococcum* et un parent donneur du génome B ($2n=14$, BB) *Aegilops speltoides*, a eu lieu il y a environ 500 000 ans et a conduit à l'apparition du blé dur tétraploïde *Triticum turgidum* ($2n=4 \times 7=28$, AABB). Le deuxième événement de polyploïdisation a eu lieu au cours de la domestication, il y a environ

9000-12000 ans, entre le blé dur cultivé (tétraploïde) et un autre blé diploïde (*Aegilops tauschii*) et a donné *Triticum aestivum*, le blé tendre panifiable actuel.

Il est hexaploïde c'est-à-dire qu'il comporte 6 jeux de chromosomes ($2n=6 \times 7=42$, AABBDD). Le grain de blé, principal produit récolté, est un caryopse (fruit sec indéhiscent), constitué d'une graine et de téguments.

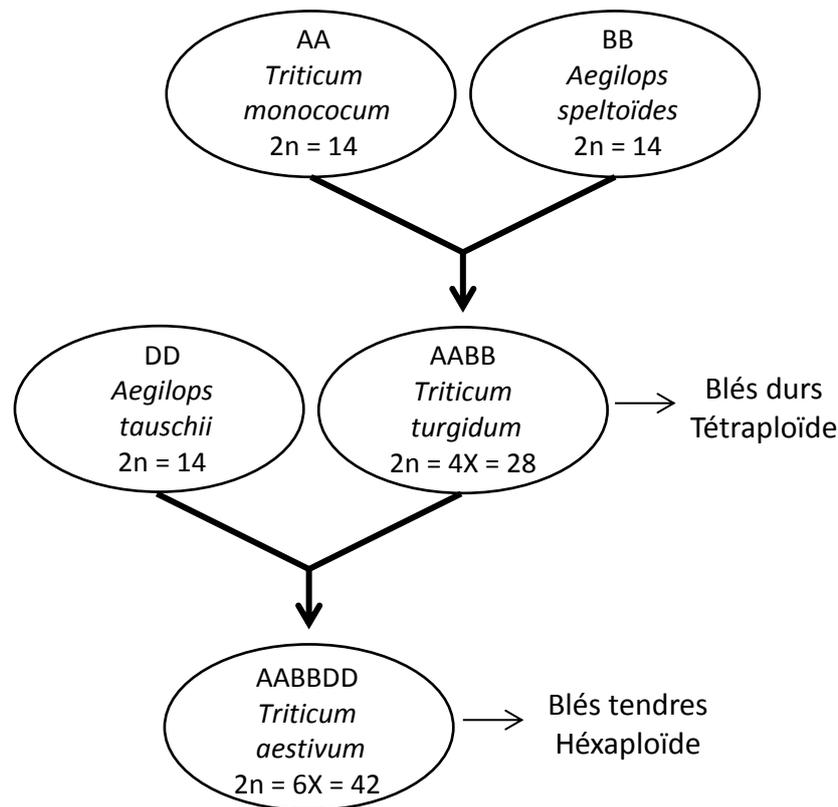


Figure 1.1 : Multiplication des chromosomes du blé tendre.

1.2 Structure histologique du grain

Le grain de blé est un organe complexe qui permet le développement de la plante à partir du germe (embryon) grâce aux substances de réserve, l'amidon et les protéines des cellules de l'albumen amylicé. L'albumen amylicé est entouré d'une assise cellulaire, la couche à aleurone contenant des réserves protéiques et lipidiques.

Les tissus périphériques ou téguments recouvrant l'albumen amylicé, la couche à aleurone et l'embryon, sont formés de l'extérieur vers l'intérieur par le péricarpe, la testa et l'épiderme de nucelle. Principalement de nature polysaccharidique, ces tissus renferment des assises cuticulaires, édifices supramoléculaires hydrophobes composées de cutine, polyester de glycérol et d'acides gras hydroxylés et/ou époxydés, et de cires (Matzke and Riederer, 1990).

Ces assises cuticulaires pourraient jouer un rôle dans l'adhésion de la couche à aleurone aux téguments (Antoine et al., 2003; Beaugrand et al., 2004) (Figure 1.2).

Les grains des différentes espèces de blé présentent des formes et des tailles différentes. Ces différences morphologiques ont une grande importance pour l'utilisation des grains. Ils sont fractionnés pour obtenir des farines contenant tout ou une partie des tissus du grain.

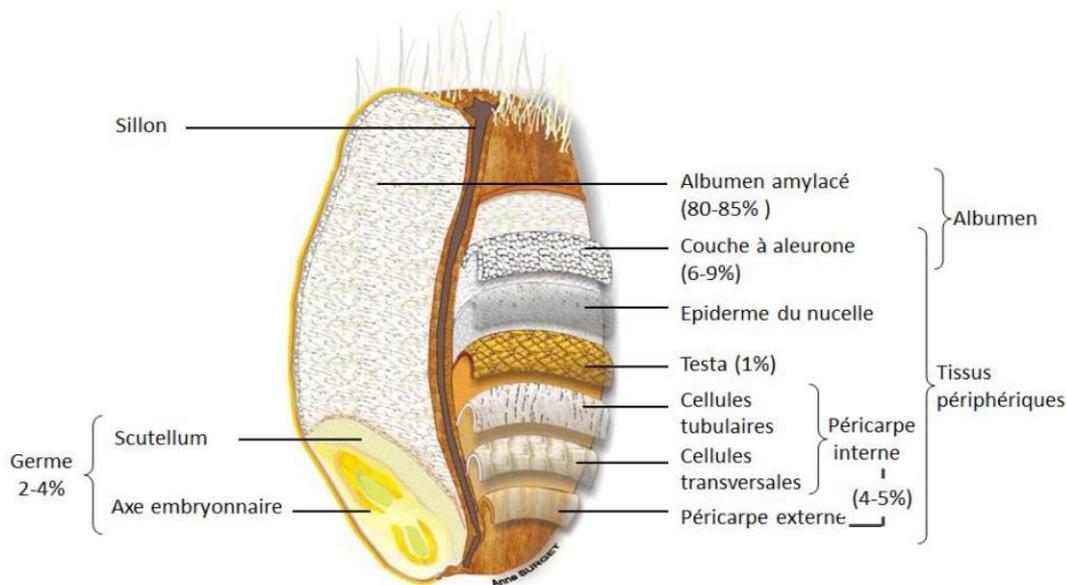


Figure 1. 2 : Anatomie schématique du grain de blé, proportion relative des principaux tissus. D'après [Surget and Barron \(2005\)](#)

1.3 Transformation du grain en farine.

La transformation en farine des grains de blé est un procédé qui consiste à séparer l'albumen amylicé (sous forme de farine) des tissus périphériques. La valeur meunière d'un blé permet l'obtention d'un bon rendement en farine tout en minimisant les contaminations par les tissus périphériques et le germe. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la valeur meunière : la résistance mécanique des enveloppes, la capacité à séparer l'albumen des enveloppes, l'aptitude à la réduction en taille de l'albumen pour la transformation en farine (granulométrie, forme des particules, taux d'endommagement des granules d'amidon).

Schématiquement, le diagramme de mouture comprend plusieurs opérations unitaires. Avant le broyage, les grains sont humidifiés pour fragiliser l'albumen (favorise sa réduction en farine sans abimer les granules d'amidon) et plastifier le son, ce qui les rend moins sensibles à la fragmentation et facilite la séparation. Différentes conditions d'humidité sont appliquées en fonction de la dureté du grain de blé: le blé tendre est généralement trempé de 14,5% à 15,5%,

tandis que le blé dur de 15,5% à 17,0% (Manley D. et al., 2011; Posner, 2000). Ensuite les grains subissent un fractionnement (séparation des enveloppes et de l'albumen), un claquage (réduction des semoules en particules fines) et un convertissage (obtention de particules encore plus fines). Ces transformations aboutissent à différents types de farine définis en fonction du taux de cendres dans 100 gr de matière sèche. Les minéraux se concentrent dans les tissus périphériques et le taux de cendres (résidu minéral) constitue un marqueur de la contamination des farines par les tissus périphériques. Il caractérise en meunerie le rendement d'extraction du grain.

La texture (dureté, vitrosité) du grain impacte l'ensemble de ces opérations de transformation et constitue donc une caractéristique déterminante pour définir le procédé de broyage et doit être connue par le meunier afin d'optimiser le rendement de l'extraction de la farine (Posner, 2009). Cette texture est étroitement associée à l'assemblage des constituants protéiques et des grains d'amidon. Les lipides moduleraient cet assemblage en interagissant avec des protéines spécifiques, les puroindolines. Au-delà de la texture du grain, ces composés sont également essentiels pour la qualité des produits de cuisson.

2. Les constituants de l'albumen amylicé impliqués dans la structuration de la matrice amylo-protéique : structure et polymorphisme biochimique.

2.1 L'amidon

L'amidon, polysaccharide de réserve, apparaît sous forme de grains dès le quatrième jour après anthèse dans l'albumen amylicé (Bechtel et al., 1990). La distribution et la taille des grains d'amidon présentent une distribution bimodale, les grains les plus gros pouvant aller de 22 à 36 μm , et les grains plus petits faisant de 2 à 3 μm (Pérez and Bertoft, 2010) (**Figure 1.3**). Principal constituant de l'albumen des grains de céréales (environ 75-80% du poids sec du grain), l'amidon, polysaccharide de réserve est composé de deux polymères de D-glucopyranose : l'amylose (20-30%) et l'amylopectine (70-80%).

L'amylose est une macromolécule de structure linéaire constituée d'unités α -D-glucose liées par des liaisons de type α -(1,4) (**Figure 1.4**). L'amylose présente des degrés de polymérisation variables (Buléon et al., 1990; Hizukuri, 1985). L'amylose forme des complexes avec des lipides monoacylés qui se concentrent dans les grains d'amidon (cf. ci-après).

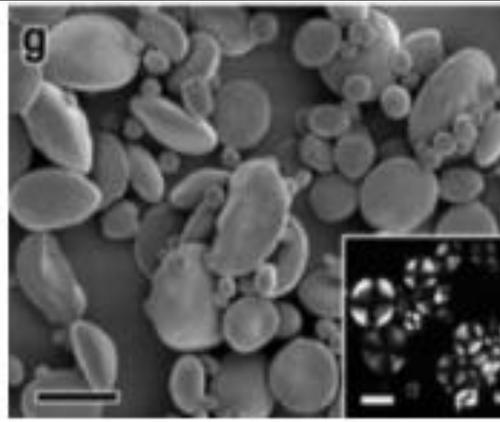


Figure 1. 3 : Image en microscopie électronique à balayage et lumière polarisée (insert) de grains d'amidon de blé. Barre d'échelle 20 μm d'après [Pérez and Bertoft \(2010\)](#)

L'amylopectine, contrairement à la longue chaîne linéaire d'amylose, est une macromolécule de structure branchée (**Figure 1.4**). L'amylopectine est formée de chaînes linéaires de D-glucose lié par des liaisons en α -(1,4) auxquelles s'associent des chaînes branchées impliquant des liaisons α -(1,6) (5-6%) ([Pérez and Bertoft, 2010](#)). Les nombreuses ramifications de l'amylopectine sont responsables de l'aspect semi-cristallin des grains d'amidon ([Hizukuri, 1985](#)). La cristallinité des amidons serait due essentiellement aux chaînes en doubles hélices de l'amylopectine; la cohésion des zones cristallines est assurée par des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

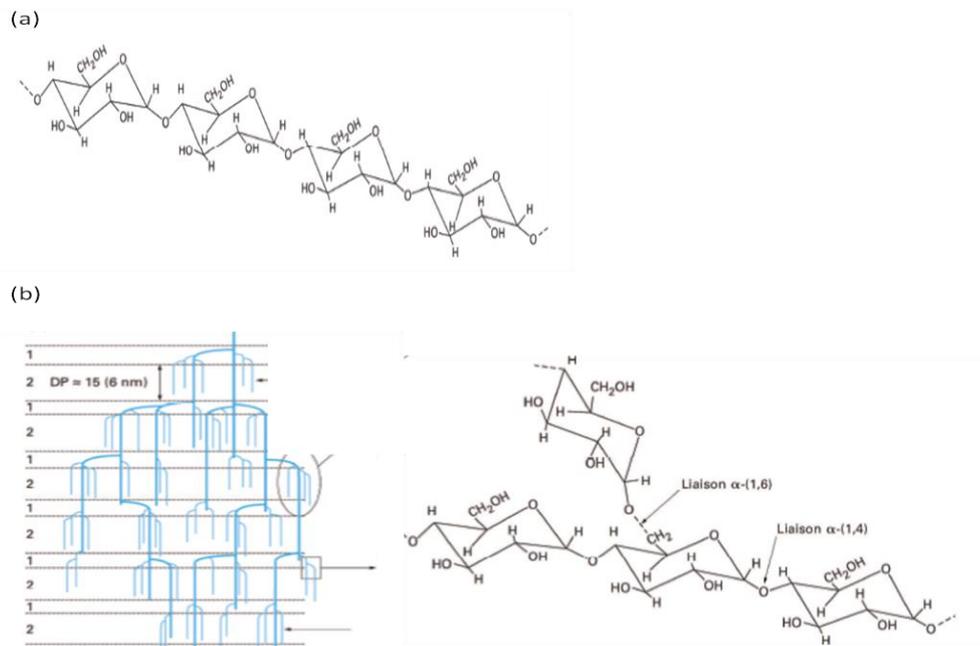


Figure 1. 4 : a) Structure chimique de l'amylose, b) Structure en grappe et chimique de l'amylopectine. Régions amorphes (1) et cristallines (2).

2.2 Les protéines

Les protéines du blé sont classées en trois grandes familles sur la base de leur solubilité dans différents solvants. Les albumines, solubles dans l'eau, les globulines solubles dans les solutions salines, et la famille la plus importante, la famille des prolamines appelées ainsi en raison de leur richesse en résidus proline et glutamine. Si les prolamines représentent les principales protéines de réserve du grain de blé, on peut considérer que certaines albumines et globulines jouent également ce rôle, notamment pour d'autres compartiments comme la couche à aleurone et l'embryon (Tasleem-Tahir et al., 2011) (Figure 1.5). Seules, les prolamines et une famille particulière des albumines, les puroindolines, structurellement apparentées aux protéines 2S de réserve des dicotylédones, interviennent sur l'assemblage de la matrice amyloprotéique.

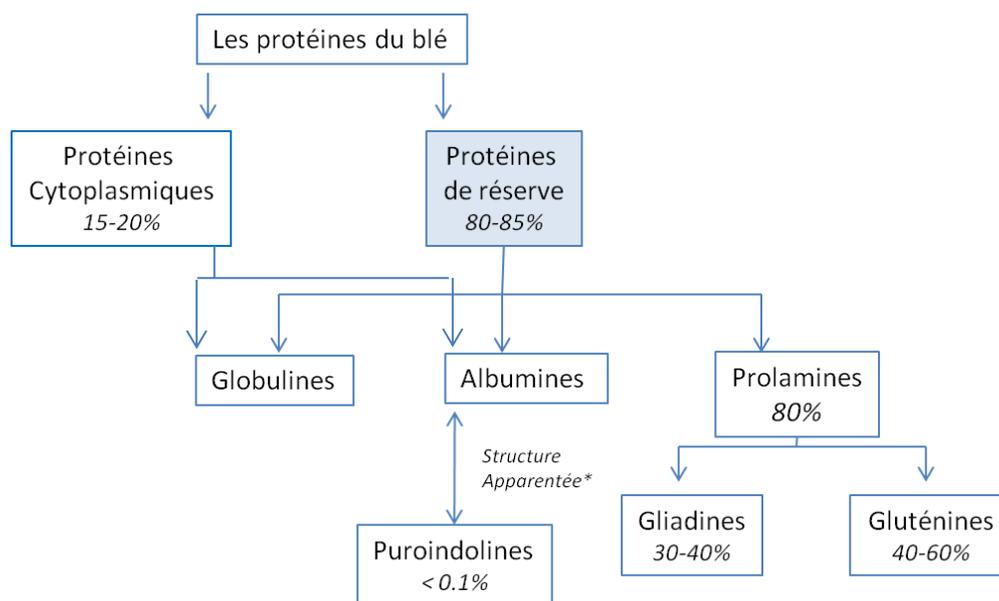


Figure 1. 5 : Classification des protéines du blé et répartition dans le grain.

*structure apparentée d'après Lesage et al. (2011) aux albumines 2S des dicotylédones

Structure des prolamines

La teneur et la composition en protéines de l'albumen amylicé varient en fonction des cultivars et des conditions de culture. Ce sont les prolamines, protéines de réserve qui présentent la plus grande variabilité. Les protéines de réserve représentant environ 80% des protéines du grain de blé sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et

accumulées sous forme de corpuscules protéiques (0,8 à 2 μm) qui fusionnent dans une vacuole protéique au cours du développement de l'albumen. Le contenu est ensuite libéré pour former la matrice protéique autour des grains d'amidon à la maturité physiologique du grain (fin de l'accumulation des réserves) et la dessiccation (30-40 jaf, jours après floraison) (**figure 1.6**). Ces protéines sont dégradées ensuite au cours de la germination.

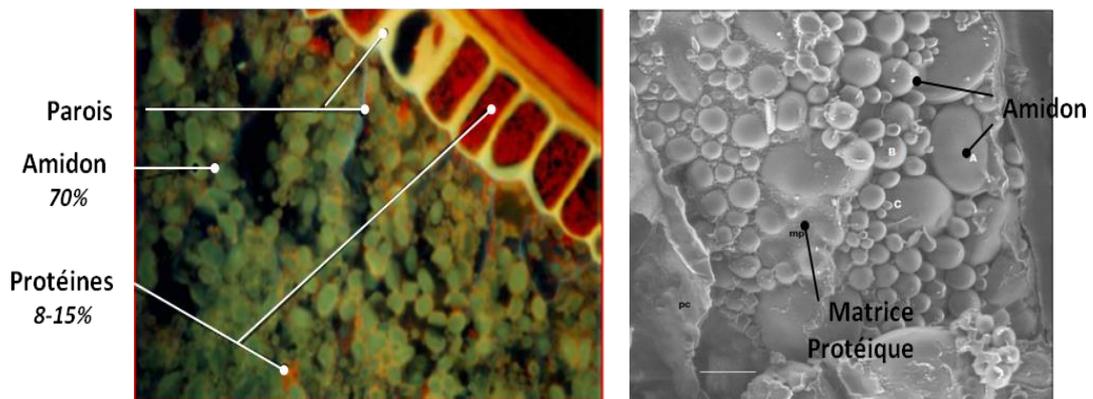


Figure 1.6 : Images en microscopies confocale à balayage laser et électronique à balayage (MEB) de la matrice protéique. Image MEB d'après [Branlard \(2009\)](#).

Elles forment une famille multi-génique avec plus d'une dizaine de protéines différentes exprimées dans chaque classe de prolamines. Dans les différents génotypes du blé, la variation protéique existe dans le nombre de protéines exprimées mais aussi dans la proportion des différentes protéines les unes par rapport aux autres, et dans les propriétés intrinsèques de ces différentes protéines (point isoélectrique, masse moléculaire) ([Shewry, 2009](#)).

Parmi les prolamines deux groupes de protéines sont à distinguer; les gliadines, protéines monomériques solubles dans les solutions hydroalcooliques et à pH acide (environ 40% des prolamines) et les gluténines protéines polymériques insolubles dans l'alcool (environ 60% des prolamines), ([Shewry et al., 1988](#)). Les prolamines peuvent être aussi classées selon leur richesse en acides aminés soufrés ; les prolamines pauvres en soufre (S-Poor), les prolamines riches en soufre (S-Rich) (**Figure 1.7**).

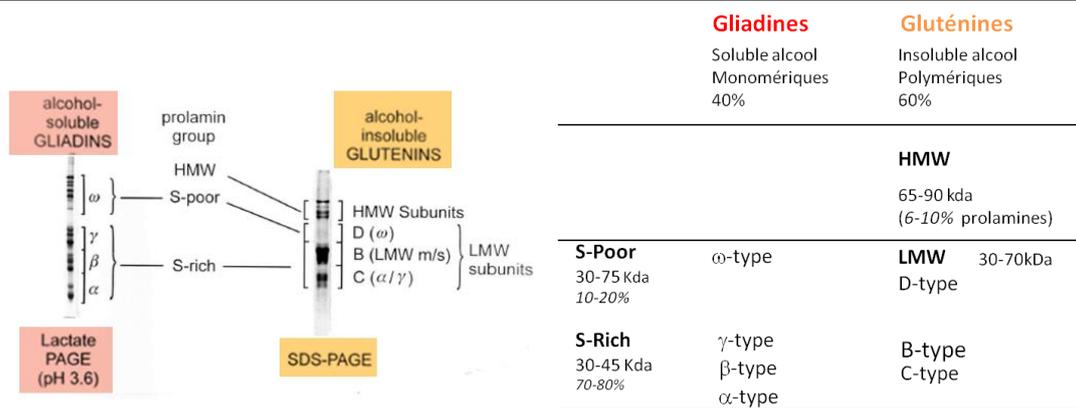


Figure 1.7 : Classification des prolamines

Les gliadines, ont tout d'abord été classées en 4 groupes, α -, β -, γ -, ω -gliadines, sur la base de leur mobilité électrophorétique à pH acide. L'étude ultérieure de la séquence en acides aminés des gliadines a montré que les α - et β - gliadines pouvaient être classées dans le même groupe ; on définit aujourd'hui le type α/β . Les méthodes de séparations comme la 2D-PAGE et l'HPLC en phase inverse ont permis d'isoler plus d'une centaine de protéines de la fraction gliadine. Sur la base de l'analyse complète ou partielle de leur séquence en acides aminés et de leur poids moléculaire elles ont pu être classées en 4 types différents ω 5-, ω 1, 2-, α/β - et γ -gliadines (Wieser et al., 2006) (Tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Caractérisation des prolamines.

Type	MW $\times 10^{-3}$	Proportions ^a (%)	Partial amino acid composition (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω 5-Gliadins	49-55	3-6	56	20	9	1	1
ω 1,2-Gliadins	39-44	4-7	44	26	8	1	1
α/β -Gliadins	28-35	28-33	37	16	4	3	2
γ -Gliadins	31-35	23-31	35	17	5	1	3
α -HMW-GS	83-88	4-9	37	13	0	6	19
γ -HMW-GS	67-74	3-4	36	11	0	5	18
LMW-GS	32-39	19-25	38	13	4	1	3

^aAccording to total gluten proteins.

Dans chaque type les différences de structure primaire sont minimes et sont dues à une délétion ou substitution d'un acide aminé. Les ω 1,2-gliadines (40 et 50 kDa) sont caractérisées par un taux élevé en glutamine, proline et phénylalanine (80% de la composition totale), et sont dépourvues de cystéines. Ces protéines sont principalement constituées de séquences répétées riches en glutamine et proline (i.e. PQQPFPQQ) (Figure 1.8). Les α/β - et γ -gliadines ont des masses moléculaires voisines (28 à 35 kDa) et les proportions de glutamine et proline sont plus

faibles que dans les ω -gliadines. Les différences entre les 2 types se portent sur le domaine N- et C-terminal. Le domaine N-terminal (40-50% de la protéine totale) contient essentiellement des séquences répétées différentes d'un type à l'autre. Les séquences répétées des α/β -gliadines sont formées par le peptide QPQPFQQPYP (répété 5 fois) et celles des γ -gliadines par le peptide QPQQPFP (répété 16 fois). Le domaine C-terminal des α/β - et γ -gliadines présente plus d'homologie. Il présente des séquences non répétées avec moins de glutamine et de proline, des cystéines ; 6 pour les α/β -gliadines et 8 pour les γ -gliadines, favorables respectivement à la formation de 3 et 4 ponts disulfure intramoléculaires (Wieser, 2007).

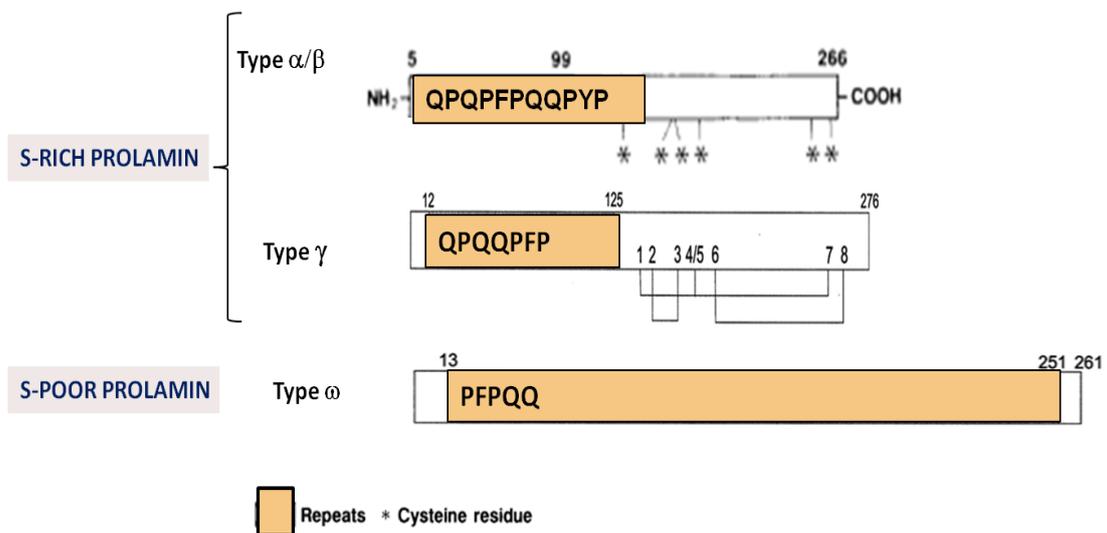


Figure 1. 8 : Séquences des gliadines.

Les gluténines selon leur mobilité électrophorétique après réduction des ponts disulfures, sont constituées de protéines de haut poids moléculaire (HMW-G, High Molecular Weight Glutenin), de masse molaire variant de 65 à 90 kDa (6-10 % des prolamines) et des protéines plus nombreuses de faible poids moléculaires, 30 à 70 kDa (LMW-G, Low Molecular Weight Glutenin), avec un taux de résidus cystéines variables (**Figure 1.9**). Ces protéines possèdent des séquences répétées d'acides aminés et des cystéines exposées, favorables à la formation de ponts disulfures intermoléculaires conduisant à la formation de polymères de très haut poids moléculaires ($> 10^6$ Da) (Carceller and Aussenac, 2001; Lemelin et al., 2005). Les sous unités de HMW-G ont des séquences conservées d'acides aminés qui forment trois domaines distincts. Le domaine central formé par des séquences répétées d'acides aminés (motif court de 2 ou 3 peptides) varie de 420 à 700 résidus et est riche glutamine, proline et glycine (74 à 84 % de la protéine) (Shewry et al., 2002). Deux domaines aux extrémités de la chaîne, non répétés varient de 81 à 104 résidus pour le N-terminal et toujours 42 pour le domaine C-terminal. L'analyse des

peptides synthétiques sur la base des motifs de séquences répétées n'a pas encore conduit à la détermination de structures tridimensionnelles. Des études indirectes montrent que les structures secondaires des séquences répétées forment des spirale β inversées (Gilbert et al., 2000). Cette structure est similaire à celle mise en évidence pour un polypentapeptide synthétique mimant les motifs répétés de l'élastine (Urry, 1988). Le domaine β -spirale confère une élasticité intrinsèque aux HMW-G associées en réseau protéique (Shewry et al., 2002). La modélisation moléculaire montre que les séquences N-terminales et C-terminales non répétées, sont globulaires, avec une ou plusieurs hélice- α (Bekkers et al., 1996).

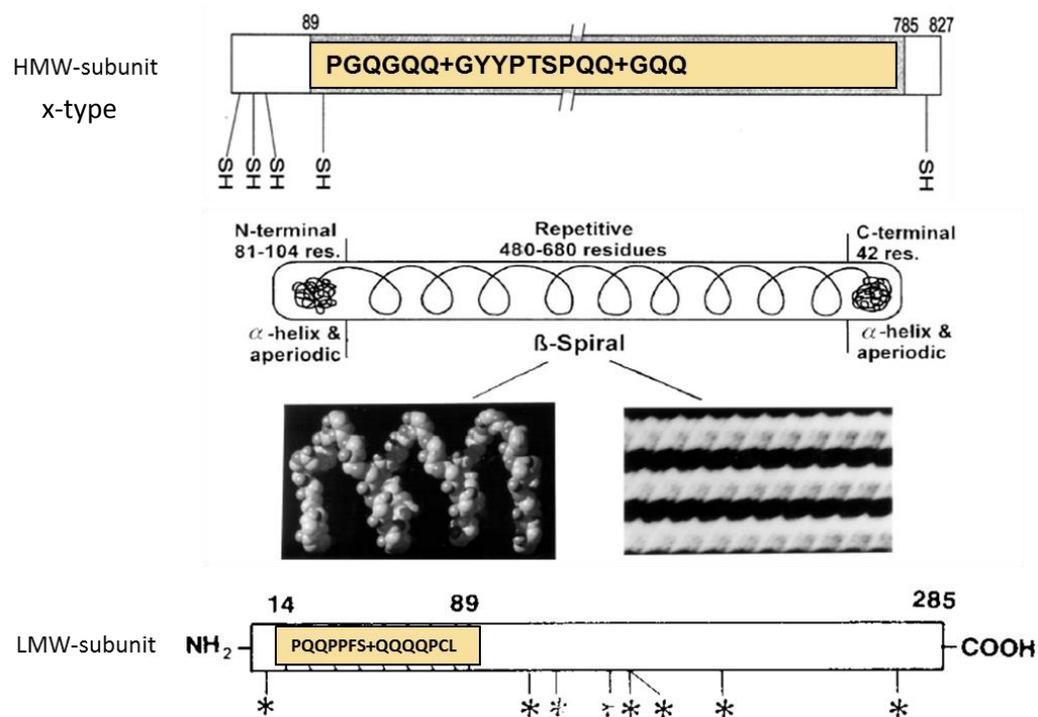


Figure 1. 9 : Séquences des gluténines et du domaine β -spirale

La structure des prolamines est particulièrement adaptée, notamment au travers de ces domaines à séquence répétée, à une compaction optimisée des réserves protéiques, et permet de répondre au moment de la germination aux besoins en acides aminés du métabolisme azoté et soufré. La compaction du réseau protéique doit vraisemblablement impacté la texture de l'albumen même si cet aspect est rarement pris en compte. Ceci tient au fait que la teneur en protéines de l'albumen impacte peu la texture du grain et pour certaines lignées isogéniques définies sur le caractère hard et soft aucune différence de teneur et de composition en protéines (prolamines notamment) n'a été observée (Lesage et al., 2011; Turnbull and Rahman, 2002). Toutefois, sur un échantillonnage plus conséquent de cultivar, on observe des

corrélations positives et significatives entre teneur en protéines et dureté (Bettge and Morris, 2000; Bordes et al., 2008).

Structure des puroindolines.

Les puroindolines sont des albumines dont les gènes sont étroitement associés à la dureté du grain (cf. paragraphe 5). Les puroindolines (PINs) sont présentes dans le grain sous deux isoformes ; puroindoline A (PINA) et puroindoline B (PINB), en faible quantité par rapport aux prolamines (<0.1%). Ce sont de petites protéines très basiques (pH isoélectrique 10,5-11) de faible masse moléculaire (environ 13 kDa et 113 acides aminés) (**Figure 1.10**). Elles sont synthétisées sous forme de pré-proprotéines contenant un peptide signal (19 résidus) et un propeptide N-terminal (9 résidus pour PINA et 10 pour PINB). Un autre clivage post-traductionnel se produit également au niveau C-terminal qui excise un tripeptide aromatique (YYW). Cette maturation C-terminale est probablement liée à une activité carboxypeptidase (Bloch et al., 1993; Day et al., 2006; Gautier et al., 1994). La présence d'un peptide signal témoigne d'un routage par les voies de sécrétion (réticulum endoplasmique) et des études récentes montrent que ces protéines sont co-synthétisées avec les protéines de réserve et localisées dans les corpuscules protéiques (Lesage et al., 2011). La maturation du propeptide et du tripeptide C-terminal n'a été corrélée à ce jour à aucun mécanisme cellulaire. Cependant dans le cas d'une protéine homologue, la Grain Softness Protein (GSP1), il a été mis en évidence que le propeptide était retrouvé comme le composé peptidique majeur d'arabinogalactane protéines (Van den Bulck et al., 2005). Toutefois la GSP1 possède un propeptide plus long que la PINA et la PINB (Elmorjani et al., 2013). Les deux PINs possèdent 10 résidus cystéines et un domaine riche en tryptophane (TRD, Tryptophan Rich Domain) : 5 résidus tryptophane pour la PINA (WRWWKWWK en position 38 à 45) et 3 pour la PINB (WPTKWWK en position 39 à 45) (Bloch et al., 1993; Gautier et al., 1994). Cette région hydrophobe et amphiphile car alternant les noyaux indoles du tryptophane et les résidus chargés des acide aminés cationiques (lysine et arginine) confère une forte affinité des PINs pour les lipides polaires (Doulliez et al., 2000). Les cystéines sont toutes impliquées dans des ponts disulfures intramoléculaires et stabilisent la structure tertiaire des PINs. Toutefois la structure du TRD n'a pu être modélisée alors que le repliement global de la protéine semble équivalent à celui des albumines 2S de réserve des graines de Dicotylédones (Bhave and Morris, 2008b; Lesage et al., 2011), (**Figure 1.11**).

PINA-D1a	MKALFLIGLLALVASTAFAQYSEVVGSY-DVAGGGGAQQ CP VET-KLNS CR NYLLDR CS T
PINB-D1a	MKTLFLLALLALVASTTFAQYSEVGGWYNEVGGGGGSQQ CP QERPKLSS CK DYVMER CF T
PINA-D1a	MKDFPVT WRWWKWW KGG CQ -ELLGE CC SRLGQMP PQCRC NI IQGSIQGD LG IFGFQ RDR
PINB-D1a	MKDFPVT WP-TKWW KGG CE HEVREK CK QLS QIAPQCRC DSIRRV IQ GR LG FLGIWR GE
PINA-D1a	ASKV IQ EAKNLPPR CN Q GP PC NI PGTIGYYW
PINB-D1a	VFKQLQRAQSLPSK CN MGAD CK FPS--GYW

Figure 1. 10 : Séquence des puroindolines PINA-D1a et PINB-D1a

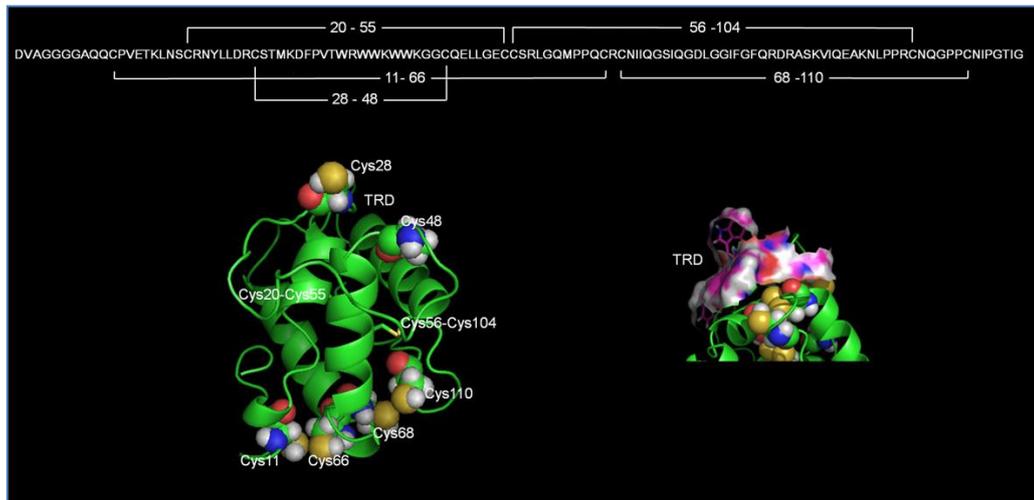


Figure 1. 11 : Prédiction de structure de la PINA (I-TASSER). Le domaine TRD est entouré de deux cystéines libres (Cys28, Cys48). à droite détail structure du TRD d'après [Lesage et al. \(2011\)](#)

2.3 Les lipides

Les lipides sont classés en deux groupes : les lipides non polaires et les lipides polaires (**Figure 1.12**). Les lipides non polaires (NPL) sont principalement composés de triglycérides (lipides de réserve). On trouve également des mono et diglycérides et des acides gras non estérifiés ou acides gras libres, des stérols et des pigments lipophiles (caroténoïdes, tocophérols). Ils sont principalement concentrés dans le germe et la couche à aleurone sous forme de corpuscules lipidiques (sphérosomes ou oléosomes), gouttelettes de triglycérides entourées d'une monocouche de lipides polaires, de stérols et de protéines ([Morrison, 1978](#)).

Les lipides polaires sont constitués de glycolipides, GL, (digalactosyldiglycérides, DGDG et monogalactosyldiglycérides, MGDG) et de phospholipides, PL, (phosphatidylcholine, PC, lysophosphatidylcholine, LPC, phosphatidylinositol, PI, phosphatidyléthanolamine, PE, lysophosphatidyléthanolamine LPE, N-acylphosphatidyléthanolamine, NAPE) et se retrouvent principalement dans l'albumen parfois associés au grain d'amidon sous forme de reliquats membranaires ([Finnie SM et al., 2009](#); [Morrison, 1978](#)). Les glycolipides sont les lipides des

Partie 1. Bibliographie

membranes de l'amyloplaste, organe où se déroule la synthèse de l'amidon. Une des caractéristiques majeures des phospholipides du blé est la N-acylation d'une grande partie de la PE conduisant à la NAPE et ses dérivés NALPE et NAE (N-acyl-lysophosphatidyléthanolamine et N-acyl éthanolamine). Ces lipides ne sont retrouvés que dans l'albumen amylicé. L'albumen amylicé contient la plus grande part des lipides polaires du grain (82%), (15% se retrouvent dans les sons et 3% dans le germe). Il contient entre 1,5 et 2% de lipides non inclus dans l'amidon (NSL pour *Non Starch Lipids*) qui sont dispersés au sein de l'albumen et peuvent réagir avec les autres constituants. Une autre partie des lipides polaires (SL pour *Starch Lipids*) est localisée à l'intérieur des granules d'amidon sous forme de complexe d'inclusion entre l'amylose et les lipides monoacylés et représentent entre 0,2 et 0,5% des lipides fortement associés à l'amidon. Ces lipides sont principalement des lipides monoacylés, lysophospholipides (LPC, LPE) et acides gras non estérifiés ou acides gras libres (AGL) et des lysophospholipides (Morrison, 1988). Une troisième fraction est parfois considérée et concerne les lipides fixés à la surface des granules d'amidon (SSL pour *Starch Surface Lipids*). Toutefois ces lipides ont généralement une composition proche voire identique à celle des NSL (Finnie et al., 2010; Morrison, 1988).

La composition et la teneur en lipides dans le grain de blé dépendent fortement de la variabilité génétique et du facteur environnemental qui vont influencer, au cours du développement, la taille de la cellule (membrane cellulaire), le stockage des lipides (oléosomes), l'accumulation des protéines (corps protéiques et vacuoles) et de l'amidon (amyloplastes).

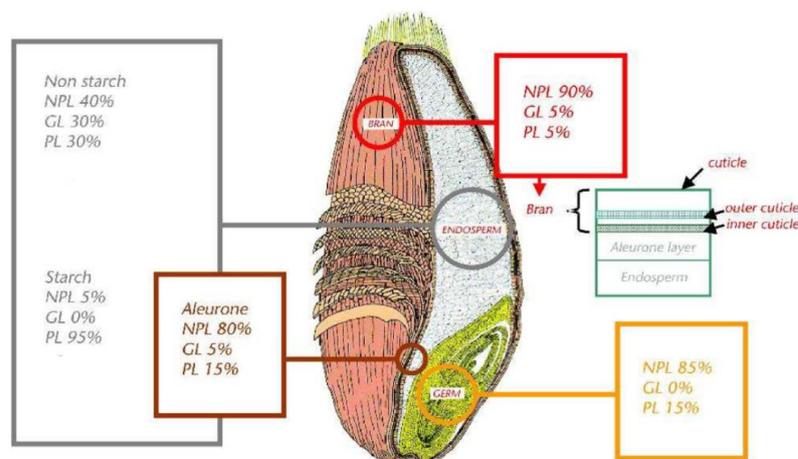


Figure 1. 12 : Composition et distribution des lipides dans le grain de blé d'après Marion et al. (2003)

3. Propriétés fonctionnelles des constituants du grain : de la première à la seconde transformation.

3.1 L'amidon

C'est essentiellement la proportion d'amylose par rapport à l'amylopectine qui détermine la nature physico-chimique des aliments amyliacés et leurs effets nutritionnels sur l'organisme humain. Ce rapport amylose/amylopectine peut-être très différent d'un cultivar de blé à l'autre.

Au cours des procédés de transformation de la farine, la structure de l'amidon subit des modifications physicochimiques lorsqu'il est soumis à un chauffage en excès d'eau. Le résultat se traduit donc par une viscosité plus ou moins importante de la suspension, la gélatinisation qui est d'autant plus importante que la proportion d'amylose est faible et dont les cinétiques sont corrélées à la teneur en eau et à la température (Miles et al., 1985). La digestibilité des amidons de céréales en nutrition humaine est conditionnée par sa gélatinisation au cours de la cuisson et par la structure de l'aliment (Singh et al., 2010). En conséquence, elle dépend avant tout du procédé de fabrication. Il a pu être démontré que plus un amidon se gélatinisait (du fait de son faible taux d'amylose) plus il était aisément hydrolysable par les alpha-amylases digestives, plus sa propension à se transformer en glucose était forte et plus la glycémie avait évidemment tendance à s'élever. Le gel d'amidon lorsqu'il refroidit, évolue vers une nouvelle réorganisation des macromolécules d'amylose et d'amylopectine, la rétrogradation qui entraîne un retour plus ou moins rapide à la structure moléculaire antérieure (Astridottenhof and Farhat, 2004). Le phénomène de rétrogradation augmente d'ailleurs avec le temps et la diminution de la température. Ceci entraîne des réarrangements des molécules d'eau et leur migration dans la mie conduisant au rassissement du pain. Par ailleurs, il a été montré que la présence de lipides, qui se complexent avec l'amylose, ralentit la rétrogradation de l'amidon. Dans certaines formulations boulangères, des monoglycérides sont ajoutés afin de ralentir ces cinétiques de rassissement (Marion et al., 2009).

3.2 Les lipides

L'hétérogénéité de la répartition histologique et subcellulaire des lipides implique que la composition en lipides des farines sera étroitement associée au procédé de fractionnement. Par conséquent, le procédé de broyage c'est à dire le taux d'extraction (présence plus ou moins importante des fractions périphériques et du germe) a non seulement un impact sur le rapport

lipides non polaires/lipides polaires mais également sur le rapport phospholipides/ glycolipides des farines.

Le caractère amphiphile des lipides polaires leur donne la propriété de s'adsorber aux interfaces air/eau ou huile/eau. L'addition d'eau permet la formation d'associations lipidiques ordonnées qui peuvent coexister selon leur caractère hydrophobe ou amphiphile sous l'une ou l'autre des formes suivantes : cristaux, phase huileuse, micelles. Lors de la formation de la pâte, des gouttelettes de lipides sont uniformément réparties dans la matrice protéique (phase globulaire) la pâte peut être assimilée à une dispersion colloïdale dans laquelle plusieurs phases sont individualisées. Aux interfaces des différents milieux, huile/eau, air/eau ou amidon/eau, se forme une phase lamellaire (agent dispersant et lubrifiant) constituée principalement de phospholipides et d'eau capable de les stabiliser. Au cours du pétrissage de la pâte et des étapes de cuisson, la quantité d'air incorporée est augmentée. Il existe une relation établie entre l'effet des lipides sur le volume du pain et leur effet sur les propriétés moussantes de la phase aqueuse de la pâte (Macritchie, 1983). Les lipides non polaires et les acides gras libres sont des agents anti-moussants et sont un frein à l'augmentation du volume du pain au cours de la cuisson. Au contraire les lipides polaires peuvent améliorer les propriétés moussantes et le volume du pain. Le transfert des vésicules lipidiques aux différentes interfaces air/eau ou huile/eau est un mécanisme clé de leur fonctionnalité. Il est contrôlé par des interactions lipides/lipides et lipides/protéines qui permettent de stabiliser des films minces formés aux interfaces air/eau (**Figure 1.13**). Cependant les lipides polaires ont tendance à déstabiliser les films de protéines rigides (film viscoélastique) aux interfaces (mécanisme de Gibbs-Marangoni (Mills et al., 2003)). Les interfaces mixtes de protéines/lipides sont intrinsèquement instables puisque les protéines et les lipides entrent en compétition au niveau de l'interface air/eau, et ainsi affaiblissent la capacité de l'autre à stabiliser (Gan et al., 1995; Marion et al., 1998; Mills et al., 2003; Sroan et al., 2009; Sroan and MacRitchie, 2009). Bien que très minoritaire, la présence de lipides interfère donc avec la formation d'un réseau de protéines viscoélastique, tandis que les protéines induisent la diffusion rapide des lipides pour restaurer des gradients de concentration dans le cas de la déformation du film.

Une autre propriété technologique des lipides sur les produits alimentaires cuits est leur capacité à moduler la texture par l'expansion des bulles de gaz lors de la fermentation et des étapes de cuisson (**Figure 1.13**). Pendant la fermentation, la levure transforme le glucose en dioxyde de carbone (CO₂) et en éthanol. Le CO₂ produit sature la phase aqueuse de la pâte puis diffuse et produit une première augmentation du volume de la pâte en formant des bulles de

gaz (Delcour and Hoseney, 2010). La matrice de gluten entoure ces bulles à la fin de la fermentation en formant un film mince stabilisant entre le gaz, les lipides polaires et les protéines tensio-actives (Gan et al., 1995). Les lipides polaires ont aussi un effet positif sur la stabilisation des bulles de gaz. Sur une farine sans lipides ou avec peu de lipides polaires (<30%), les bulles de gaz sont déstabilisées et le volume du pain est diminué, mais l'ajout de lipides polaires au-dessus du seuil naturel (>30%) entraîne le retour à un volume normal du pain.

La diffusion et la stabilité des lipides et des films formés entre les lipides et les protéines jouent un rôle important dans la préparation et la cuisson des produits transformés.

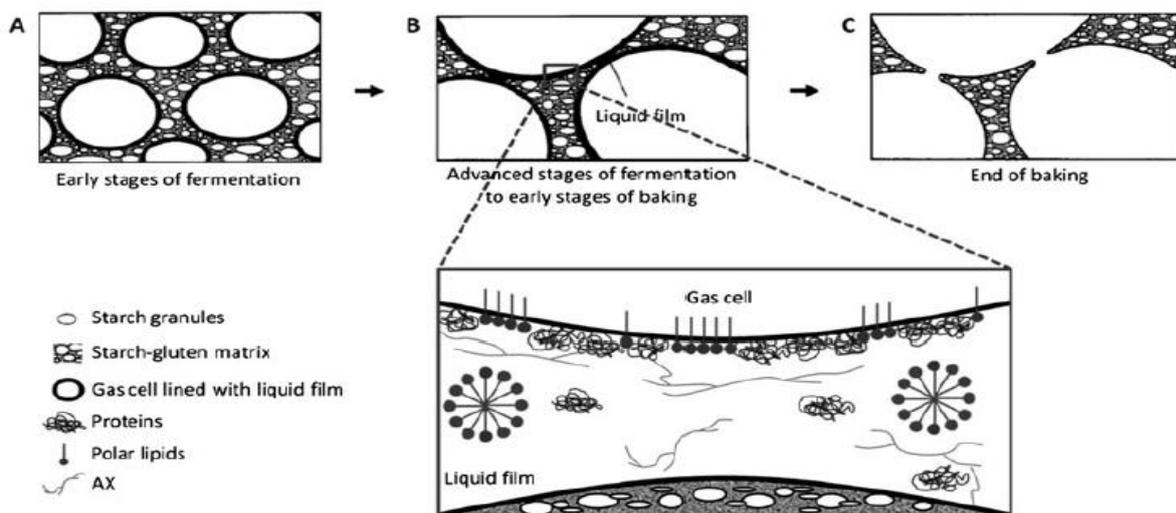


Figure 1. 13 : Transformation de la farine en pain ; hypothèse de la formation d'un film liquide
D'après (Gan et al., 1990; Gan et al., 1995; Sloan and MacRitchie, 2009).

3.3 Les protéines, réseau viscoélastique du gluten.

D'un point de vue technologique, dans toutes les applications, la pâte réalisée en mélangeant de l'eau à la farine est caractérisée par ses qualités plastiques qui sont des caractéristiques essentielles à sa levée: l'élasticité et l'extensibilité. L'élasticité est la capacité d'une pâte à être étirée et à se rétracter pour retrouver sa forme initiale et l'extensibilité est la capacité d'une pâte à s'allonger et à s'étendre sans se déchirer. Ces qualités plastiques sont dues à la présence des gliadines et gluténines qui s'associent entre elles par des liaisons intramoléculaires covalentes (ponts disulfures) et par des liaisons intermoléculaires faibles (hydrogène, hydrophobe) pour former un réseau viscoélastique, le gluten (**Figure 1.14**) (Wieser, 2007; Wieser and Kieffer, 2001). La qualité technologique des farines est essentiellement

Partie 1. Bibliographie

déterminée par la teneur et la composition en protéines de réserve. Les gliadines vont avoir tendance à influencer l'extensibilité et la viscosité du gluten et les gluténines, l'élasticité et la cohésion. Ces deux composantes donnent les propriétés viscoélastiques du gluten (Delcour and Hosoney, 2010).

Plusieurs études ont été menées pour déterminer la relation entre les protéines de réserve et la valeur d'utilisation des blés. Cette valeur d'utilisation est fonction de la teneur en protéines, de la proportion des polymères de gluténines par rapport aux monomères de gliadines et de l'état de polymérisation et du comportement agrégatif des sous unités de gluténines.

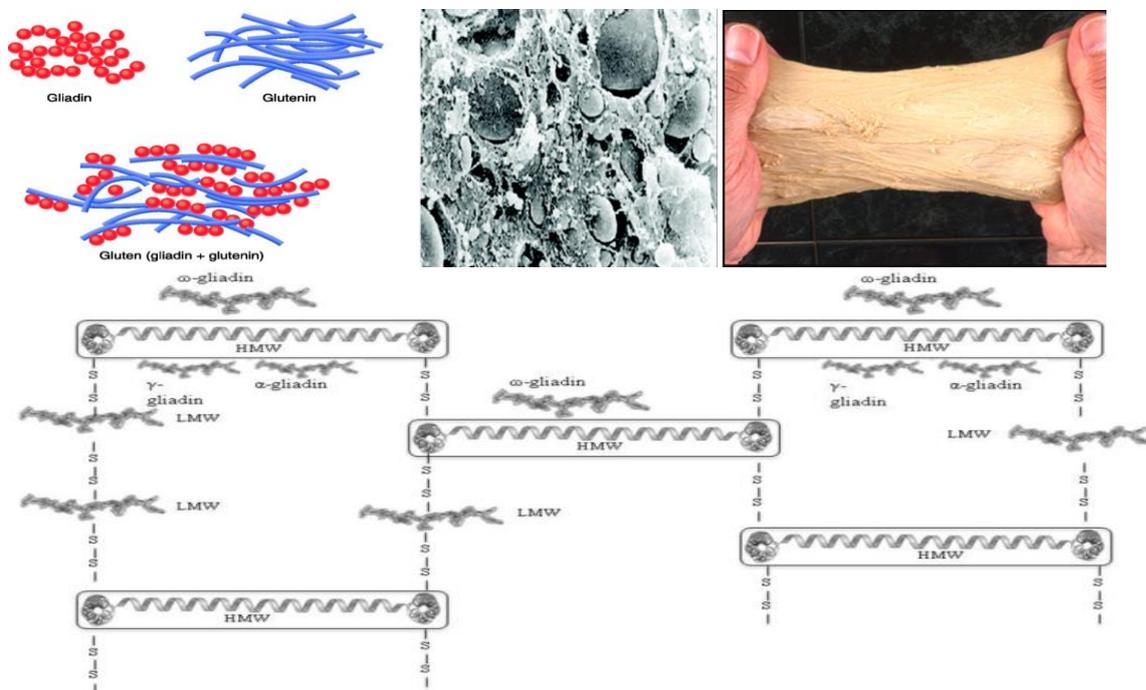


Figure 1. 14 : Réseau viscoélastique du gluten

La valeur boulangère (ou biscuitière) d'un blé est traditionnellement déterminée par la force boulangère ainsi que la quantité et la qualité des protéines. Les qualités technologiques, nutritionnelles et d'usage d'une farine dépendent donc de la sélection variétale du blé utilisé, de son taux de protéines (% MS) de sa force boulangère (W) de son taux d'hydratation. La force se mesure généralement au moyen de l'alvéographe de Chopin qui enregistre la déformation d'une pâte boulangère à 43.25% d'eau soumise à la poussée d'un volume d'air croissant jusqu'à la rupture de la bulle de pâte (**Figure 1.15**).

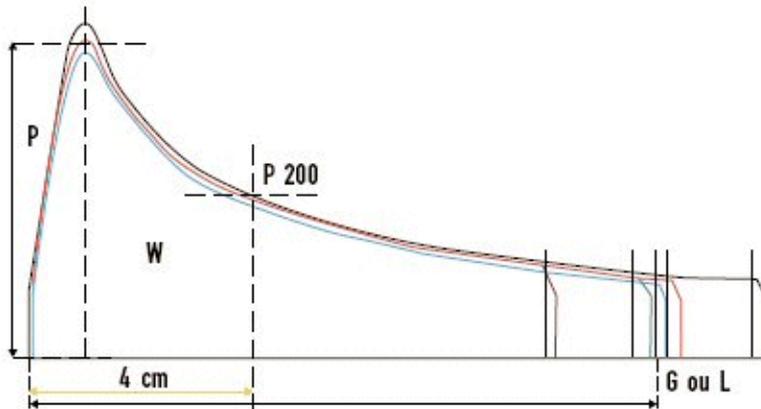


Figure 1. 15 : Diagramme alvéographe de Chopin de différents types de farine
P: ténacité .G ou L: extensibilité. W: force boulangère de la farine (surface sous la courbe), Ie: indice d'élasticité (rapport $P_{200}/P \times 100$ où P_{200} représente la pression à 4 cm du début de la courbe), P/L: rapport entre ténacité et extensibilité.

La longueur de la courbe correspond à l'extensibilité de la pâte. Elle est désignée par la lettre L. La hauteur de la courbe désignée par la lettre P (pression) représente la ténacité de la pâte, sa résistance à la déformation. Le rapport P/L traduit l'équilibre entre la ténacité et l'extensibilité de la pâte. Enfin, la surface de la courbe une fois calculée et traduite en joules est désignée par la lettre W et représente le travail associé à la déformation de la pâte et est souvent le seul paramètre retenu pour caractériser la valeur boulangère d'un blé (**Tableau 1.3**). Ces caractéristiques rhéologiques sont étroitement associées à la quantité et à la nature des protéines.

Tableau 1. 3 : La valeur boulangère en panification française définie par l'alvéographe

Force W	Indice élasticité Ie	Ténacité P	Extensibilité L	Valeur boulangère
< 150	< 35	<40	< 20	Insuffisante
150 – 180	35 – 45	40 – 60	20 – 22	Moyenne
180 – 220	45 – 55	60 – 80	22 – 24	Bonne
> 220	> 55	> 80	> 24	Elevée

4. Texture du grain et valeur d'usage des blés.

4.1 Texture du grain : dureté et vitrosité.

La texture du grain est définie par deux paramètres : la dureté et la vitrosité. La dureté du blé est définie comme la force nécessaire pour écraser les grains et est, avec la teneur en protéines, la caractéristique importante de la qualité et de la valeur marchande du blé tendre.

La dureté du blé tendre est définie par la terminologie anglo-saxonne, « hard » et « soft » afin de ne pas créer de confusion en français avec la classification botanique, blé tendre (*Triticum aestivum*) et blé dur (*Triticum durum*). La dureté du grain de blé dur étant toujours de type hard. La dureté du grain peut être mesurée par plusieurs méthodes. Directement par la mesure de la taille des particules de farine, et indirectement par spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS, Near InfraRed Spectroscopy) ou le dispositif de broyage d'un seul grain (SKCS, Single Kernel Characterisation System) (Martin CR et al., 2006)

Il faut distinguer la dureté de la vitrosité qui décrit l'apparence vitreuse de certains grains de blé. La vitrosité est un paramètre important dans la qualité des blés durs, étroitement associée à la valeur semoulière de ces blés.

4.2 Texture du grain : qualité des farines.

Dans le cas du blé hard, la surface des granules d'amidon et la matrice protéique sont étroitement associées, la fracture se produit principalement au niveau des parois situées juste au-dessous de la couche à aleurone et aboutit souvent à un niveau plus élevé d'amidon endommagé (Delcour and Hosenev, 2010). La farine de blé soft contient généralement de 2% à 4% d'amidon endommagé et la farine de blé dur 5% à 10% (Lin and Czuchajowska, 1996). La fragmentation de l'albumen est également variable dans le blé soft et le blé hard en fonction des différentes liaisons intramoléculaires entre l'amidon et la matrice protéique (Barlow et al., 1973). Les différences de liaison de la matrice protéique aux granules d'amidon sont bien visibles en microscopie électronique à balayage (MEB) sur des images de particules de farine et de granules d'amidon isolés de blé tendre (Barlow et al., 1973). La taille des particules de farine est dépendante de la dureté du blé. La farine issue de blé hard, montre typiquement une distribution de taille de particule unimodale (avec un pic autour d'environ 120 μm), tandis que la farine issue de blé soft donne une distribution de taille de particules bimodale (25 et 110 μm), avec des particules plus petites provenant des granules d'amidon libres) (Posner, 2009) (**Figure 1.16**). Le broyage du blé hard en farine endommage beaucoup l'amidon. Pour limiter ce phénomène le blé est généralement broyé en semoule grossière puis de plus en plus fine.

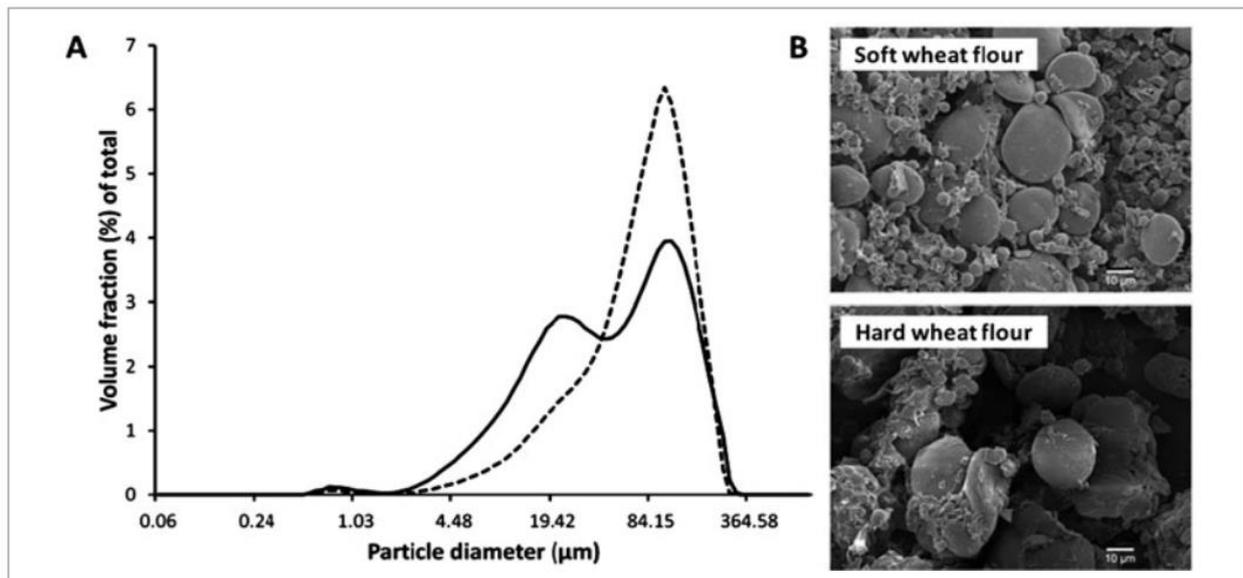


Figure 1. 16 : (A) Distribution de la taille des particules de la farine issue de cultivars de blés tendre «soft » (--) et « hard »(...). (B) Différence de taille des particules et d'adhérence aux grains d'amidon entre les deux cultivars par microscopie électronique à balayage (MEB).

4.3 Dureté : bases physicochimiques et moléculaires.

La dureté du grain de blé bien que variant en fonction des conditions environnementales, est fortement liée aux facteurs génétiques. C'est Symes en 1965 qui a démontré pour la première fois que la dureté était contrôlée par un gène majeur situé sur l'extrémité distale du bras court du chromosome 5D. Ce gène a été nommé « Hardness » locus (*Ha*) avec le phénotype soft comme dominant (Doekes and Belderok, 1976).

Plus tard Simmonds et al. (1973) ont suggéré que les constituants se trouvant à l'interface de la matrice protéique et des granules d'amidon pouvaient diminuer l'adhérence entre ces deux édifices macromoléculaires et que la dureté était fortement liée à la présence d'un groupe de protéines à cette interface, les friabilines (Greenwell and Schofield, 1986). Le séquençage de ces protéines a montré que les friabilines étaient constituées d'un mélange de protéines : les puroindolines, (protéines majoritaires), la GSP1 (Grain Softness Protein) et quelques inhibiteurs d' α -amylase (Morris et al., 1994; Oda and Schofield, 1997).

5. Les puroindolines et la texture du grain de blé tendre

5.1 Variabilité génétique.

Généralement les deux isoformes de PINs sont exprimées, les PINA (PINA-D1) et PINB (PINB-D1) et sont étroitement associées à la dureté du blé (caractère « hard » ou « soft »), (Morris, 2002).

Les gènes des PINs, *Pina-D1* et *Pinb-D1*, codant respectivement pour la PINA et la PINB font parties du locus *Ha*. Leurs régions codantes contiennent 447 paires de base (*pb*) sans introns. Les deux gènes présentent 70% d'homologie dans les régions codantes mais seulement à 50% d'homologie dans les régions non traduites en 3'. Leur expression augmente au cours du développement du grain jusqu'à 8-10 jours après floraison (JAF) atteint un maximum entre 26 et 33 DPA, décline ensuite pour s'arrêter vers 40 JAF (Gautier et al., 1994). Les PINs, comme les prolamines, s'accumulent dans les corps protéiques au cours du développement de l'albumen (Lesage et al., 2011).

Comparé à la PINA et la PINB, le gène de la GSP1, étroitement lié aux gènes *Pina-D1* et *Pinb-D1* sur le locus *Ha*, est plus faiblement exprimé dans le grain. GSP1 présente 40% d'homologie de séquence avec les PINs (Bhave and Morris, 2008a). La maturation post-traductionnelle de la GSP1 (clivages protéolytiques) a également montré que si la GSP1 et les PINS présentaient une homologie structurale la GSP1, contrairement à la PINA et à la PINB n'interagissait pas avec les lipides *in vitro* (Elmorjani et al., 2013). Il semblerait aussi que des délétions ou des variations alléliques du gène de la GSP1 n'entraînent pas de différences significatives sur la dureté du grain (Tranquilli et al., 2002).

La présence des deux isoformes PINA et PINB qualifiées de type sauvage (PINA-D1a et PINB-D1a), est associée au phénotype « soft » (Bhave and Morris, 2008a; Morris, 2002). Une mutation ponctuelle du gène *Pinb-D1*, ou une délétion du gène *Pina-D1* va entraîner une modification du phénotype soft vers le phénotype hard. Une mutation d'un seul nucléotide sur le gène *Pinb-D1* conduisant au changement d'un acide aminé glycine en sérine en position 46 (G46S ; PINB-D1b) a été la première mutation découverte ayant un impact sur la dureté (Giroux and Morris, 1998) (**Tableau 1.4**). Puis d'autres mutations en relation avec le caractère hard ont été mises en évidence comme une modification de la leucine en proline en position 60 (PINB-

D1c) (Lillemo and Morris, 2000) ou encore une mutation d'un tryptophane par une arginine en position 44 (PINB-D1d), (Morris, 2002).

Enfin il a été montré que la surexpression des allèles soft *Pina-D1* et *Pinb-D1* dans des cultivars de blé hard entraînait une diminution significative de la dureté (Bhave and Morris, 2008a) et qu'une interaction coopérative entre les deux isoformes, PINA-D1a et PINB-D1a, était associée à la diminution importante de la dureté du grain (Alfred et al., 2014).

Tableau 1. 4 : Principaux allèles *Pina-D1* et *Pinb-D1*

Puroindoline locus	Phenotype	Puroindoline	Change in DNA	Change in protein sequence
<i>Pina-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>			
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	soft	wild type	
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	hard	<i>Pina</i> null	
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	hard	<i>Pinb</i>	GGC → AGC Gly-46 to Ser-46
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	hard	<i>Pinb</i>	CTG → CCG Leu-60 to Pro-60
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	hard	<i>Pinb</i>	TGG → AGG Trp-44 to Arg-44
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1e</i>	hard	<i>Pinb</i> null	TGG → TGA Trp-39 to stop codon
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1f</i>	hard	<i>Pinb</i> null	TGG → TGA Trp-44 to stop codon
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1g</i>	hard	<i>Pinb</i> null	TGC → TGA Cys-56 to stop codon

5.2 Propriétés physico-chimiques des puroindolines.

Interactions avec les lipides.

Les résidus tryptophane et les acides aminés cationiques intercalés entre eux dans le domaine TRD, ont été proposés comme importants pour l'interaction avec les lipides et l'insertion dans la membrane (Clifton et al., 2011; Dubreil et al., 1997; Le Guernevé et al., 1998). Des interactions hydrophobes entre les résidus tryptophane et électrostatiques avec les charges positives des arginine et lysine du domaine TRD ont été observées avec les têtes polaires des phospholipides membranaires. La charge et la nature des têtes polaires des lipides ainsi que la longueur des chaînes aliphatiques semblent influencer sur l'insertion de la PINA dans les membranes (Kooijman et al., 1997.; Le Guernevé et al., 1998). La PINA possède moins de charges positives mais plus de résidus tryptophane que la PINB (moins de résidus basiques) dans son domaine TRD. Les deux PINs vont avoir un comportement d'insertion dans la membrane différent. La PINB va s'insérer plus profondément dans une monocouche de phospholipides anioniques avec des interactions électrostatiques plus fortes (Clifton et al., 2011). En présence des PC et des PE, phospholipides zwitterioniques (charge totale neutre) et des glycolipides du blé (DGDG et MGDG), comparativement à la PINB, la richesse en

Partie 1. Bibliographie

tryptophane de la PINA permet une interaction plus marquée de cette protéine avec ces lipides polaires neutres (Clifton et al., 2007a; Dubreil et al., 1997; Le Guernevé et al., 1998). Il est à noter aussi que les différences de capacité d'interaction des PINs avec les lipides peuvent être dues à un changement de conformation du domaine TRD suite à la mutation d'un seul acide aminé. Cette différence est observée avec la PINB des variétés hard présentant une modification d'une glycine en sérine ou d'un tryptophane en arginine (G46S et W44R) (Clifton et al., 2011).

Les PINs pourraient interagir plus facilement avec les micelles lipidiques (Husband et al., 1994) mais Kooijman et al. (1997.) suggèrent plutôt une interaction coopérative où la liaison avec les lipides rendrait les PINs moins hydrophobes et permettrait l'association avec d'autres lipides tels que les vésicules uni- et multilamellaires et entraînerait la formation d'une structure lipidique très agrégée (Dubreil et al., 1997). Des expériences par microscopie confocale et de force atomique ont montré que la perméabilité des membranes pourrait être due aux modifications d'interactions des PINs avec les lipides par agrégation à l'interface lipide/eau (Dubreil et al., 2003).

Propriétés tensioactives.

Les PINs s'adsorbent rapidement aux interfaces air-liquide où elles forment des films stables responsables de propriétés moussantes (Biswas et al., 2001). Ces propriétés ont un impact positif sur la qualité du pain où la formation de mousse stable est importante pour la qualité du produit fini. Des mélanges avec des taux élevés de PINs donnent des structures de mie plus homogènes avec des bulles de gaz plus fines que du pain avec des taux de PINs moyens ou faibles (Dubreil et al., 1997). Le faible pH et la force ionique élevée de ces produits affectent la conformation des PINs (Le Bihan et al., 1996), elles ne conservent pas leur structure tertiaire et l'exposition des résidus hydrophobes favorise la capacité de liaison aux lipides polaires (Douliez et al., 2000). Les lipides polaires sont préjudiciables à la formation et à la stabilité des mousses protéiques. Les PINs sont capables d'empêcher la déstabilisation de ces mousses par les lipides et peuvent, complexées avec des phospholipides, présenter des capacités de formation de mousse supérieures à la protéine seule (Dubreil et al., 1997). Ainsi la présence de lysophosphatidylcholine (LPC) améliore les propriétés de stabilisation de la mousse par les PINA indiquant un effet tensio-actif synergique du complexe LPC/PINA. La stabilité de la mousse est maximale pour un rapport molaire LPC/PINA d'environ 2/3 (Wilde et al., 1993).

Propriétés biologiques antimicrobiennes.

Le rôle biologique des PINs n'est pas très bien connu, elles pourraient avoir un rôle dans la défense des plantes ; des propriétés antifongique *in vitro* (Dubreil et al., 1997) et antibactériennes (Capparelli et al., 2005) impliquant le domaine TRD ont été décrites. La forte interaction de ce domaine avec les lipides perturberait les membranes fongiques et bactériennes (Philips et al., 2011). Charnet et al. (2003) ont proposé que les PINs aient une activité antibactérienne en formant des canaux ioniques dans les membranes. Les modifications de structure de la couche lipidique seraient liées à l'agrégation des PINs à l'interface lipides/eau.

5.3 Interactions des puroindolines en relation avec la texture du grain.

La dureté des blés a des conséquences importantes sur les qualités meunières et sur les propriétés des particules de farine pour leurs utilisations préférentielles dans les produits consommés.

Aujourd'hui il est largement admis que les PINs constituent la base génétique majeure de la dureté des blés. Des mutations dans l'un des gènes *Pina-D1* ou *Pinb-D1* ou l'absence de *Pina-D1* sont étroitement associées à une augmentation de la dureté du grain. Il est remarquable que même de petites différences dans la séquence d'acides aminés (mutations ponctuelles) aient un impact considérable sur la dureté du blé. Le mécanisme à l'origine de ces relations entre polymorphisme des PINs et la dureté du blé a fait l'objet de nombreuses recherches mais il n'est pas complètement résolu. Comme précédemment discuté, la différence de dureté des cultivars de blé provient de l'interaction entre les grains d'amidon et la matrice protéique. Cette interaction semble affectée par la présence de l'une ou l'autre des PINs et des lipides polaires situés à la surface des granules d'amidon ou par la combinaison des deux.

Les premières recherches montraient que la surface du granule d'amidon était le lieu probable du changement de structure de l'albumen (Barlow et al., 1973) du à la présence de friabilines à l'interface (Greenwell and Schofield, 1986). PINA et PINB, composant majeur des friabilines, interagissent avec les granules d'amidon d'une manière individuelle ou coopérative (Capparelli et al., 2005; Swan et al., 2006). Cependant aucun consensus n'existe sur le fait que l'une ou l'autre des isoformes limiterait la liaison de l'autre au grain d'amidon. Toutefois, il est admis que la présence des deux isoformes fonctionnelles est nécessaire pour obtenir le

caractère soft (Ziemann et al., 2008). Des études ont suggéré que les PINs joueraient un rôle dans la dureté du blé par la stabilisation de la membrane de l'amyloplaste pendant la maturation de l'albumen et au cours de la dessiccation (Feiz et al., 2009). Dans le blé hard cette stabilisation ne se fait pas ou dans une moindre mesure résultant d'un contact plus direct entre l'amidon et la matrice protéique du gluten et une texture plus dure.

Le taux plus élevé de lipides polaires à la surface des grains d'amidon isolés des blés soft est à mettre en relation avec la présence de PINs à la surface de ces grains d'amidon (Greenblatt et al., 1995). Les PINs ayant une grande affinité pour ces lipides impliquant le domaine TRD (interactions hydrophobes et ioniques), il a été suggéré que les lipides polaires et les PINs participaient au développement de la dureté du blé. Les lipides associés à la surface des granules d'amidon proviennent principalement de la membrane lipidique des amyloplastes dans lesquels l'amidon est stocké au cours du développement de l'albumen. Au cours de la dessiccation de la graine la double membrane lipidique est déstructurée (Tan and Morrison, 1979) et les reliquats membranaires sont enrichis en MGDG, DGDG et PC, lipides caractéristiques des membranes des amyloplastes (Barlow et al., 1973). Les lipides polaires pourraient déterminer la dureté des blés en interaction avec les PINs en stabilisant la membrane de l'amyloplaste au cours de la dessiccation du grain empêchant la rupture totale de la membrane lipidique. Cet effet serait plus prononcé dans les cultivars soft par la présence des deux PINs de type sauvage (PINA-D1a et PINB-D1a) qui sont plus efficaces dans la prévention de la rupture de la membrane lipidique à maturation du grain (Feiz et al., 2009; Lillemo and Morris, 2000) que dans le blé hard où la PINA-D1a est absente et/ou la PINB-D1a présente une mutation. Dans les blés hard les PINs ont une capacité de liaison aux lipides diminuée et ne peuvent pas stabiliser la membrane au cours de la dessiccation, il en résulterait un contact plus étroit et une plus forte adhérence entre les granules d'amidon et la matrice protéique. Les PINs pourraient s'insérer dans les membranes des amyloplastes avec des niveaux d'association différentes dans les blés soft ou hard (Alfred et al., 2014; Clifton et al., 2007a; Clifton et al., 2007b). Il a été suggéré dans ce sens que ces interactions contrôleraient *in planta* l'association entre grain d'amidon et les protéines, via les reliquats membranaires trouvés à cette interface (Doulliez et al., 2000; Kooijman et al., 1997). Cependant, que ce soit un effet direct ou induit par des changements de conformation, le rôle des PINs et en particulier de ses interactions avec les lipides-dans la cohésion de la matrice amylo-protéique n'est qu'une hypothèse non vérifiée *in planta* à ce jour.

L'hypothèse d'une stabilisation des membranes des amyloplastes lors de la dessiccation et de la maturation ([Feiz et al. \(2009\)](#)) est difficilement compatible avec le fait que les différences de dureté sont déjà observables à partir du quinzième jour après floraison ([Bechtel and al., 1990](#)). En effet à ce stade, l'accumulation des PINs est très faible à ce stade de développement de l'albumen par rapport à celle de l'amidon ([Bechtel et al., 1990](#); [Turnbull et al., 2003](#)). De plus, les PINs sont, à ce stade de développement, localisées, avec les protéines de réserve dans les corpuscules protéiques et les vacuoles ([Lesage et al., 2011](#)).

Il est important de souligner que les hypothèses mécanistiques qui sous-tendent le rôle des PINs sur la dureté des blés sont liées à l'analyse de la composition biochimique des amidons isolés après réhydratation et broyage des grains suivis de différentes étapes de centrifugation ([Skerritt et al., 1990](#); [South and Morrison, 1990](#)). Cette procédure est susceptible de générer des artéfacts suite à la déstructuration de la compartimentation des cellules et tissus ([Pauly et al., 2012](#)). Par ailleurs seule une faible proportion des PINs est retrouvée à la surface des grains d'amidon ([Jolly et al., 1993](#)) ce qui est confirmé par les observations en microscopie électronique à haute résolution où la majorité des PINs sont associées à la matrice protéique ([Dubreil et al., 1998](#); [Lesage et al., 2011](#)). L'impact des PINs sur la dureté dans les premiers stades de développement de l'albumen impliquerait donc un autre mécanisme. Les PINs et les protéines de réserve (gliadines et gluténines) suivent le même routage intracellulaire dans le grain. Elles sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) qui est le compartiment cellulaire essentiel pour la synthèse massive des protéines de réserve (**Figure 1.17**). Elles sont accumulées sous forme de corpuscules protéiques qui vont fusionner pour former une vacuole. La vacuole va ensuite libérer son contenu (corps protéiques) pour former la matrice protéique ([Lesage et al., 2011](#)).

Au niveau du RE un signal de stress est perçu en cas de déséquilibre entre l'accumulation massive des protéines et la machinerie de repliement, déclenchant une réponse cellulaire UPR (Unfolded Protein Response) destinée à rétablir l'homéostasie. En comparant le protéome de deux lignées quasi-isogéniques de blé avec différents génotypes en PINA (PINA-D1b, hard et PINA-D1a, soft), il a été observé que le développement du grain était lié à un stress et que la lignée hard contenait plus de protéines associées à une réponse aux stress que dans la lignée soft ([Lesage et al., 2012](#)). Cette réponse aux stress pourrait être responsable d'une mort cellulaire précoce observé au sein de l'albumen de la lignée isogénique hard. Ce plus fort niveau de stress oxydatif associé à la faible présence des PINs dans la matrice protéique dans le grain mature hard entraîne une augmentation significative de la taille des polymères des protéines

de réserve (prolamines) et par conséquent une augmentation de la dureté du grain (Lesage et al., 2011; Lesage et al., 2012). Ces résultats suggèrent donc que les PINs pourraient interagir avec les prolamines dès le début de leur synthèse.

Dans ce contexte du routage subcellulaire, plusieurs études suggèrent l'implication des interactions prolamines-puroindolines dans la texture du grain dès le début de la synthèse des protéines de réserve jusqu'à la formation de la matrice protéique où elles pourraient affecter la cohésion amidon-protéines responsable de la dureté. Au-delà de la texture du grain, les recherches menées sur les principaux acteurs biochimiques impactant la dureté du blé sont également importants dans la définition de la texture des produits céréaliers de cuisson. Aucune étude n'a encore démontré et caractérisé ces interactions. L'objectif du projet de thèse est donc de sonder et de caractériser les interactions entre ces protéines par une première approche *in vitro*. L'objectif sera d'identifier les partenaires protéiques impliqués dans ces interactions et d'en comprendre les mécanismes en explorant de nouvelles méthodes de caractérisation.

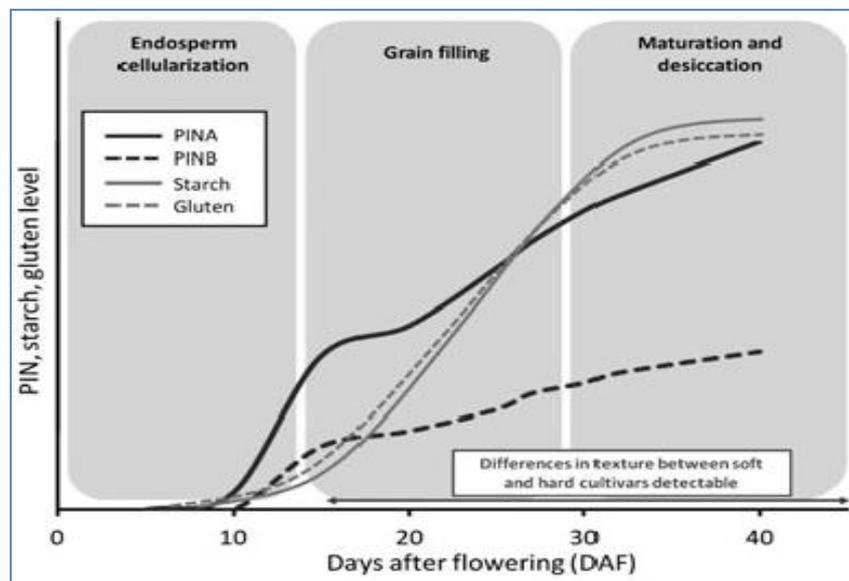


Figure 1. 17 : Accumulation des PINs, de l'amidon et des protéines de gluten au cours du développement de l'albumen de blé.

6. Références

- Alfred, R.L., E.A. Palombo, J.F. Panozzo, and M. Bhave. **2014**. The co-operative interaction of puroindolines in wheat grain texture may involve the hydrophobic domain. *Journal of Cereal Science*. 60:323-330.
- Antoine, C., V. Lullien-Pellerin, J. Abecassis, and X. Rouau. **2003**. Nutritional interest of the wheat seed aleurone layer. *Sci. Aliment*. 22:545-556.
- Astridottenhof, M., and I. Farhat. **2004**. Starch retrogradation. Plant Biotechnology, Division of Food Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham.
- Barlow, K.K., M.S. Buttrose, D.H. Simmonds, and Veski M. **1973**. Nature of starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry*. 50:443.
- Beaugrand, J., D. Crônier, P. Debeire, and B. Chabbert. **2004**. Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility. *Journal of Cereal Science*. 40:223-230.
- Bechtel, D.B., I. Zayas, L. Kaleikau, and Y. Pomeranz. **1990**. Size-distribution of wheat starch granules during endosperm development. *Cereal Chemistry*. 67:59-63.
- Bekkers, A.C., A. Van Dijk, E. de Boef, E. Van Swieten, G. Robillard, and R.J. Hamer. **1996**. HMW glutenins: structure–function relationships step by step. *In* In Gluten 96-Proc. 6th Int. Wheat Gluten Workshop, Sydney, North Melbourne, Australia: Royal Australian Chemical Institute. 190-194.
- Bettge, A., and C.F. Morris. **2000**. Relationships among grain hardness, pentosan fractions, and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry*. 77:241-247.
- Bhave, M., and C.F. Morris. **2008a**. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant molecular biology*. 66:205-219.
- Bhave, M., and C.F. Morris. **2008b**. Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications. *Plant molecular biology*. 66:221-231.
- Biswas, S.C., L. Dubreil, and D. Marion. **2001**. Interfacial behaviour of wheat puroindolines: monolayers of puroindolines at the air-water interface. *Coll. Polym. Sci*. 279:607–614.
- Blochet, J., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.-F. Gautier, P. Joudrier, M. Pezolet, and D. Marion. **1993**. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *Federation of European Biochemical Societies*. 329:336-340.
- Bordes, J., G. Branlard, F.X. Oury, G. Charret, and F. Balfourier. **2008**. Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection. *Journal of Cereal Science*. 48:569-579.
- Branlard, G. **2009**. Les bases génétiques et l'utilisation des marqueurs associés à l'amélioration de la qualité des blés. *Cah Agric*. 18.
- Buléon, A., P. Colonna, and V. Leloup. **1990**. Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales. *IAA juin 1990*:515-532.
- Capparelli, R., M.G. Amoroso, D. Palumbo, M. Iannaccone, C. Faleri, and M. Cresti. **2005**. Two plant puroindolines colocalize in wheat seed and in vitro synergistically fight against pathogens. *Plant Mol Biol* 58:857-867.
- Carceller, J.L., and T. Aussenac. **2001**. Size Characterisation of Glutenin Polymers by HPSEC-MALLS. *Journal of Cereal Science*. 33:131-142.
- Charnet, P., M. Molle, D. Marion, M. Rousset, and V. Lullien-Pellerin. **2003**. Puroindolines Form Ion Channels in Biological Membranes. *Biophysical journal*. 84.
- Clifton, L., M. Lad, R. Green, and R. Frazier. **2007a**. Single amino acid substitutions in puroindoline-b mutants influence lipid binding properties. *Biochemistry*. 46:2260-2266.
- Clifton, L., M. Sanders, A. Hughes, C. Neylon, R. Frazier, and R. Green. **2011**. Lipid binding interactions of antimicrobial plant seed defence proteins: puroindoline-a and beta-purothionin. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. 13:17153-17162.
- Clifton, L.A., R.J. Green, and R.A. Frazier. **2007b**. Puroindoline-b Mutations Control the Lipid Binding Interactions in Mixed Puroindoline-a : Puroindoline-b Systems. *Biochemistry*. 46:13929-13937.

- Day, L., D.L. Bhandari, S.A. Leonard, and J.D. Schofield. **2006**. Characterisation of wheat puroindoline proteins. *Federation of European Biochemical Societies*. 273:5358-5373.
- Delcour, J.A., and R.C. Hosney. **2010**. Principles of cereal science and technology. *St. Paul, MN: AACC International*.
- Doekes, G.J., and B. Belderok. **1976**. Kernel hardness and baking quality of wheat: a genetic analysis using chromosome substitution lines. *Euphytica*,. 25:565-576.
- Douliez, J.P., T. Michon, K. Elmorjani, and D. Marion. **2000**. Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. *Journal of Cereal Science*,. 32:1-20.
- Dubreil, L., J.P. Compoin, and D. Marion. **1997**. Interaction of Puroindolines with Wheat Flour Polar Lipids Determines Their Foaming Properties. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*,. 45:108-116.
- Dubreil, L., T. Gaborit, B. Bouchet, D. Gallant, W. Broekaert, L. Quillien, and D. Marion. **1998**. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and a non-specific lipid transfer protein (ns-LTPe1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci*. 138:121-135.
- Dubreil, L., V. Vie, S. Beauvils, D. Marion, and A. Renaud. **2003**. Aggregation of Puroindoline in Phospholipid Monolayers Spread at the Air-Liquid Interface. *Biophysical Journal*,. 85:2650–2660.
- Elmorjani, K., N. Geneix, M. Dalgalarondo, G. Branlard, and D. Marion. **2013**. Wheat grain softness protein (Gsp1) is a puroindoline-like protein that displays a specific post-translational maturation and does not interact with lipids. *Journal of Cereal Science*,. 58:117-122.
- FAOSTAT. **2010**. Data on production quantity of cereals all over the world in 2010. . Available from: <http://faostat.fao.org>. Accessed 2015 December 10.
- Feiz, L., H.W. Wanjugi, C.W. Melnyk, I. Altosaar, J.M. Martin, and M.J. Giroux. **2009**. Puroindolines co-localize to the starch granule surface and increase seed bound polar lipid content. *Journal of Cereal Science*. 50:91-98.
- Finnie SM, Jeannotte R, and Faubion JM. **2009**. Quantitative characterization of polar lipids from wheat whole meal, flour, and starch. *Cereal Chemistry*. 86:637-645.
- Finnie, S.M., R. Jeannotte, C.F. Morris, and J.M. Faubion. **2010**. Variation in polar lipid composition among near-isogenic wheat lines possessing different puroindoline haplotypes. *Journal of Cereal Science*. 51:66-72.
- Gan, Z., R.E. Angold, M.R. Williams, P.R. Ellis, J.G. Vaughan, and T. Galliard. **1990**. The microstructure and gas retention of bread dough. *Journal of Cereal Science*. 12:15-24.
- Gan, Z., P.R. Ellis, and J.D. Schofield. **1995**. Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*. 21:215-230.
- Gautier, M.-F., M.-E. Aleman, A. Guirao, D. Marion, and P. Joudrier. **1994**. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant molecular biology*. 25:43-57.
- Gilbert, S.M., N. Wellner, P.S. Belton, J.A. Greenfield, G. Siligardi, P.R. Shewry, and A.S. Tatham. **2000**. Expression and characterisation of a highly repetitive peptide derived from a wheat seed storage protein. *biochimica and biophysica acta*. 1479.
- Giroux, M.J., and C.F. Morris. **1998**. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95:6262-6266.
- Greenblatt, G.A., A.D. Bettge, and C.F. Morris. **1995**. Relationship between endosperm texture and the occurrence of friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem*. 72:172-176.
- Greenwell, P., and J.D. Schofield. **1986**. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. . *Cereal Chem* 63:379-380.
- Hizukuri, S. **1985**. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*. 141:295-306.
- Husband, F., D.J. Wilde, D. Marion, and D.C. Clark. **1994**. Comparison of the foaming and interfacial properties of two related lipid-binding proteins from wheat in the presence of a competing surfactant. In: *Dickinson E, Lorient D, editors. Food macromolecules and colloids*. London, UK: Royal Society of Chemistry:285-297.

- Jolly, C.J., S. Rahman, Kortt A.A., and T.J.V. Higgings. **1993**. Characterisation of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 86.
- Kooijman, M., R. Orsel, M. Hessing, R.J. Hamer, and A. Bekkers. **1997**. Spectroscopic characterisation of the lipid-binding properties of wheat puroindolines. *Journal of Cereal Science*. 26:145-159.
- Le Bihan, T., J.E. Blochet, A. Desormeau, D. Marion, and M. Pezolet. **1996**. Determination of the Secondary Structure and Conformation of Puroindolines by Infrared and Raman Spectroscopy. *Biochemistry*. 35:12712-12722.
- Le Guernevé, C., M. Seigneuret, and D. Marion. **1998**. Interaction of the Wheat Endosperm Lipid-Binding Protein Puroindoline-a with Phospholipids. *Archives of biochemistry and biophysics* 360:179–186.
- Lemelin, E., G. Branlard, L. Salvo, V. Lein, T. Aussenac, and J. Daydé. **2005**. Breadmaking stability of wheat flours: Relation between mixing properties and molecular weight distribution of polymeric glutenins. *Journal of Cereal Science*. 42:317-326.
- Lesage, V.S., B. Bouchet, L. Rhazi, K. Elmorjani, G. Branlard, and D. Marion. **2011**. New insight into puroindoline function inferred from their subcellular localization in developing hard and soft near-isogenic endosperm and their relationship with polymer size of storage proteins. *Journal of Cereal Science*. 53:231-238.
- Lesage, V.S., M. Merlino, C. Chambon, B. Bouchet, D. Marion, and G. Branlard. **2012**. Proteomes of hard and soft near-isogenic wheat lines reveal that kernel hardness is related to the amplification of a stress response during endosperm development. *Journal of experimental botany*. 63:1001-1011.
- Lillemo, M.C., and C.F. Morris. **2000**. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 100:1100-1107.
- Lin, P.Y., and Z. Czuchajowska. **1996**. Starch Damage in Soft Wheats of the Pacific Northwest. *Cereal Chem*. 73.
- Macritchie, F. **1983**. The role of lipids in baking. *Lipids in Cereal Technology, PJ Barnes, ed., Academic Press, New York*:165-188.
- Manley D., Pareyt B., and Delcour J.A. **2011**. Wheat flour and vital wheat gluten as biscuit ingredient. *In: Manley D, editor. Manley's technology of biscuits, crackers and cookies. Cambridge, UK:Woodhead Publishing*:109.
- Marion, D., J.P. Douliez, and A. Rossignol-Castera. **2009**. Agents émulsifiants. *In In: Béatrice De Reynal , Jean-Louis Multon , Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires, Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Cachan, FRA : Tec et Doc. . 451-492.*
- Marion, D., L. Dubreil, and J.P. Douliez. **2003**. Functionality of lipids and lipid-protein interactions in cereal-derived food products. *In Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Vol. 10. 47-56.*
- Marion, D., L. Dubreil, P.J. Wilde, and D.C. Clark. **1998**. Lipids, lipid-protein interaction and the quality of cereal products. *In: Interactions in Cereal Products, K Hoseney, RJ Hamer, eds, AACC, Saint-Paul, Minnesota*:131-167.
- Martin CR, Rousser R, and Brabec DL. **2006**. Development of a single-kernel wheat characterization system. *Transact. ASAE*. 36:1399-1404.
- Matzke, K., and M. Riederer. **1990**. The composition of the cutin of the caryopses and leaves of *Triticum aestivum* L. *Planta*. 182:461-466.
- Miles, M.J., V.J. Morris, P.D. Orford, and S.G. Ring. **1985**. The role of amylose and amylopectine in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*. 135:271-281.
- Mills, E.N.C., P. Wilde, L.J. Salt, and P. Skeggs. **2003**. Bubble formation and stabilization in bread dough. *Food Bioprod Process*. 81:189-193.
- Morris, C.F. **2002**. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant molecular biology*. 48:633-647.
- Morris, C.F., G.A. Greenblatt, A.D. Bettge, and H.I. Malkawi. **1994**. Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *Journal of Cereal Science*. 20:167-174.
- Morrison, W.R. **1978**. Wheat lipid composition. *Cereal Chemistry*. 55:548-558.

Partie 1. Bibliographie

- Morrison, W.R. **1988**. Lipids. In: Wheat chemistry and Technology Y. Pomeranz, . Vol. 1, ed, AACC, St-Paul, Minnesota 373-439.
- Oda, S., and J.D. Schofield. **1997**. Characterisation of friabilin polypeptides. *Journal of Cereal Science*. 26:29-36.
- Pauly, A., N. De Brier, B. Pareyt, E. Fierens, and J.A. Delcour. **2012**. Impact of starch granule associated proteins and lipids on wheat starch functional properties. *Communications in agricultural and applied biological sciences*. 77:39-43.
- Pérez, S., and E. Bertoft. **2010**. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke*. 62:389-420.
- Philips, R.L., E.A. Palombo, J.F. Panozzo, and M. Bhawe. **2011**. Puroindolines, Pin alleles, hordoindolines and grain softness proteins are sources of bactericidal and fungicidal peptides. *Journal of Cereal Science*. 53:112-117.
- Posner, E.S. **2000**. Wheat. In: Kulp K, Ponte JGJ, editors. *Handbook of cereal science and technology*. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc:1-.
- Posner, E.S. **2009**. Wheat flour milling. In: Khan K, Shewry PR, editors. *Wheat: chemistry and technology*. St. Paul, MN, USA: AACC International:119.
- Shewry, P.R. **2009**. Wheat. *Journal of experimental botany*. 60:1537-1553.
- Shewry, P.R., N.G. Halford, P.S. Belton, and A.S. Tatham. **2002**. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 357:133-142.
- Shewry, P.R., A.S. Tatham, J.M. Field, B.G. Fords, J. Clark, P. Gallois, C. Marris, N. Halford, J. Fords, and M. Kreis. **1988**. The Structures of Barley and Wheat Prolamins and their Genes. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*. 183:117-127.
- Simmonds, D.H., K.K. Barlow, and C.W. Wrigley. **1973**. Biochemical basis of grain hardness in wheat. . *Cereal Chem* 50:553-562.
- Singh, J., A. Dartois, and L. Kaur. **2010**. Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21:168-180.
- Skerritt, J.H., A.J. Frend, L.G. Robson, and P. Greenwell. **1990**. Immunological homologies between wheat gluten and starch granule proteins. *Journal of Cereal Science*. 12:123-136.
- South, J.B., and W.R. Morrison. **1990**. Isolation and analysis of starch from single kernels of wheat and barley. *Journal of Cereal Science*. 12:43-51.
- Sroan, B., S. Bean, and F. MacRitchie. **2009**. Mechanism of gas cell stabilization in bread making. I. The primary gluten starch matrix. *Journal of Cereal Science*. 49:32-40.
- Sroan, B., and F. MacRitchie. **2009**. Mechanism of gas cell stabilization in breadmaking. II. The secondary liquid lamellae. *Journal of Cereal Science*. 49:41-46.
- Surget, A., and C. Barron. **2005**. Histologie du grain de blé. *Industrie des Céréales*. 145:3-7.
- Swan, C.G., F.D. Meyer, A.C. Hogg, J.M. Martin, and M.J. Giroux. **2006**. Puroindoline b limits binding of puroindoline a to starch and grain softness. *Crop Sci*. 46:1656-1665.
- Symes, K. **1965**. Inheritance of grain hardness in wheat as measured by particle size index. *Aust J Agric Res* 16:113-123.
- Tan, S.L., and W.R. Morrison. **1979**. Distribution of lipids in the germ, endosperm, pericarp and tip cap of amylomaize, Lg-11 hybrid maize and waxy maize. *J Am Oil Chem Soc*. 56:531-535.
- Tasleem-Tahir, A., I. Nadaud, C. Girousse, P. Martre, D. Marion, and G. Branlard. **2011**. Proteomic analysis of peripheral layers during wheat (*Triticum aestivum* L.) grain development. *Proteomics*. 11:371-379.
- Tranquilli, G., J. Heaton, O. Chicaiza, and J. Dubcovsky. **2002**. Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Sci*. 42:1812-1817.
- Turnbull, K., and S. Rahman. **2002**. Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science*. 36:327-337.
- Turnbull, K.M., D. Marion, T. Gaborit, R. Appels, and S. Rahman. **2003**. Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta*. 216:699-706.
- Urry, D.W. **1988**. Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics. *J. Protein Chem*. 7:1-34.

Partie 1. Bibliographie

- Van den Bulck, K., K. Swennen, A.-M.A. Loosveld, C.M. Courtin, K. Brijs, P. Proost, J. Van Damme, S. Van Campenhout, A. Mort, and J.A. Delcour. **2005**. Isolation of cereal arabinogalactan-peptides and structural comparison of their carbohydrate and peptide moieties. *Journal of Cereal Science*. 41:59-67.
- Wieser, H. **2007**. Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*. 24:115-119.
- Wieser, H., W. Bushuk, and F. MacRitchie. **2006**. The polymeric glutenins. *In: Wrigley, C., Bekes, F., Bushuk, W. (Eds.), Gliadin and Glutenin: the Unique Balance of Wheat Quality*. :113-240.
- Wieser, H., and R. Kieffer. **2001**. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. *Journal of Cereal Science*. 34:19-27.
- Wilde, P.J., D.C. Clark, and D. Marion. **1993**. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline a lipid binding protein isolated from wheat flour. *J. Agric. Food Chem*. 41:1570-1576.
- Ziemann, M., A. Ramalingam, and M. Bhave. **2008**. Evidence of physical interactions of puroindoline proteins using the yeast two-hybrid system. *Plant science : an international journal of experimental plant biology*. 175:307-311.

Partie 2. Matériels et Méthodes

1. Extraction et purification des protéines

1.1. Les puroindolines

Les deux isoformes de puroindolines, PINA et PINB utilisées ont été extraites et purifiées à partir de trois variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*) récoltées en 2013 et fournies par SECOBRA Recherches (Maule, France) pour la variété Paléodor, INRA (le Rheu, France) pour la variété Récital et Groupe Soufflet (Corbeil, France) pour la variété Courtot (**Tableau 2.1**). Une partie du travail a impliqué l'utilisation de lignées transgéniques surexprimant la PINA dans le fond génétique Courtot (blé hard) qui ont été fournies par Pierre Barret (UMR INRA, Génétique et écophysiologie des céréales, Clermont-Ferrand).

Tableau 2. 1: Variétés de blé tendre utilisées

Variété	Locus		Phénotype	Puroindoline	Mutation sur l'ADN	Mutation sur la séquence protéique
	PINA	PINB				
Paléodor	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Soft	Wild type		
Récital	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	Hard	<i>Pinb</i>	GGC→AGC	Gly-46 en Ser-46
Courtot	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	Hard	<i>Pinb</i>	TGG→AGG	Trp-44 en Arg-44

Ces protéines sont extraites et purifiées à partir de farine de blé des 3 variétés en utilisant la méthode de partition de phase au Triton X-114 et des techniques de chromatographies. Deux méthodes d'extraction et de purifications ont été utilisées, la méthode 1 d'après Bloch et al. (1993) la méthode 2 d'après Day et al. (2006) auxquelles ont été apportées quelques modifications.

Extraction par partition de phase

Les PINs sont des protéines hydrophobes qui ont une grande affinité pour le Triton X-114, détergent hydrophobe non ionique. Le Triton X-114 est homogène et forme en solution des petites micelles à des températures inférieures à 22° C (point de trouble). Au-delà de cette température de transition, on observe une séparation de phase conduisant à une phase inférieure riche en détergent et une phase supérieure pauvre en détergent. Les protéines présentant de fortes affinités pour les détergents se retrouvent dans la phase inférieure. Ce partage de phase a été initialement développé pour séparer les protéines membranaires les plus hydrophobes (présence de segments transmembranaires) des protéines hydrophiles dans des extraits cellulaires (Bordier, 1981). Appliquée au blé, cette méthode s'est avérée efficace pour extraire et isoler les PINs des farines et certaines γ -gliadines (Bloch et al., 1993).

Méthode 1

2 Kg de farine sont obtenus en broyant les grains dans l'azote liquide (Broyeur cryogénique Fritsch, Analysette 3, Spartan, Allemagne). La farine est délipidée par mise en suspension dans de l'acétone (2 h) puis dans du dichlorométhane (48 h). La farine séchée est ensuite mélangée deux heures à 4°C dans 10 litres de tampon d'extraction (0,1 M TRIS-HCl, 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,8) contenant 4% de Triton X-114 (w/w). Après centrifugation (10 000 x g, 20 min) le surnageant est récupéré et chauffé à 30° C pendant 30 min sous agitation douce puis centrifugé (10 000 x g, 10 minutes). La phase supérieure est éliminée par aspiration, la phase inférieure riche en Triton X-114 est prélevée et de l'acétone est ajouté (rapport 1/5, v/v) à -20° C pendant 24 h afin de précipiter les protéines. Après centrifugation (3000 x g, 10 min) le culot protéique est lavé 4 fois par de l'acétone pour éliminer les lipides et le détergent. Le culot protéique est dispersé dans de l'eau distillée, congelé et lyophilisé.

Méthode 2

500 g de farine sont obtenus en broyant les grains avec le broyeur cryogénique. La farine est ensuite mélangée 1 h à 4° C dans 2,5 L litres de tampon d'extraction PEK (Phosphate de sodium 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH = 7,5) puis centrifugée à 4° C (10 000 x g, 20 min). Le surnageant contenant les protéines solubles est éliminé et le culot est repris par 1,2 L du même tampon PEK, dans lequel est ajouté 4% de Triton X-114 (w/w), et mis sous agitation 2 h à 4° C. Après centrifugation (13 000 x g, 10 min) le surnageant est récupéré et le pH ajusté à 4,5 avec de l'acide acétique glacial. 24 g de Carboxymethyl cellulose (CMC, Cellulose CM 52 Whatman) sont ajoutés au surnageant contenant le Triton X-114 et la solution est mélangée pendant 24 h à 4° C puis déposée dans une colonne. Le gel est rincé par une solution d'acide acétique 0,05 M ; cette fraction représente la fraction enrichie en PINA. Le gel est ensuite rincée avec de l'acide acétique 0,05 M contenant 1 M NaCl ; cette fraction représente la fraction enrichie en PINB. Du NaCl (concentration finale 4 M) est ensuite ajouté à la fraction enrichie en PINB. Après 1 heure d'agitation et centrifugation à 10° C (25 000 x g, 1 h), le culot contenant la PINB est repris dans 0,05 M d'acide acétique (40 mL) et dialysé contre 0,05 M d'acide acétique (2 x 5 L) pendant 48 h puis lyophilisé. La fraction enrichie en PINA subit une précipitation à l'acétone comme décrit dans la méthode 1 afin d'éliminer le triton X114.

Purification des deux isoformes PINA et PINB

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC, Size Exclusion Chromatography)

La fraction protéique lyophilisée (37 g) dans la première méthode d'extraction, est dispersée dans une solution d'acide acétique 50 mM pH 3,6 puis centrifugée (20 000 x g, 30 min). La fraction soluble est ensuite déposée en deux fois sur une colonne de chromatographie gel filtration (100 cm x 5 cm) remplie par un gel de Sephadex G50 (Pharmacia, France) et les protéines sont éluées par une solution d'acide acétique 50 mM à un débit de 2 mL. min⁻¹. Les fractions éluées sont contrôlées par SDS-PAGE, regroupées et dialysées contre de l'eau distillée puis lyophilisées. Une fraction contient les PINs et une fraction contient des gliadines (enrichies en γ -gliadines). Ces protéines lyophilisées ainsi que celles issues de la deuxième méthode d'extraction sont ensuite purifiées en combinant successivement une chromatographie d'échange de cations avec une colonne remplie d'un gel SP Sépharose Fast Flow (80 mL, GE Healthcare, France), puis une chromatographie liquide (HPLC) semi-préparative sur colonne phase inverse (25 cm x 1 cm), NUCLEOSIL® 300-5 C4 (taille des particules 5 μ m, taille des pores 300 Å, Macherey-Nagel, France).

Chromatographie d'échange de cations.

Le gel d'échange de cations contient un polymère d'agarose (Sépharose) greffé avec des ions négatifs (groupes sulfopropyles (SP) O-CH₂-CH₂-CH₂-SO₃⁻) permettant d'utiliser les propriétés cationiques des PINs et de les fixer par leurs charges positives.

5 g de la fraction protéique sont dissous dans 70 mL d'acétate d'ammonium 50 mM pH 6,5 contenant 20% d'acétonitrile (tampon A) et déposés sur la colonne préalablement équilibrée avec le tampon A. Les protéines sont ensuite éluées à 3 mL. min⁻¹, par un gradient linéaire de 0 à 70% de tampon B (0,7 M acétate d'ammonium pH 6,5 20% d'acétonitrile) en 250 min, puis de 70 à 100% de tampon B en 50 min. Les fractions sont contrôlées par SDS-PAGE et celles contenant la PINA et la PINB sont regroupées et lyophilisées.

Chromatographie HPLC par phase inverse

5 à 10 mg de protéines sont injectés sur la colonne (25cm x 1cm) préalablement équilibrée avec une solution contenant 80 % de solvant A (H₂O, acide trifluoroacétique (TFA) 0,11%) et 20% de solvant B (acétonitrile, TFA 0,09%). L'éluion s'effectue à un débit de 3 mL. min⁻¹ à 40° C par un gradient linéaire de 20 à 45% de solvant B en 35 minutes. La détection UV des protéines

est réalisée à 214 nm et 280 nm par un détecteur spectrophotométrique couplé à la sortie de colonne (Gilson). Ce gradient est utilisé pour la purification des PINs et des γ -gliadines.

1.2. Les gliadines

Extraction des gliadines totales

Les gliadines totales sont extraites à partir de 500 g de farine de blé Récital obtenues en broyant les grains dans le broyeur cryogénique. La farine est délipidée pendant une heure par mise en suspension dans 2,5 L d'acétone à température ambiante sous agitation puis filtrée sur un entonnoir muni d'un verre fritté (porosité 0). L'opération est renouvelée une fois avec 2 L d'acétone puis la farine mise en suspension dans 2 L de dichlorométhane pendant 12 h. La farine est ensuite séchée sous flux d'air. Les protéines solubles sont éliminées en mélangeant la farine à 2 L de tampon d'extraction 0,1 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA pH 7,8 à 4° C pendant 1 h. Après centrifugation à 8000 x g le culot est lavé à l'eau osmosée puis remis en suspension dans 2 L d'une solution à 70% éthanol/30% eau (v/v). La solution est agitée 1 h 30 à 4° C. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 8000 x g pendant 15 min puis réduit à d'environ 600 mL par évaporation de l'éthanol dans un évaporateur rotatif. Les gliadines totales contenues dans cette solution sont ensuite précipitées par 3 L d'acétone à -20° C pendant 24 h. Le culot protéique est récupéré après décantation et lavé à l'eau osmosée avant d'être congelé et lyophilisé.

Extraction et purification des γ -gliadines.

Les γ -gliadines sont extraites par la méthode de partage de phase et purifiées par chromatographie d'exclusion de taille suivi d'HPLC en phase inverse (voir paragraphe 1.1.).

Extraction et purification des α -gliadines

Le fractionnement et la purification des α -gliadines à partir des gliadines totales ont été effectués par le « plateau purification de protéines » du laboratoire. Les gliadines totales sont extraites à partir d'un gluten délipidé de blé Récital. Pour la délipidation 660 g farine sont mélangés dans 3 L d'acétone 2 h à température ambiante sous agitation (filtration frittée porosité 1), puis 2,5 L de dichlorométhane 12 h (filtration frittée porosité 0) et séchés. Le gluten est extrait manuellement sous un mince filet d'eau osmosée afin d'éliminer l'amidon et les fibres. Le gluten (661 g-91.2% MS) est dispersé dans 3,96 L d'une solution aqueuse d'éthanol à 70% sous agitation pendant 3 h. Après centrifugation (10 000 x g, 30 min), le surnageant est

Partie 2. Matériels et Méthodes

dialysé 3 fois contre de l'eau osmosée puis 2 fois contre de l'acide acétique 0,05% à 4° C puis les protéines sont lyophilisées.

Les α -gliadines sont ensuite purifiées par des techniques successives de chromatographie d'échanges d'ions et d'exclusion de taille. Le schéma de purification est donné dans la **Figure 2.1**.

2.1.

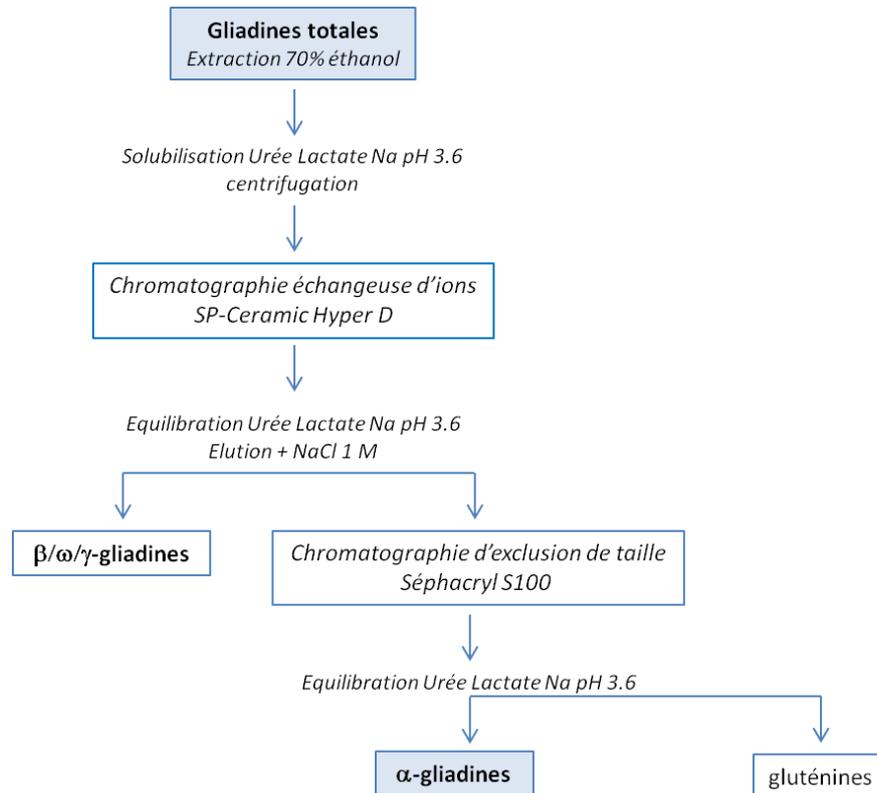


Figure 2. 1: Schéma de purification des α -gliadines

2. Méthodes de contrôle

Les fractions protéiques sont contrôlées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), HPLC analytique en phase inverse et par spectrométrie de masse.

Les concentrations des solutions de protéines pures utilisées sont déterminées par spectrophotométrie UV. La mesure de densité optique est faite à $\lambda = 280$ nm (maximum d'absorption des tryptophanes et tyrosines) et la concentration est calculée par la loi de Beer-Lambert : $DO = \varepsilon * l * C$; C étant la concentration molaire (M) ou en masse ($g \cdot L^{-1}$) de la protéine, ε le coefficient d'extinction molaire et l le trajet optique en cm. Le coefficient d'extinction molaire (ε) théorique utilisé pour la PINA est $2,3 \cdot g \cdot L^{-1} \cdot cm^{-1}$ (ou $31105 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) et celui pour la PINB $2,6 \cdot g \cdot L^{-1} \cdot cm^{-1}$ ($32470 M^{-1} \cdot cm^{-1}$).

2.1. Analyse par électrophorèse

Les électrophorèses sont réalisées avec le système AE-6500 Dual Mini Slab (ATTO, Nh-bio, France).

SDS-PAGE.

Cette méthode en conditions dénaturantes par l'ajout de SDS, permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire (Laemmli, 1970). Le SDS est un détergent anionique fort qui se lie aux protéines par sa chaîne hydrocarbonée (interactions hydrophobes) et empêche leur repliement en leur conférant une charge nette négative et en dissociant les agrégats reliés par liaisons ioniques ou hydrophobes. L'ajout de β -mercaptoéthanol si besoin dans les échantillons permet de rompre les liaisons covalentes inter-cysteines et donc de réduire les polymères reliés par liaisons disulfure.

La séparation des protéines est réalisée en gel d'acrylamide SDS-PAGE à 15 % (gel de séparation) et 6% (gel de concentration). 10 μ L des fractions obtenues en sortie de chromatographie sont diluées dans 10 μ L de tampon de solubilisation (TRIS-HCl 120 mM pH 6,8, SDS 4%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,04%, β -mercaptoéthanol 0.1 M) et chauffées à 100° C pendant 5 minutes. 20 μ L des échantillons sont déposés et l'électrophorèse est réalisée à 10 mA par gel pendant 20 minutes puis à 20 mA par gel pendant environ 90 minutes dans le tampon de migration (TRIS 25 mM, SDS 0.1%, glycine 192 mM). Les protéines séparées dans le gel sont ensuite fixées et colorées.

Electrophorèse acide

L'électrophorèse acide (acid-PAGE) permet de séparer les protéines en fonction de leur taille mais aussi de leur charge. Le pH dans ce système est de 3 et toutes les protéines sont chargées positivement ($pH_i > 3$ pour les protéines). Deux protéines de taille similaire mais de charge différente vont être séparées ce qui n'est pas le cas dans une électrophorèse SDS-PAGE, ces deux méthodes d'électrophorèse sont donc complémentaires pour l'analyse de protéines ayant des caractéristiques assez proches. De l'urée peut être rajoutée dans le gel et l'échantillon pour dissocier d'éventuels agrégats.

Les protéines en solutions (10 μ L) sont diluées dans une solution 25 mM acide acétique, 6 M urée, et 20% glycérol (v/v). Les protéines sont séparées à pH 3. Le gel de séparation est un mélange de 12% acrylamide et de 1,2% de bis-acrylamide préparé dans une solution contenant

Partie 2. Matériels et Méthodes

2 M urée, 0.1% acide ascorbique, 0,014% sulfate ferreux et 0,8% acide acétique, et polymérisé par H₂O₂ (0.0025%). Les protéines sont ensuite séparées pendant 45 min sous un courant de 250 V avec comme tampon pour la cathode 25 mM d'acide acétique et tampon pour l'anode 45 mM d'acide acétique.

Fixations et colorations

Bleu de Coomassie R250/G250

Coloration classique

Après migration, les protéines sont fixées (précipitation pour éviter la diffusion dans le gel) et colorées 30 min sous agitation dans une solution contenant 40% éthanol, 10% acide acétique et 0,25% de bleu de Coomassie R250 ou G250. L'excès de colorant ayant diffusé dans le gel, est ensuite éliminé par une solution contenant 30% éthanol et 5% acide acétique afin de ne visualiser que les bandes de protéines (gel transparent et bandes de protéine colorées au Bleu). Le G250 est une suspension colloïdale avec une limite de détection plus basse que celle du R250 de l'ordre de 10 ng de protéines.

Coloration rapide

Cette méthode de coloration est réalisée d'après ([Lawrence and Besir, 2009](#)). Le gel contenant les protéines est placé dans 100 mL d'eau osmosée et chauffé aux micro-ondes pendant 30 secondes (puissance maximum) puis mis sous agitation 3-5 minutes. Cette opération est renouvelée deux fois. La solution de coloration contenant 0,01% bleu de Coomassie G250 et 0,1% HCl est ajoutée dans le bac contenant le gel (10 mL). Le gel est chauffé aux micro-ondes 10 secondes puis mis sous agitation pendant 15 à 30 min, les bandes de protéines commencent à apparaître dès 1 minute. L'excès de colorant est éliminé par rinçage à l'eau osmosée.

Nitrate d'argent

Cette méthode est réalisée selon une modification de la méthode de [Blum et al. \(1987\)](#). Les protéines sont fixées pendant 1 h dans une solution d'eau ultra-pure contenant 40% d'éthanol et 10% d'acide acétique. Les gels sont ensuite lavés 2 fois 20 minutes dans une solution contenant 30% d'éthanol puis dans de l'eau pendant 20 minutes. La sensibilisation est réalisée dans une solution de thiosulfate de sodium à 0,02%. Après 3 lavages de 20 secondes dans de l'eau ultra pure les gels sont placés dans une solution de nitrate d'argent à 0,1% pendant 20 minutes. Trois lavages de 20 s dans l'eau sont effectués de nouveau avant

révélation de la coloration par une solution de carbonate de sodium à 3% et 50 μL de formaldéhyde à 37%. Pour arrêter la révélation de la coloration, les gels sont lavés 20 secondes puis placés dans de l'acide acétique à 1% pendant 5 minutes. Cette coloration très sensible permet de détecter des concentrations proches du ng.

2.2. Analyse par Western Blot

Les protéines, préalablement séparées par électrophorèse, sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 μm sous l'action d'un champ électrique (45 min à 2,5 mA/cm²) dans un tampon de transfert (TRIS 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1% et éthanol 20%). Les zones de la membrane non-occupées par des protéines sont saturées pendant 1 h avec 10 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) contenant 5% de lait écrémé. L'excès de lait est éliminé par 2 lavages de 10 min avec du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (PBST). 10 mL d'une solution d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques de la protéine, dilués dans du PBST contenant 0.5% de lait écrémé (PBSTL), sont ajoutés sur la membrane pendant 1 h sous agitation. Après 4 lavages de 10 min au PBST, une solution d'anticorps de chèvre anti-lapin ou anti-souris couplés à la peroxydase, diluée au 1 :50 000 dans du PBSTL, est mise en contact avec la membrane pendant 1 h. La membrane est ensuite lavée 2 fois 10 min avec du PBST et 2 fois 10 min avec du PBS. La membrane est finalement séchée et recouverte de 4 mL de substrat chemiluminescent (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, 34076, Pierce, USA) pendant 5 min puis séchée. Les anticorps couplés à la protéine d'intérêt sont détectés par un appareil Luminescent Image Analyzer LAS 3000 (Fujifilm).

2.3. Dosage par ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilise, la possibilité d'adsorber à la surface d'un plastique des antigènes (protéines) et, la possibilité de coupler une enzyme à l'anticorps pour révéler, à l'aide d'un substrat chemiluminescent, le complexe antigène anticorps. L'échantillon est adsorbé sur le plastique puis révélé par un anticorps spécifique qui lui-même sera révélé par un anticorps secondaire couplé à une enzyme. Cette technique permet de doser la PINA ou PINB de blé. Ce protocole s'applique aussi bien au dosage des PINA ou PINB purifiées que présentes dans des extraits protéiques complexes.

100 μL de dilutions de protéines standards (PINA ou PINB) à une concentration de 20 à 400 ng. mL⁻¹ sont adsorbés sur une plaque de microtitration en polystyrène à fond plat

(Maxisorp, Nunc, Kamstrup, Danemark) dans du PBS pendant 60 min à température ambiante. 100 μ L de 3 à 4 dilutions d'échantillons (la quantité est estimée et doit se situer entre les deux points extrêmes de la gamme de protéine standard) sont également adsorbés. Après 4 lavages avec du PBS contenant 0,05% de Tween 20 (PBS-Tween) les anticorps monoclonaux (100 μ L/puit) spécifique PINA ou PINB, dilués dans du PBS-Tween contenant 0,5% de lait écrémé (PBS-Tween-Lait), sont ajoutés pendant 60 min. Après 4 lavages avec du PBS-Tween, 100 μ L d'anticorps anti-souris couplés à la peroxydase, dilués au 1/3000 dans du PBS-Tween-Lait, sont ajoutés dans chaque puit. La révélation colorimétrique est effectuée après 2 lavages avec du PBS-Tween et 2 lavages avec du PBS. 100 μ L de solution de révélation (0,04% O-PhenyleneDiamine dilués dans 0,05 M tampon citrate pH 5,5 et 0,02% H₂O₂) sont ajoutés pendant 30 min à l'obscurité. La révélation est arrêtée par 50 μ L d'acide sulfurique 2 M. L'absorbance est enregistrée à 490 nm.

2.4. Analyse par HPLC en phase inverse

L'analyse HPLC des différentes fractions protéiques a été réalisée sur un système Waters Alliance (Millford, USA). Les protéines sont injectées à un débit de 1 mL.min⁻¹ sur une colonne ACE 10 C18-PFP (250 x 4.6 mm) équilibrée à une température de 40° C et avec 73% de solvant A (H₂O, acide trifluoroacétique-TFA 0,11%) et 27% de solvant B (acétonitrile, TFA 0,09%). L'élution est réalisée en augmentant le gradient d'acétonitrile (solvant B) de 27% à 42% en 20 min. Le système est couplé à un spectrophotomètre aux deux longueurs d'ondes à 214 et 280 nm (modèle 2487, Waters).

2.5. Analyse par spectrométrie de masse

La pureté des protéines et leur masse moléculaire a été contrôlée par un spectrophotomètre à trappe d'ions équipé sous pression atmosphérique d'une source d'ionisation par électrospray (Electro-Spray Mass Spectrometer (ESI-MS), LCQ Advantage, Thermo-Finnigan, San José, USA). Cette source permet de volatiliser les protéines à l'aide d'un capillaire sous haute tension (3500 V). Ce champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Cette étape permet de faire passer les protéines d'un état de matière condensée à un état gazeux et de les ioniser. Pour détecter les ions positifs (i.e.

les molécules protonées), une tension positive est appliquée sur le capillaire (« ESI mode positif »). Les spectres ESI présentent un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+zH]^{z+}$, où M correspond à la masse molaire de la molécule analysée, et z au nombre de charges portées par cette molécule ionisée. La masse M est déterminée par la déconvolution du spectre et sa transformation en une courbe masse/intensité. Par exemple pour 2 pics successifs de rapport M/z mesuré sur le spectre, m_1 et m_2 (avec $m_1 = m_2 + 1 = m + 1$), et de charge z_1 et z_2 (avec $z_1 = z_2 + 1 = z + 1$) ; les deux équations suivantes sont connues ;

$$m_1 = (M + z) / z$$

$$m_2 = (M + z + 1)$$

on déduit de ces deux équations ;

$$z = (1 - m_2) / (m_2 - 1)$$

et la masse est

$$M = (m_1 z) - z$$

Les protéines purifiées sont solubilisées dans 50% d'acétonitrile contenant 0.5% acide formique et injectées en continue à $5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Les mesures donnent un spectre d'absorbance relative en fonction de l'échelle m/z entre 500 et 2000 qui permettent de calculer les masses molaires des protéines.

3. Méthodes de caractérisation des interactions protéines-protéines.

3.1. Dynamic Light Scattering (DLS).

La diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering) est une technique rapide non invasive pour déterminer la taille des protéines en solution et qui permet donc de détecter la présence d'agrégats (Malvern, 2008).

C'est une technique de caractérisation basée sur la mesure des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée au cours du temps à un certain angle par l'échantillon (illuminé par un laser) c'est-à-dire sur le mouvement Brownien des particules de l'échantillon en solution. Le mouvement Brownien est le déplacement temporel au hasard des particules colloïdales soumises à l'agitation thermique des molécules de solvant. La vitesse de déplacement des particules est définie par D, le coefficient de diffusion translationnel. Les fluctuations enregistrées étant fondamentalement hasardeuses, comme le mouvement Brownien qui leur donne naissance aucune prédiction de signal à long terme ne peut être faite à partir de la connaissance du signal à l'instant t. Par contre le signal est évidemment parfaitement corrélé avec lui-même à l'instant t. Entre ces deux limites (corrélations parfaite pour t=0 et nulle pour

$t=\infty$), on peut comparer le signal initial à celui obtenu aux instants $t + \delta t$, $2\delta t$, $3\delta t$, etc. Cette mesure est effectuée par un corrélateur qui compare les résultats et les quantifie par un coefficient de corrélation variant entre 1 pour $t = 0$ et 0 pour $t = \infty$. Les valeurs de δt vont de la nanoseconde à la microseconde. Le résultat est présenté par un corrélogramme (**Figure 2.2**).

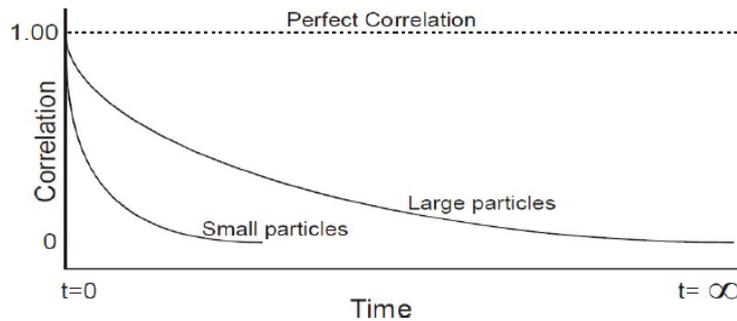


Figure 2. 2: Corrélogrammes typiques pour un échantillon.
Le taux de décroissance de la fonction de corrélation est lié à la taille des particules et est beaucoup plus rapide pour les petites particules.

Fonctions d'autocorrélation

A partir du corrélogramme le corrélateur établit une fonction d'autocorrélation de l'échantillon étudié à partir de l'équation suivante,

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta e^{-2Dt q^2 \tau}$$

τ , délai de temps, β , coefficient de corrélation, q , vecteur diffusant (montage optique), Dt , coefficient de diffusion translationnel.

La fonction d'auto-corrélation est proportionnelle au déplacement moyen carré des particules, lié au coefficient de diffusion translationnel Dt ,

$$Dt = kT/f$$

kT , énergie d'activation thermique des particules, f , coefficient de frottement.

La loi de Stokes-Einstein donne la valeur de f pour les particules sphériques,

$$f = 6 \pi \eta r$$

r , rayon des particules, η , coefficient de viscosité dynamique du solvant.

Elle permet de définir le rayon hydrodynamique (R_H) à partir de la relation suivante (relation de Stokes-Einstein),

$$Dt = kT/6 \pi \eta r$$

Cette relation est valable dans le cas de particules/molécules monodisperses. Pour le cas de particules polydisperses, c'est-à-dire quand la distribution de masses molaires donc de coefficients de diffusion est non négligeable, chaque espèce possède sa propre fonction d'auto-corrélation et la fonction d'auto-corrélation globale sera une courbe décroissante à allure exponentielle. Donc pour un échantillon avec plusieurs distributions de taille (mélange de particules/polymères de différentes tailles ou mélange de particules de tailles très voisines) et donc de polydispersité (Pdi) élevée, la fonction d'auto-corrélation est la somme de fonctions exponentielles. La détermination de la taille est obtenue à partir d'une dé-convolution de la fonction d'auto-corrélation à l'aide de différents algorithmes mathématiques. Il existe deux approches, 1) ajustement d'une seule exponentielle (analyse des cumulants) pour obtenir un rayon hydrodynamique moyen, 2) une estimation de la largeur de distribution (indice de polydispersité) et donc d'une somme de fonctions exponentielles simples. Le terme de polydispersité est dérivé de l'indice de polydispersité, paramètre calculé à partir de l'analyse des cumulants ([Malvern, 2010](#)). Dans l'analyse des cumulants une taille de particule unique (distribution Gaussienne) est supposée et un ajustement exponentiel unique est appliqué à la fonction d'auto-corrélation bien que la distribution puisse être la moyenne de plusieurs tailles de particules. Le coefficient de variation Pd%, est le plus souvent utilisé en DLS. En règle générale, les échantillons avec Pd% < 20% sont considérés comme monodisperses ;

$$PDI = \sigma^2 / Z_D^2$$

Z_D , taille Z moyenne (moyenne des cumulants), σ , coefficient de déviation standard de la distribution Gaussienne

Les facteurs qui influencent la taille hydrodynamique des protéines sont le poids moléculaire de la molécule, la conformation de la molécule et aussi l'état natif ou agrégé de la protéine. Selon [Malvern](#) (2009), les protéines sont très généralement de forme sphérique et les agrégats aussi (**Figure 2.3**). La distribution en taille est basée sur les rapports des intensités, ce qui écrase la représentation des plus petites particules puisque l'intensité diffusée varie avec la taille à la puissance 6 (approximation de Rayleigh). Le calculateur peut, si nécessaire, ramener la distribution à une représentation en volumes, plus réaliste car la variation avec la taille est alors à la puissance 3 (volume d'une sphère = $4 / 3 \pi r^3$) (**Figure 2.4**).

Dans le cas d'une distribution multimodale (ex. présence de monomères et d'agrégats) les résultats sont souvent biaisés en faveur des éléments de grande taille (l'intensité de diffusion

est proportionnelle au rayon moléculaire à la puissance 6), ce qui rend la technique idéale pour détecter la présence de petites quantités d'agrégats.

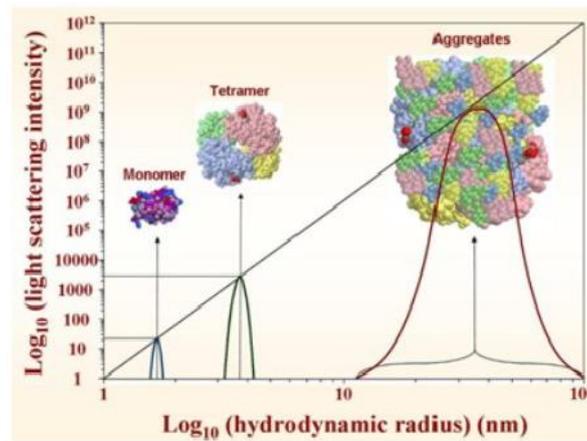


Figure 2. 3 : Intensité diffusée vs rayon hydrodynamique (R_H)
De différentes conformations de protéines.

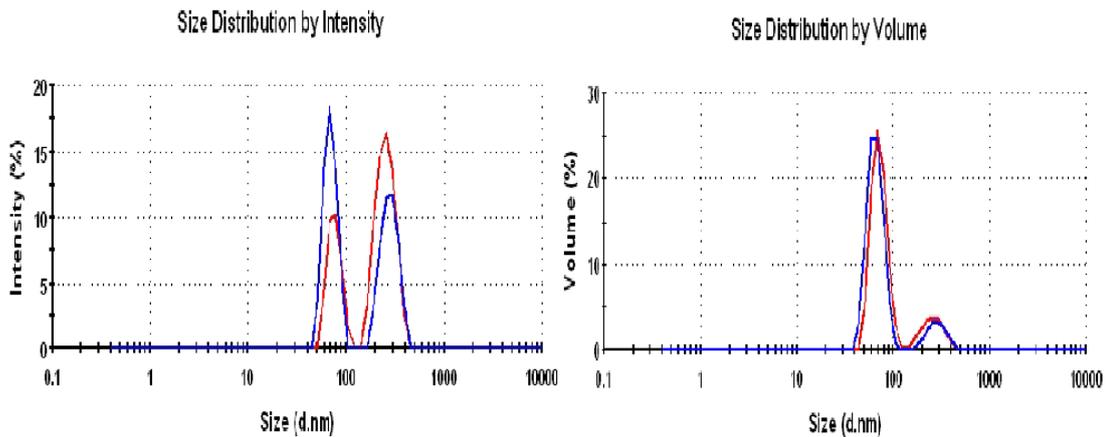


Figure 2. 4 : Distribution de taille en intensité et en volume
de deux populations de taille de protéines.

La DLS est réalisée avec un appareil Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK) équipé d'une lampe laser à hélium de longueur d'émission 632,8 nm et l'angle de détection est de 173°. Pour analyser la dépendance entre l'intensité de lumière diffusée et le rayon hydrodynamique (R_H) des particules au cours du temps, la distribution des particules de protéines est mesurée à température fixe (25° C). Les solutions sont diluées dans une cuve de 1 x 1 cm (Brand, France) et la mesure est effectuée pendant 30 s. Les distributions de particules sont calculées par les différents algorithmes fournis par le constructeur (Malvern Zetasizer Software v6.34).

Les PINs lyophilisées sont solubilisées dans 20 mM de tampon phosphate à pH 7,2, pH 5,5 ou pH 9,0 et analysées à une concentration de 0,5 g. L⁻¹. La concentration de la solution est calculée en mesurant la densité optique à 280 nm avec un spectrophotomètre UV (Perkin Elmer Lambda 2)-(voir le paragraphe 2, méthodes de contrôle). Les mélanges PINA / PINB sont préparés en mélangeant des solutions PINA et PINB dans un tampon phosphate pour obtenir le rapport approprié et la concentration en PINs finale de 0,5 g. L⁻¹. Au moins cinq mesures pour chaque échantillon sont prises pour évaluer la répétabilité. Le principe des mesures est montré dans la **Figure 2.5**.

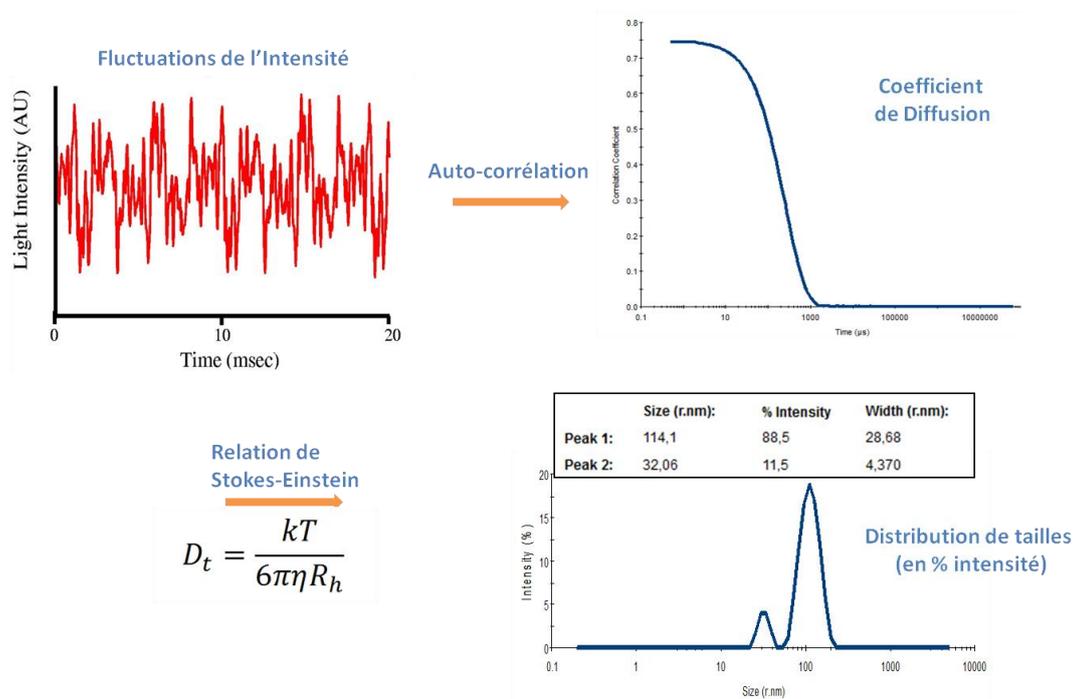


Figure 2.5 : Résumé du principe de fonctionnement de la DLS

A partir de fluctuations de l'intensité lumineuse le Coefficient de Diffusion Translationnel est calculé et permet de déterminer le Rayon Hydrodynamique (R_h) ainsi que la polydispersité (Pdi) de l'échantillon. Les grosses particules diffusent plus lentement que les particules plus petites et un indice de polydispersité élevé indique une grande variabilité dans l'échantillon de la taille des particules.

3.2. Laser Light Diffraction

La diffraction laser (Laser Light Diffraction) est utilisée comme technique granulométrique pour les tailles des particules trop grandes pour la détermination par DLS, allant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs millimètres.

La diffraction laser mesure les distributions granulométriques des particules en mesurant la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un

échantillon de particules dispersées. Les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles par rapport au faisceau laser et les petites particules diffusent la lumière à des angles supérieurs (voir ci-dessous). Les données relatives à l'intensité diffusée en fonction de l'angle sont analysées pour calculer la taille des particules qui ont créé l'image de diffraction et ceci grâce à la théorie de Mie. La taille des particules représente par le diamètre de la sphère équivalente, ayant même volume que la particule. La diffraction laser utilise la théorie de diffusion de la lumière de Mie pour calculer la distribution granulométrique des particules sur la base d'un modèle sphérique équivalent en volume. La théorie de Mie suppose que les propriétés optiques de l'échantillon mesuré et du dispersant (indices de réfraction) soient connus.

La diffraction de la lumière est mesurée avec un appareil Mastersizer S (Malvern Instruments, UK). Les solutions sont diluées dans une cuve contenant 15 ml d'eau osmosée. Les indices de réfraction utilisés sont 1.33 pour l'eau et 1.45 pour les protéines.

3.3. Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4).

L'AF4 est une technique séparative de la famille des FFF (Field Flow Fractionation) qui pourrait se traduire par « séparation fluïdique par force appliquée » pour laquelle la force appliquée est aussi un flux liquide et dont la forme du canal n'est pas asymétrique d'où l'appellation de AFFFF (Asymmetrical flow field-flow fractionation, AF4).

Cette technique est réalisée dans un plan de liquide très fin sur lequel est appliqué un champ de force perpendiculaire (**Figure 2.6**). Le flux chromatographique et l'échantillon sont confinés dans un canal défini par deux plaques séparées par un joint dont l'épaisseur est comprise entre 0,1 et 0,5 mm. La plaque supérieure est étanche alors que la plaque inférieure est constituée d'un fritté recouvert d'une membrane d'ultrafiltration (typiquement avec un seuil de coupure de 10 kDa). Cette membrane empêche l'échantillon de passer au travers de la plaque inférieure tout en permettant la traversée de liquide. L'élution dans le canal se faisant en régime laminaire il s'établit un profil parabolique des vitesses dans l'épaisseur du canal, la vitesse étant plus importante au centre que près des bords. Lorsque le flux perpendiculaire (de haut en bas) est appliqué l'échantillon est alors plaqué sur la membrane inférieure appelée aussi « mur d'accumulation » (**Figure 2.6**). Le phénomène de diffusion de l'échantillon (dû au mouvement Brownien) crée une force de contre-réaction. Les particules les plus petites qui possèdent une diffusion plus forte atteignent une position d'équilibre plus haut dans l'épaisseur du canal où la vitesse est plus élevée que les particules les plus grosses qui sont plus proches du mur

d'accumulation. Ainsi un tri par taille s'effectue dans l'épaisseur du canal et grâce au profil de vitesses les particules sont séparées en fonction de leur taille. Les plus petites particules étant transportées plus vite vont donc éluer avant les plus grosses à l'inverse de la chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC).

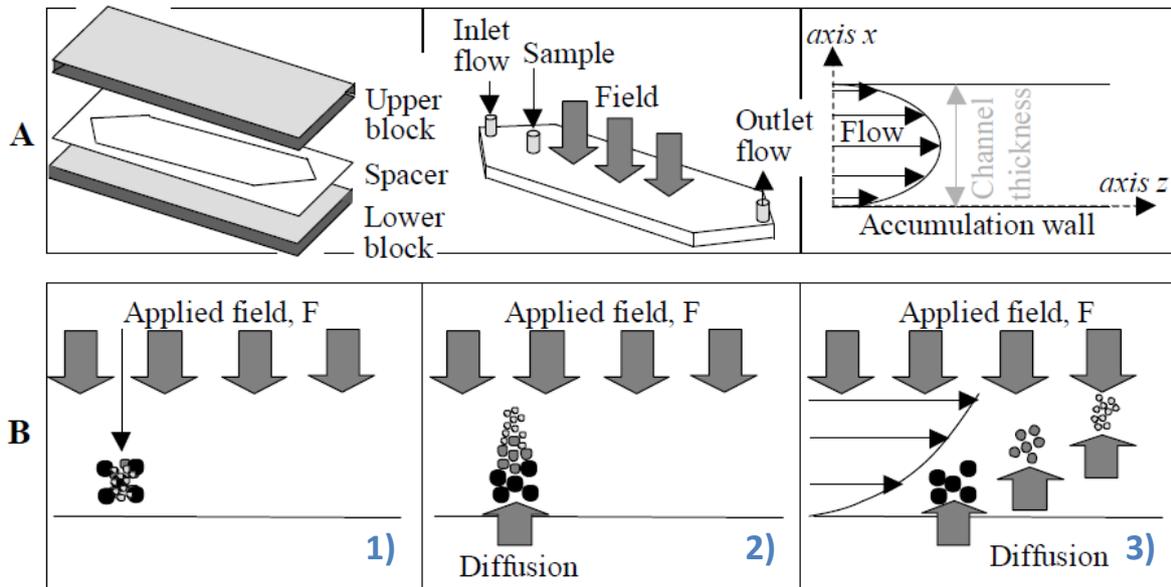


Figure 2.6 : Schéma de principe du processus séparatif dans le canal de l'AF4.

Le processus séparatif comprend 3 étapes (**Figure 2.6**). 1) Lors des deux premières étapes, injection relaxation, le flux éluant est partagé et arrive dans le canal par le port d'entrée et le port de sortie formant un point de rencontre proche du port d'injection. A cet endroit il est donc dirigé vers le bas et passe au travers de la membrane. L'échantillon est alors injecté et se trouve confiné dans cette zone. 2) Après injection de l'échantillon cet état est maintenu quelques minutes. Cette étape est appelée relaxation car l'équilibre entre la force perpendiculaire et la force de diffusion (du au mouvement Brownien) de l'échantillon s'établit. 3) Lors de la dernière étape, dite d'élution, le flux éluant entre uniquement par le port d'entrée et ressort par le port de sortie qui est connecté aux détecteurs. La fuite régulée sous le fritté et permettant l'existence d'une force perpendiculaire est conservée afin de maintenir chaque population dans son profil de vitesse. Les différents constituants sont alors séparés en fonction de leur taille et caractérisés par un détecteur à diffusion de lumière multi-angulaire MALLS et par un détecteur de concentration placé en aval.

Dans cette technique de séparation, il n'y a pas de phase stationnaire (comme dans l'HPSEC) qui pourrait interagir avec l'échantillon et le retenir partiellement ou totalement, ni de

forces de cisaillement qui pourraient le dégrader. On peut ainsi réaliser des séparations sur des échantillons de très hautes masses molaires qui auraient été exclus d'une colonne SEC ou simplement retenus lors de l'étape de filtration préalable à l'injection.

Le système AF4 est constitué du canal asymétrique, d'une boucle d'injection, d'une pompe à éluant fournis par Consensus (Ober-Hilbersheim, Allemagne). La géométrie du canal est trapézoïdale avec une longueur de 286 mm, la largeur à l'entrée et à la sortie de 21,2 et 4,7 mm, respectivement. Un joint en polyester de 350 μm , une membrane de cellulose (seuil de coupure = 10 kDa) saturée par du polyéthylène glycol (PEG) sont utilisés (Charlotte, NC). L'échantillon est introduit dans le canal à l'aide de la boucle d'injection de 100 μL (Valco Instruments Co., Inc., Houston, TX). Les deux détecteurs en ligne sont un instrument de diffusion de la lumière laser multi-angle (MALLS) DawnMD Heleos[®] équipé d'une cellule d'écoulement de K5 et un laser à gaz, ($\lambda = 658 \text{ nm}$), (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, Californie) et un réfractomètre DRI-10A (Shimadzu, Kyoto, Japon). Avant utilisation, le tampon (20 mM ou 100 mM sodium phosphate pH 7,2, 0,2 g. L⁻¹ azide) est soigneusement dégazé et filtré sur filtre 0,1 μm en PVDF (Millipore Millex GV). Les solutions de protéines ($\sim 1 \text{ mg. mL}^{-1}$) sont injectées directement dans le système.

Le débit d'entrée du tampon dans le canal F_{in} (**Tableau 2.2**) est de 1 mL. min⁻¹. Le courant transversal (F_c) est fixé à 2 mL. min⁻¹, et le débit du canal de sortie (Flow out, F_{out}) à 0,4 mL. min⁻¹. L'échantillon est injecté dans le canal d'entrée (Flow in, F_{in}) à un débit de 0,2 mL. min⁻¹ pendant 60 s. Après injection, la pompe est arrêtée et une période de 415 s de relaxation de l'échantillon est appliquée. L'élution des petites molécules est réalisée à 0,7 mL. min⁻¹ dans le canal F_{out} , et à un F_c à 3,5 mL. min⁻¹ pendant 800 s, après quoi, F_{out} est maintenu à 0,7 mL. min⁻¹ pendant 925 s sans courant transversal (F_c). Pour l'élution des particules de taille plus élevées, le procédé décrit précédemment par [Rolland-Sabate et al.](#) (2007) est testé en utilisant un tampon phosphate 100 mM pH 7,2, 0,2 g. L⁻¹ azide comme éluant. F_{out} est fixé à 1 mL. min⁻¹, et F_c est réduit de 0,4 à 0 mL. min⁻¹ en 400s, après quoi F_{out} est maintenu et F_c est arrêté pendant 925 s (**Tableau 2.2**).

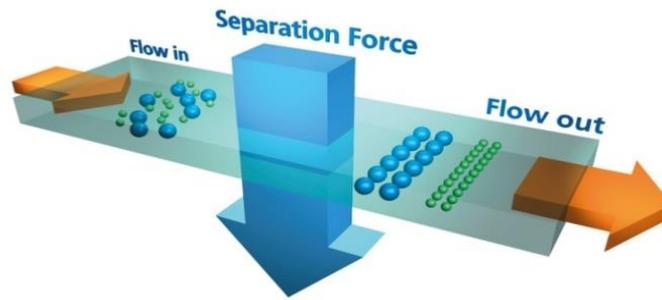


Tableau 2. 2: Programmes utilisés pour la séparation en AF4 des petites et grosses molécules

Petites molécules	Temps (s)	F in mL.min ⁻¹	F out mL.min ⁻¹	F c mL.min ⁻¹	Grosses molécules	Temps (s)	F in mL.min ⁻¹	F out mL.min ⁻¹	F c mL.min ⁻¹
Rinçage		1	0,4	2	Rinçage		1	0,4	2
Injection	0	1	0,4	2	Injection	0	1	0,4	2
	60	1	0,4	2		60	1	0,4	2
Relaxation	61				Relaxation	61			
	465					465		1	0,4
Elution	466	1	0,7	3,5	Elution	865		1	0
	1265	1	0,7	3,5		1890		1	
Rinçage	1266	1	0,7		Rinçage				
	2190	1	0,7						

Le pourcentage de recouvrement de l'échantillon est calculé en effectuant le rapport masse éluée (déterminée avec l'indice de réfraction du signal DRI)/masse injectée (déterminée par l'absorbance à 280 nm).

Les masses molaires (N , W) et la dispersité (w/n) sont déterminées en utilisant le logiciel ASTRA® de Wyatt Technology Corporation (version 6.1 pour PC) comme décrit précédemment par [Rolland-Sabate et al. \(2007\)](#). Une valeur de $0,168 \text{ mL.g}^{-1}$ est utilisé comme incrément de l'indice de réfraction (dn/dc) et la normalisation des photodiodes est réalisée en utilisant une faible quantité de pullulane de masse molaire (P20). Les distributions de taille (R_H) sont déterminées à l'aide des courbes de temps d'éluion et l'étalonnage des volumes comme décrit par [\(Rolland-Sabate et al., 2014\)](#). L'étalonnage de l'AF4 est effectué au moyen de l'équation suivante:

$$\frac{t^0}{t_{ri}} \approx \frac{6 D_i V^0}{F_c w^2}$$

qui est utilisée pour déterminer le coefficient de diffusion translationnel D_i de la période i , en fonction de la théorie AF4 dans le mode de fonctionnement normal, dans lequel les petites particules sont éluées en premier.

t_{ri} , le temps de rétention (temps d'éluion) de la période i , t^0 , le temps mort (27,1 s), V_0 le volume géométrique du canal (0,922 mL), w l'épaisseur du canal (256 μm).

R_H est déterminée ensuite en utilisant l'équation Stokes -Einstein (cf paragraphe DLS).

3.4. Chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC).

Le système HPSEC est constitué d'une colonne et d'une chaîne HPLC (Waters, Milford, USA), comprenant un passeur d'échantillon (Waters 717), une pompe binaire HPLC (Waters 1525), un détecteur de longueur d'onde double (Waters 2487) piloté par le logiciel Breeze. La colonne (1 cm x 42 cm) est remplie avec un gel Bio-Gel®A 1.5 m (Biorad, France) de gamme de fractionnement 10 000 à 1 500 000 Daltons

Le tampon d'éluion utilisé est un sodium phosphate 20 mM pH 7,2 contenant 0,1 M NaCl, préalablement filtré (0,22 μm , Millex-GV, Millipore, France) et dégazé. Les analyses HPSEC des PINs sont réalisées en injectant 0,05 mL de solutions à 0,5 mg. mL⁻¹ à un débit de 0,2 mL. min⁻¹. Une double détection des protéines à 280 nm (tyrosine et tryptophane) et 214 nm (liaison peptidique) est réalisée. Pour déterminer le R_H et la masse molaire de la protéine par HPSEC, l'éluion (K_{av}) de l'échantillon est comparé à l'éluion d'un ensemble de protéines standards dont le R_H et la masse molaire sont connus.

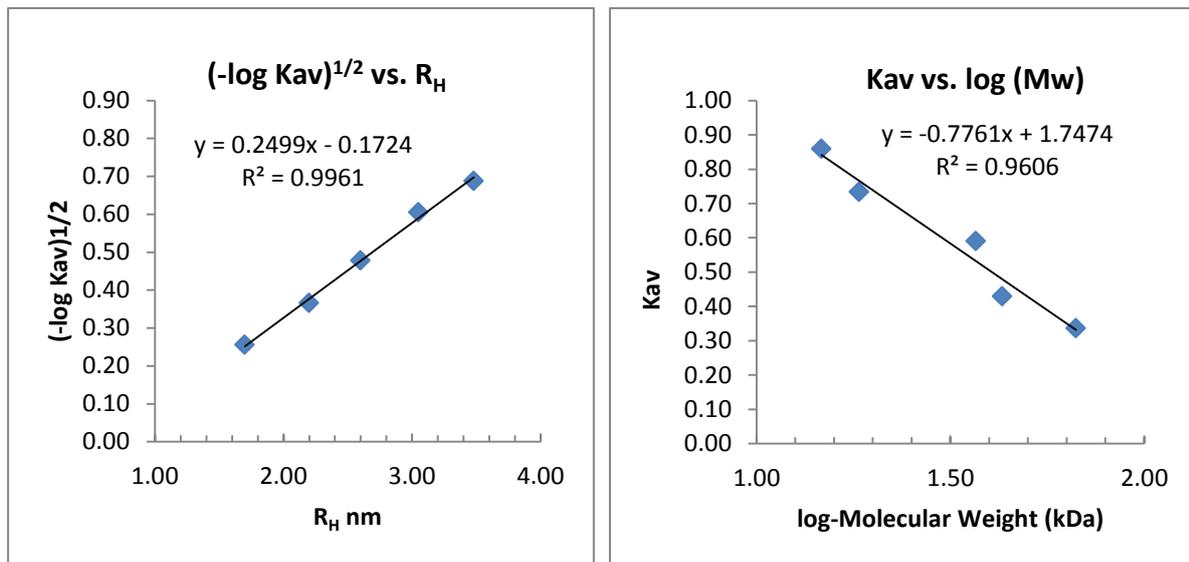
Le K_{av} est définie par l'équation suivante ; $K_{av} = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$

V_e , volume d'éluion des molécules analysées, V_m , volume mort de la colonne : volume d'exclusion des grosses molécules non retenues sur le gel, V_t , volume total de la colonne.

Les protéines standards utilisées ainsi que leur masse moléculaire et leur R_H sont donnés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2.3**). Deux courbes de calibration sont obtenues et permettent de calculer les paramètres de l'échantillon (**Figure 2.7**).

Tableau 2. 3 :Masse moléculaire et R_H des protéines standards utilisées en HPSEC

Protéine standard	Masse moléculaire (kDa)	R_H (nm)
Albumine bovine	66,7	3,48
Ovalbumine	43,0	3,05
β -globuline (dimère)	36,8	2,6
β -globuline (monomère)	18,4	2,20
Lysosyme	14,7	1,70

Figure 2. 7 :Courbes d'étalonnage pour le calcul du R_H et de la masse moléculaire en HPSEC

3.5. Résonance Plasmonique de Surface (RPS)

La résonance plasmonique de surface (RPS) permet de visualiser en temps réel les interactions entre biomolécules non marquées comme les protéines. L'une des deux protéines (le ligand), est immobilisée par des liaisons covalentes ou non sur une interface la sensor chips. L'autre protéine (l'analyte) est injectée à débit constant par l'intermédiaire d'une cartouche microfluidique au contact de la sensor chips (**Figure 2.8**).

Un système optique mesure alors la modification de résonance induite par une interaction moléculaire. Cette modification est directement proportionnelle à la masse et à la quantité de molécules liées à la sensor chips. Pour la majorité des applications, la surface peut être régénérée et réutilisée pour une longue série d'analyses. Il existe deux types de sensor chips qui permettent de fixer soit des molécules hydrosolubles ou des molécules hydrophobes. Selon la stratégie de couplage, la sensor chips est une lame de verre recouverte d'une pellicule d'or nue

ou fonctionnalisée par des chaînes de dextran plus ou moins greffées par des groupes carboxyméthyls (CM5, CM4, CM3, etc.), de la streptavidine (SA), de l'acide nitriloacétique (NTA) ou des chaînes hydrocarbonées (L1).

Le matériel utilisé pour la RPS est un Biacore X100 (GE Healthcare, France), équipé d'un dégazeur en ligne et d'un passeur d'échantillon. Le volume d'injection peut être réglé de 2 à 350 μL , le débit de 2 à 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. La cartouche microfluidique et la sensor chip délimitent deux canaux de mesure de 100 nL ($1,2 \text{ mm}^2$). La sensor chip est placée dans l'appareil où elle est pressée entre le circuit microfluidique et le système optique qui délimitent les 2 canaux d'injection (**Figure 2.8**). Un faisceau de lumière illumine l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, la lumière est totalement réfléchi sans réfraction. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, une composante de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde ($1\mu\text{m}$). La zone balayée par l'onde est appelé champs évanescent. Un phénomène de résonance se produit avec la couche d'or utilisée riche en électrons libres. Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi. Ce faisceau présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum est appelé angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Les changements de masse, induits par l'association ou la dissociation des complexes, modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur la sensor chip.

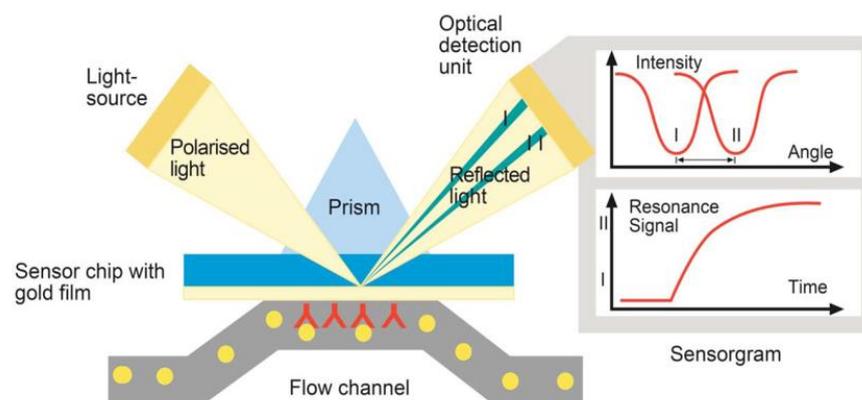


Figure 2. 8 : Schéma de principe de la résonance plasmonique de surface

L'interaction entre deux protéines est visualisée par un sensorgramme, qui correspond au signal de résonance quantifié par des unités de résonance (RU) en fonction du temps d'injection (une valeur de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de résonance de 0,1° et à la fixation de 1 ng de protéine par mm² de surface.).

Pour obtenir un sensorgramme, à partir de la surface sur laquelle est immobilisée un ligand, 1) une ligne de base est établie avec le tampon d'étude, puis 2) la solution d'analyte est passée en flux au-dessus de cette surface et l'interaction conduit à une augmentation de l'intensité du signal RPS jusqu'à l'équilibre. Ensuite 3) du tampon est injecté à débit constant pour vérifier la réversibilité de l'interaction et enfin 4) la surface est régénérée avec un tampon spécifique pour permettre de récupérer la surface initiale, i.e. la surface d'or avec le ligand immobilisé (**Figure 2.9**).

Ces expérimentations permettent d'accéder à différentes informations : interaction entre les molécules d'études, masse adsorbée, constantes cinétiques d'association et de dissociation permettant de déterminer la constante d'affinité.

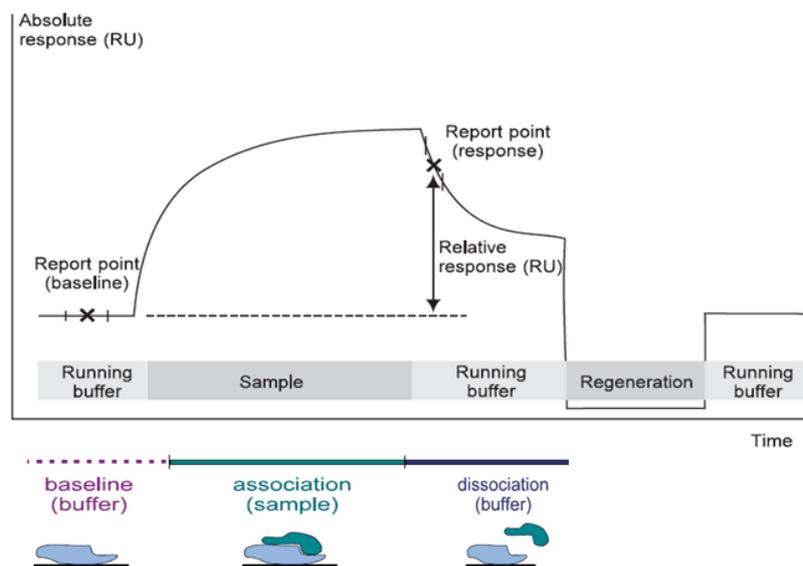


Figure 2. 9 : Schéma illustrant un sensorgramme.

Définir les conditions d'interactions passe par le choix de la sensor chips utilisée, de la méthode de couplage, de l'optimisation de l'immobilisation et de la régénération.

Classiquement les protéines de taille inférieure à 100 kDa peuvent être couplées sur une CM5. Cette sensor chip est constituée d'un support de verre, recouverte d'une fine couche d'or de 50 nm environ. Une matrice de dextran de 100 nm d'épaisseur est ensuite greffée sur l'or via une

couche intermédiaire constituée de thioalcanes. Le dextran possède de nombreuses qualités et notamment, la stabilité dans le temps, la résistance aux variations de pH, aux fortes concentrations en sels ou encore à la présence de détergents. Ces chaînes linéaires de dextran sont fonctionnalisées par des groupements carboxyméthyles qui vont permettre le couplage covalent des biomolécules. On compte environ un groupement carboxyméthyle tous les 6 résidus de glucose. C'est une matrice flexible et stable qui permet d'utiliser, en théorie, l'interface pour 100 cycles de fixation-régénération.

Lors de l'injection de la protéine (20 à 200 µg.mL⁻¹) il faut se placer à un pH inférieur au point isoélectrique de la protéine mais supérieur au pH de la surface activée (pK dextran carboxyméthylé = 3,5). Ainsi par interactions électrostatiques (favorisées également par la faible force ionique du tampon de couplage, 10 mM pour un cation monovalent) la protéine, globalement chargée positivement est attirée vers la surface où ses groupements NH₂ réagissent avec les esters actifs du dextran.

Pour des analyses cinétiques, le niveau d'immobilisation de la protéine (ligand) R_L est déterminé de sorte que la capacité maximale de liaison de l'analyte, R_{max} est faible, afin de réduire les effets de transport de masse (i.e. pour l'appareil Biacore X100 utilisé, un R_{max} de 100 RU est préconisé pour une cinétique correcte). Ne connaissant pas la stoechiométrie de l'interaction et les protéines impliquées dans une éventuelle interaction, un R_{max} de 500 RU a été choisi (choisi car plus facile à obtenir techniquement que 100 RU et la capacité d'interaction théorique R_{max} est souvent supérieure à la capacité effective). Le niveau d'immobilisation de la protéine R_L est calculé avec l'équation suivante :

$$R_{\max} = R_L \times (\text{MW analyte} / \text{MW ligand}) \times \text{stoichiometry d'interaction}^*$$

**par défaut la stoechiométrie 1 :1 est choisie*

Un couplage covalent amine de la protéine sur la CM5 peut être effectué en l'immobilisant via ses fonctions amines primaires sur l'un des deux canaux de la sensor chip (l'autre servant de référence). Le couplage s'effectue en trois étapes (**Figure 2.10**). Une première étape d'activation des groupements carboxyméthyl du dextran est réalisée en injectant un cocktail d'Ethyl-Diméthyl propyl-Carboiimide et de N-Hydroxy-Succinimide (EDC/NHS). Les groupements carboxyméthyles sont activés par l'EDC en formant des amines réactives intermédiaires O-Acylisourée. L'intermédiaire est sensible à l'hydrolyse, le rendant instable et de courte durée dans une solution aqueuse. L'addition de NHS stabilise l'intermédiaire amine-réactif en le transformant en un ester d'amine réactif. L'ester

intermédiaire présente une stabilité suffisante. Cet intermédiaire peut réagir ensuite avec une amine de la protéine, ce qui donne un conjugué de ces deux molécules reliées par une liaison amide stable. Les esters non couplés aux protéines sont au final bloqués par de l'éthanolamine 1M pour éviter toutes interactions non spécifiques avec les protéines injectées lors des expérimentations.

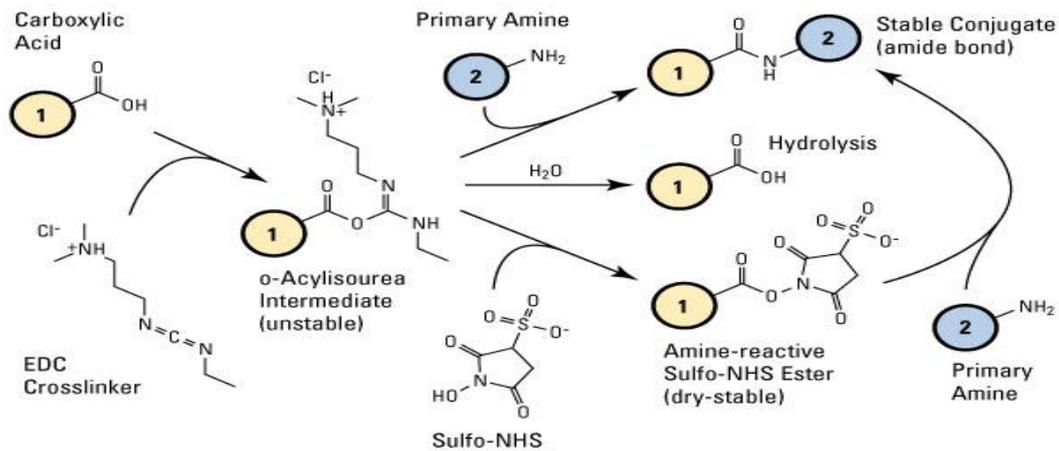


Figure 2. 10 : Activation des groupements amines des protéines par le cocktail EDC/NHS

Les expériences d'interaction/régénération se font à débit rapide ($> 10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) pour améliorer la reproductibilité. Le tampon de régénération recommandé est un tampon Hepes 10 mM ou sodium phosphate pH 7,4, 150 mM NaCl (pour écranter les charges négatives du dextran), 0.05% P20 (détergent). Le niveau de réponse de l'association est mesuré 10 s avant la fin de l'injection des protéines ($< 1\mu\text{M}$) tandis que le niveau de réponse de la dissociation est mesuré 20 s après la fin de l'injection. Le retour à la ligne de base s'effectue par l'injection d'une solution de régénération appropriée (NaOH 10 mM, SDS 0,2%, etc).

Constantes à l'équilibre (affinité) et constantes de vitesse (cinétique)

Deux méthodes sont possibles pour obtenir les paramètres d'affinité et cinétique à partir des sensorgrammes avec les algorithmes fournis par le constructeur (Biacore X100 Evaluation Software Version 2.0) (Figure 2.11).

Analyser le plateau à l'équilibre (steady-state) en fonction de la concentration de la protéine injectée (analyte) donne des informations sur les constantes d'affinité, association K_A et dissociation K_D (force de liaison) et sur l'état à l'équilibre. Cette méthode est utile pour les interactions rapides pendant lesquelles il y a autant de dissociation que d'association entre le ligand et l'analyte et pour lesquelles il n'est pas possible de déterminer les paramètres cinétiques (vitesses d'association k_{on} et dissociation k_{off}). Pour obtenir ce plateau, on peut jouer

sur la durée d'injection mais aussi et surtout sur le niveau d'immobilisation du ligand sur la chip. Il faut noter que plus l'affinité est élevée, plus ce plateau est difficile à obtenir. Le calcul du K_D nécessitera de faire plusieurs injections à différentes concentrations d'analyte (entre $0.1 K_D$ et $10 K_D$). K_D est la concentration de protéine (analyte) donnant la demi saturation maximale ;

$$R_{eq} = R_{max} / 2.$$

Lorsque le plateau à l'équilibre n'est pas atteint, l'analyse des vitesses d'association et de dissociation pour une série de concentration de la protéine donne les informations cinétiques.

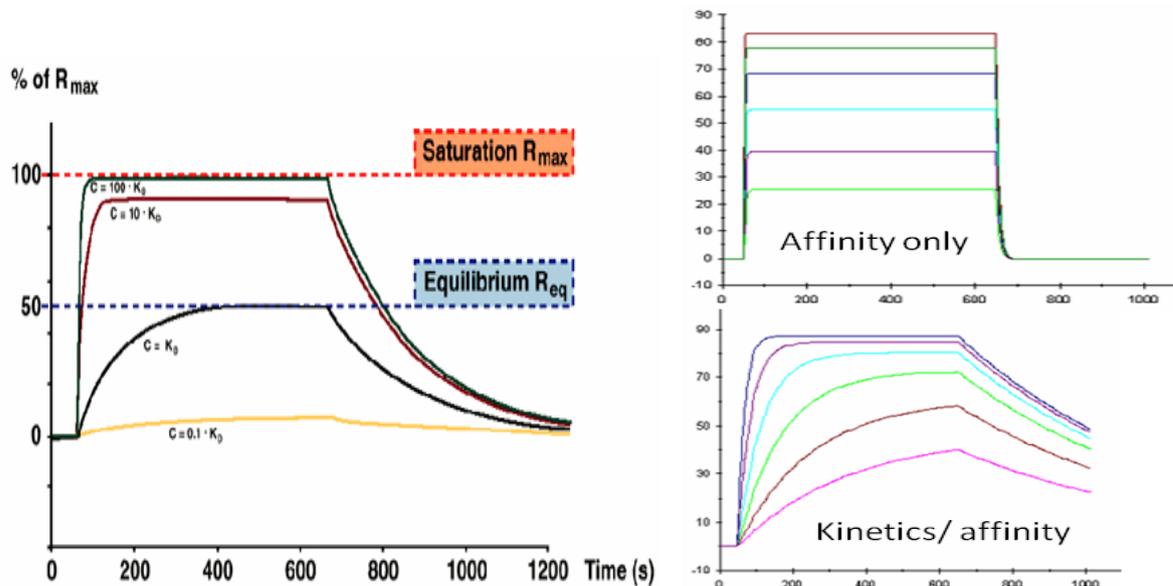
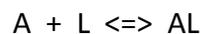


Figure 2.11 : Mesures cinétiques et d'affinité

Calcul du K_D

L'association d'un ligand (L) à son analyte (A) est la suivante ;



D'après la loi d'action de masses, on peut définir à partir de cette équation la vitesse d'association k_{on} ($M \cdot min^{-1}$) et la vitesse de dissociation k_{off} ($M \cdot min^{-1}$) ;

$$[A] \times [L] \times k_{on}$$

$$[AL] \times k_{off}$$

À l'équilibre, la vitesse d'association du ligand à son analyte est égale à la vitesse de dissociation du complexe

$$k_{on} = [AL] \times k_{off}$$

$$[A] \times [L] \times k_{on} = k_{off}$$

$$K_D = [A] \times [L] / [AL] = k_{off} / k_{on}$$

Nombre de sites de liaison

Le nombre total de sites de liaison (A_{Total}) peut être défini de la manière suivante :

$$[A_{\text{Total}}] = [A] + [AL] \quad \Leftrightarrow \quad [A] = [A_{\text{Total}}] - [AL]$$

En ajoutant [L] de part et d'autre de l'égalité, on peut calculer [AL], l'équation devient ;

$$K_D = \{(A_{\text{Total}}) - [AL]\} * [L] / [AL]$$

$$(AL) = (A_{\text{Total}}) * [L] / (K_D + [L]) = B_{\text{max}} * [L] / (K_D + [L])$$

$$(B_{\text{max}}) = (A_{\text{total}}) = \text{capacité maximale de liaison}$$

$$[AL] / B_{\text{max}} = \text{fraction de sites d'interaction occupés} = [L] / (K_D + [L])$$

Quand [L] = 0, la fraction est égale à 0.

Quand [L] = K_D , la fraction est égale à 0,5. On a donc 50 % d'occupation des sites de liaison.

Quand [L] très élevée, la fraction tend vers 1 (l'occupation des sites est totale : 100 %).

Le K_D représente donc la concentration en ligand qui permet la saturation de 50 % des sites de la protéine.

3.6. Electrophorèse 2D, BN-PAGE/SDS-PAGE

L'électrophorèse Blue Native (BN-PAGE) est une technique permettant la migration électrophorétique en gel d'acrylamide de complexes protéine-protéine (**Figure 2.12**). Le bleu brillant de Coomassie est un colorant anionique qui se lie aux protéines de l'échantillon sans dissocier les polymères et en rapportant une charge négative (Schagger et al., 1994). Les complexes ou les multimères ne sont pas dénaturés, cette technique permet de vérifier si la protéine possède une structure tridimensionnelle compacte.

Les expériences de migration du complexe en BN-PAGE sont réalisées dans une cellule Mini Protean II-(BioRad) en utilisant des gels précoulés (Novagel, bis-TRIS 4-12%) à gradient de concentration en acrylamide, 0,02% bleu de Coomassie G250 (CBB) sont ajoutés au tampon de cathode (MES 50 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM pH 7,3). Les protéines plus ou moins complexées entre elles sont en suspension dans le tampon réactionnel (Tris-HCl 20 mM pH 7,2) auquel est ajouté 0,02% CBB (2 mg. mL⁻¹) et 10% de glycérol. 20 µL de cette solution protéique sont déposés sur le gel et la migration est effectuée à 100 V. Lorsque le front de CBB atteint le milieu du gel le tampon de cathode est remplacé par du tampon de migration sans CBB et la migration se poursuit à 180 V, 3 h.

Partie 2. Matériels et Méthodes

Après la migration BN-PAGE, les bandes de migration de gel pour chaque échantillon déposé sont découpées et mises en immersion dans une solution contenant Tris-HCl 25 mM pH 7,2, glycine 190 mM, SDS 0,1%.

Les protéines ayant subi une première séparation en fonction de leur charge nette globale sont soumis à une deuxième dimension selon leur masse moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide SDS-PAGE 15% (voir section SDS-PAGE). Les bandes de gel issues de la séparation BN-PAGE sont déposées horizontalement au contact du gel de polyacrylamide et l'électrophorèse est réalisée à 20 mA pendant environ 2 h (**Figure 2.12**). Après la migration les protéines sont fixées et colorées au nitrate d'argent (voir paragraphe 2. Méthodes de contrôle). Le SDS va dissocier les complexes protéiques associés par liaison ioniques ou hydrophobes. Les protéines monomériques migreront selon une diagonale, les protéines associées en complexe seront visualisées sous la diagonale.

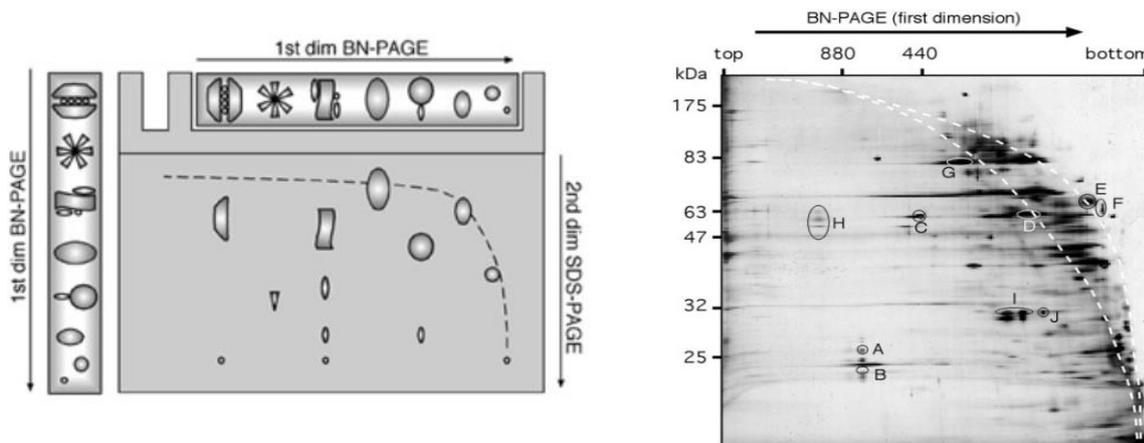


Figure 2. 12 :Schéma représentatif de l'électrophorèse 2D associant les deux techniques de séparation BN-PAGE/SDS-PAGE et exemple de gel SDS-PAGE obtenu en deuxième dimension.La zone entre les deux lignes en pointillées montre la migration des protéines monomériques

4. Références

- Blochet, J.E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.F., Joudrier, P., Pezolet, M., and Marion, D. **1993**. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* 329: 336-340.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. **1987**. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8: 93-99.
- Bordier, C. **1981**. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. *J. Biol. Chem.* 25: 1604-1607.
- Day, L., Bhandari, D.G., Greenwell, P., Leonard, S.A., and Schofield, J.D. **2006**. Characterization of wheat puroindoline proteins. *The FEBS journal.* 273: 5358-5373.
- Laemmli, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lawrence, A.M., and Besir, H.U. **2009**. Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 30: 1-3.
- Malvern. **2008**. Zetasizer APS User Manual. *Manual on*-<http://www.malvern.com>.
- Malvern. **2009**. Protein interactions investigated with dynamic light scattering. *Webinar on*-<http://www.malvern.com>.
- Malvern. **2010**. What does polydispersity mean? . *Faq on*-<http://www.malvern.com>.
- Rolland-Sabate, A., Colonna, P., Guadalupe Mendez-Montealvo, M., and Planchot, V. **2007**. Branching Features of Amylopectins and Glycogen Determined by Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation Coupled with Multiangle Laser Light Scattering. *Biomacromolecules.* 8: 2520-2532.
- Rolland-Sabate, A., Guilois, S., Grimaud, F., Lancelon-Pin, C., Roussel, X., Laguerre, S., Vikso-Nielsen, A., Putaux, J.L., D'Hulst, C., Potocki-Veronese, G., and Buleon, A. **2014**. Characterization of hyperbranched glycopolymers produced in vitro using enzymes. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 406: 1607-1618.
- Schagger, H., Cramer, N., and von Jagow, G. **1994**. Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Proteins Complexes by blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Native Electrophoresis. *Analytical biochemistry.* 217: 220-230.

Partie 3. Résultats

Comportement agrégatif des puroindolines

1. Résumé

En raison des enjeux pour l'économie de la filière céréalière, la dureté du blé a fait l'objet de nombreuses recherches. S'il est largement admis que la dureté du blé est liée à la compacité de la matrice amylo-protéique de l'albumen, les mécanismes physicochimiques qui sous-tendent l'interaction entre la matrice protéique et les grains d'amidon restent aujourd'hui inconnus. Cette interaction est principalement influencée par la présence de la PINA et/ou de la PINB et des lipides polaires à la surface des grains d'amidon ou de la combinaison des deux. Les modifications génétiques des PINs sont étroitement associées à cette interaction. La présence des deux séquences des PINs de type sauvages, *Pina-D1a* et *Pinb-D1a*, aboutit à la texture « soft » du blé tendre. Une mutation ou une délétion dans l'un ou l'autre de ces gènes entraîne la texture « hard » de l'albumen de blé. La mutation la plus fréquente associée à la dureté est la mutation nulle sur *Pina-D1* (*Pina-D1b*). Elle est due à la délétion du gène codant pour la *Pina-D1* entraînant l'absence d'expression de la PINA dans l'albumen. D'autres mutations d'un seul acide aminé sur la PINB ont ensuite été mises en évidence en relation avec le caractère « hard » de l'albumen. De manière individuelle ou en coopération les deux PINA et PINB influencent la dureté des blés, mais aucun consensus n'existe sur le fait qu'une des PINs limiterait la liaison de l'autre à la surface des grains d'amidon.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux comportements physicochimiques *in vitro* de la PINA et de la PINB, purifiées à partir de variétés « soft » et « hard », seule ou en mélange. Pour cela les PINA et PINB ont été purifiées à partir d'un cultivar de blé « soft » (Paléodor) et de deux cultivars de blés « hard » (Récital et Courtot) présentant une mutation différente d'un acide aminé sur la PINB (Tableau 1. Chapitre « Matériel et Méthodes »). Leur pureté et leur hétérogénéité due à la transformation post-traductionnelle ont été caractérisées par SDS-PAGE, électrophorèse acide, HPLC en phase inverse et spectrométrie de masse. Une étude préliminaire par résonance plasmonique de surface (SPR) a permis de mettre en évidence des interactions PINA/PINA et PINA/PINB. Cette étude nous a permis d'émettre l'hypothèse que ces protéines pouvaient s'associer entre elles dans le grain et que cette association pouvait moduler la cohésion de la matrice amylo-protéique et nous a conduit à étudier plus précisément leur comportement agrégatif en solution. En utilisant la diffusion dynamique de lumière (DLS), la séparation fluidique asymétrique par

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

force appliquée (AF4) et la chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC), nous avons montré que les distributions de taille des PINA sont similaires pour les trois variétés et que, dans la solution, elles sont auto-assemblées en petits agrégats, essentiellement des dimères. Inversement, les PINB isolées à partir de variétés « hard » (PINB-D1b et PINB-D1d) forment de gros agrégats tandis PINB-D1a forme essentiellement des monomères. Les solutions mixtes de PINA et PINB forment des agrégats hétéromériques. Les gros agrégats PINB-D1b ont été maintenus, même à un rapport massique élevé PINA/PINB (4:1). La dissociation réversible des gros agrégats induite par les forces de cisaillement (filtration) en petits agrégats suggère que les interactions, pour contrôler l'auto-assemblage des PINs, sont vraisemblablement faibles et/ou que la dynamique structurale des PINs, notamment de son domaine riche en tryptophane, facilite des réarrangements de structure des agrégats. Ce point pourrait expliquer en partie le fait que de nombreux essais de cristallisation de ces protéines ont été infructueux (M.B. Lascombe, communication personnelle).

2. Mise en évidence d'interactions puroindoline-puroindoline.

Les PINA-D1a, PINB-D1a, PINB-D1b ont été purifiées à partir des deux variétés Paléodor, Récital. Leur caractéristique est décrite dans le chapitre 2. La mise en évidence d'interactions entre ces protéines a été réalisée dans un premier temps par résonance plasmonique de surface (SPR), méthode qui permet de visualiser en temps réel les interactions entre biomolécules non marquées. Définir les conditions d'interactions passe par le choix de la sensor-chips utilisée, de la méthode de couplage, du niveau d'immobilisation de la protéine, des conditions d'interactions avec une autre protéine et de la régénération de la surface couplée avec la première protéine.

Le couplage a été effectué avec la PINA purifiée (PINA-D1a) sur une interface CM5 (Sensor-chips, Biacore). La sensor chips CM5 est composée de groupements carboxyméthyles couplés à un polymère de dextran recouvrant une surface d'or. Ce couplage a été effectué par les fonctions amines de la PINA. Les groupements carboxyméthyles du dextran sont activés et réagissent avec les groupements NH_3^+ de la protéine (5 lysines sur les PINs). Un tampon HBS-EP (Hépès 10 mM pH 7,4, EDTA 3 mM, NaCl 0,15 M, Nonidet P20 0,05%) et une solution NaOH 10 mM ont été utilisés respectivement comme tampon de course et solution de régénération pour toutes les expériences d'interactions, réalisées à 25° C et à débit constant de 10 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. La protéine est couplée sur

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

un de deux canaux, le deuxième canal, non couplée, est utilisé comme référence. Plusieurs niveaux d'immobilisation de la protéine ont été testés, 1800 RU, 500 RU et 100 RU environ. Le niveau d'immobilisation fort permet d'augmenter la surface d'interaction possible avec une autre protéine. Le niveau d'immobilisation moyen de 500 RU permet de diminuer les effets de transport de masse de la protéine interagissant en flux continue avec la protéine couplée. La quantité de protéine injectée étant plus faible, ces conditions permettent d'améliorer la qualité de la cinétique d'interaction et le calcul des paramètres cinétiques. L'idéal est de diminuer le niveau d'immobilisation à 100 RU pour optimiser l'analyse cinétique mais nous n'avons pas pu obtenir ce niveau faible de 100 RU avec l'appareil utilisé. Les constantes cinétiques sont extraites à partir des données expérimentales par un processus itératif qui trouve le meilleur ajustement pour un ensemble d'équations décrivant l'interaction. Le logiciel BIA-evaluation (Biacore) propose cinq modèles de réaction différents. Nous avons utilisé le modèle le plus simple binding 1:1 pour une première évaluation.

Trois solutions de protéines purifiées PINA-D1a, PINB-D1a et PINB-D1b ont été testées pour les mesures d'interactions avec la PINA-D1a couplée. Des exemples de sensorgrammes obtenus en analysant l'interaction de PINB avec PINA-D1a couplée sur la sensor chips sont donnés sur les figures 3.1 et 3.2.

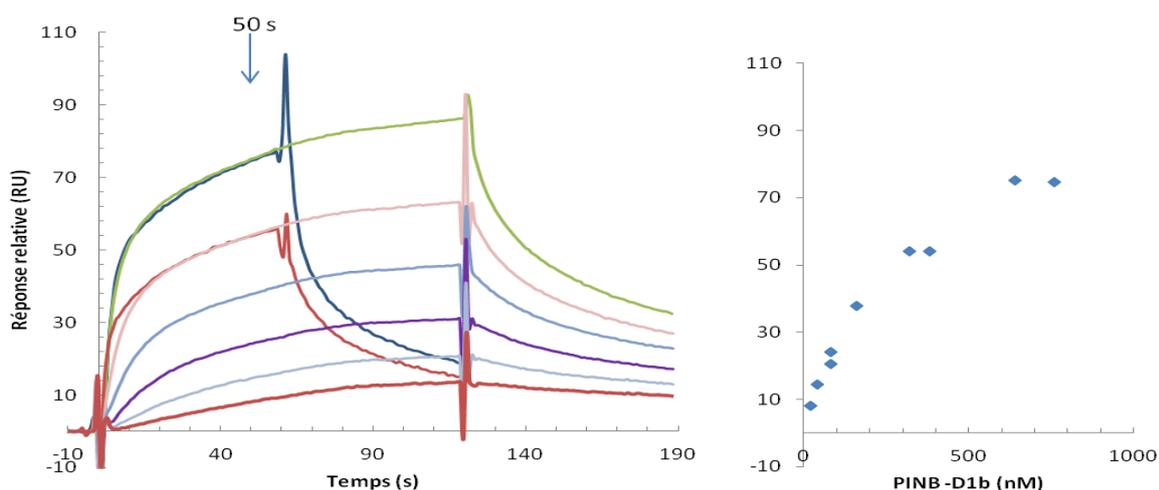


Figure 3.1: Analyse SPR de l'interaction de PINB-D1b (variété « Hard ») avec PINA-D1a couplée (RL = 1800 RU) et réponse relative à 50 s en fonction de la concentration en PINB-D1b. Sensorgrammes enregistrés pendant l'injection de 20, 40, 80, 160, 320 et 640 nM de PINB-D1b pendant 120 s et 380, 760, 1900, 3800, 7600 nM de PINB-D1b pendant 60 s (from the bottom to the top).

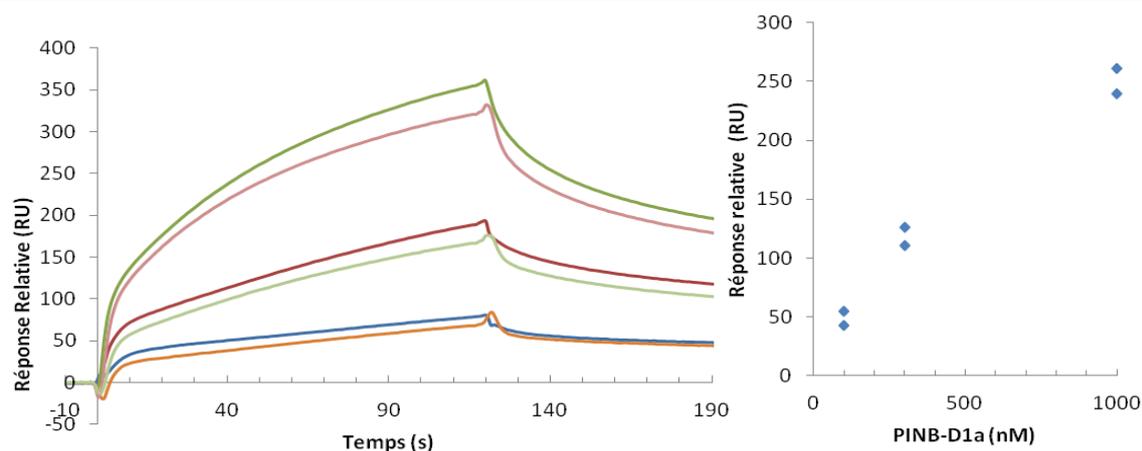


Figure 3.2: Analyse SPR de l'interaction de PINB-D1a (variété Soft) avec PINA-D1a couplée (RL = 500 RU) et réponse relative à 50 s en fonction de la concentration en PINB-D1a. Sensorgrammes enregistrés pendant l'injection de 100, 300, 1000 nM de PINB-D1a pendant 120 s (from the bottom to the top).

L'interaction de la PINA-D1a avec PINA-D1a couplée montre une association très rapide et une dissociation également très rapide qui ne permet pas de conclure si la PINA-D1a interagit avec elle-même (résultats non montrés).

Dans la **Figure 3.1.**, l'interaction a été analysée en couplant PINA à 1800 RU et en injectant des concentrations croissantes de PINB-D1b (variété « hard » Récital) pendant 60 s ou 120 s. La réponse SPR montre que l'interaction dépend de la concentration de la protéine injectée. L'interaction semble se stabiliser lorsque que l'injection passe de 60 s à 120 s avec une dissociation plus lente à l'arrêt de l'injection. Dans la **Figure 3.2.**, l'interaction entre PINB-D1a (variété « Soft » Palédor) injectée à des concentrations croissantes a été analysée sur une sensor-chips couplée avec un niveau d'immobilisation de la PINA-D1a de 500 RU. De façon identique à la PINB-D1b, le niveau d'interaction enregistré est dépendant de la concentration de la PINB injectée et la dissociation est également lente à l'arrêt de l'injection. Il est à noter cependant que le niveau d'interaction est plus élevé pour cette protéine ; RU=70 pour 500 nM de PINB-D1b interagissant avec PINA-D1a couplée à 1800 RU et RU = 175 pour 500 nM de PINB-D1a interagissant avec PINA-D1a couplée à 500 RU. Dans ces expériences, le plateau de saturation n'est pas atteint et le niveau d'interaction non spécifique (RU sur le canal de référence) est d'environ 15 %. Ces résultats ne permettent pas de réaliser une étude cinétique d'interaction mais permettent de montrer une interaction de la PINB avec la PINA et une variabilité de réponse des différentes PINs.

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

Ces premières observations nous ont amené à étudier plus précisément les interactions existantes entre les différentes isoformes de PINs et en particulier leur comportement agrégatif en solution. Les résultats de cette étude ont été publiés dans un article de *Journal of Cereal Science* en juillet 2015: Volume 64, pages 116-125. DOI : [10.1016/j.jcs.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.05.006)

3. Comportement agrégatif des puroindolines en solution.

A single amino acid substitution in puroindoline B impacts its self-assembly and the formation of heteromeric assemblies with puroindoline A.

3.1. Introduction

The grain composition determines the end-uses properties of wheat such as milling and baking properties. These technological features are closely related to the supramolecular assemblies between endosperm constituents, namely starch, proteins and lipids. More precisely, the milling properties of wheat grain are closely related to grain hardness, a major physical parameter describing grain texture.

Grain hardness is related to the compactness of the endosperm starch-protein matrix and is genetically controlled by allelic variations of a major locus (*Hardness locus, Ha*) located on the short arm of the chromosome 5D. The *Ha*-locus, that determines the 'Hard' or 'Soft' character of wheat grain, encodes the puroindoline genes (Morris et al., 2001; Morris, 2002). Two major proteins were expressed, puroindoline (PINA) and puroindoline b (PINB). Puroindolines (PINs) are small cationic proteins (approximately 13 kDa) containing five disulfide bonds and a tryptophan-rich domain. Their predicted 3D structure is homologous to the structure of 2S albumins of dicot seeds (Lesage et al., 2011). Allelic variations due to point mutations, null mutations or deletions of puroindoline genes (*Pina-D1 and Pinb-D1*) are associated with increased grain hardness while the presence of both wild type (WT) genes, i.e. *Pina-D1a and Pinb-D1a* are necessary for the expression of softness (Bhave and Morris, 2008b; Morris, 2002). A single nucleotide mutation in *Pinb-D1* leading to a glycine-to-serine change at position 46 in PINB (G46S; PINB-D1b) was the first hardness-related mutation reported (Giroux and Morris, 1998). Other PINB mutations were further highlighted that all confirmed a relationship to the 'Hard' character of wheat grain

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

(e.g. *Pinb-D1c*, L60P and *Pinb-D1d*, W44R) (Giroux and Morris, 1998; Lillemo and Morris, 2000). Finally, it was shown that the over-expression of the soft alleles in Hard cultivars led to a significant decrease of grain hardness (Bhave and Morris, 2008b) and that a cooperative interaction between WT PINA and PINB is associated to grain softness (Alfred et al., 2014; Wanjugi et al., 2007a).

While PINs are undoubtedly involved in grain hardness, the question of their precise role in the cohesion of the starch-protein matrix remains totally open. It has been suggested that the interaction of PINs with lipids may control the association between the starch granules and proteins, via membrane remnants found at this interface (Douliez et al., 2000). Indeed, both PINA and PINB interact with lipids *in vitro*, via their respective tryptophan-rich domain. It has been suggested that the observed differences in the lipid binding properties of PINs are linked to small changes in the conformation of the tryptophan-rich domain (Clifton et al., 2007a; Clifton et al., 2007b; Clifton et al., 2011b; Dubreil et al., 1997; Le Guernevé et al., 1998). Furthermore, in the case of G46S and W44R PINB mutants, it has been shown that these single mutations can affect, *in vitro*, the penetration into an anionic phospholipid (DPPG) monolayers (Clifton et al., 2007b; Clifton et al., 2011b). Besides grain hardness, the lipid binding properties are related to two other important functional properties of these unique plant proteins, i.e. their antimicrobial and foaming properties (Bhave and Morris, 2008a; Douliez et al., 2000).

Many works have focused on the interactions of PINs with lipids, while only few data are available concerning their interactions with other components, such as proteins. Like prolamins, the major storage proteins of wheat endosperm, PINs contents increase during endosperm development, slow down during maturation and PINs are degraded upon seed germination (Dubreil et al., 1998; Pauly et al., 2013). Using high resolution electron microscopy, it was shown that PINs were located in storage protein bodies of developing endosperm (Lesage et al., 2011) to be finally found, after desiccation, in both the protein matrix and at the starch-protein interface (Dubreil et al., 1998). A relationship between endosperm texture and the size of storage protein polymers was evidenced by asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). These studies suggested that PINs could also interact with proteins, impacting both polymer sizes and consequently endosperm texture (Lesage et al., 2012).

Beyond PIN-lipid interaction, different studies have highlighted the aggregative properties of PINA *in vitro* (Clifton et al., 2011a; Dubreil et al., 2003). Consequently, we

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

decided to pinpoint the self-association of PINA and especially PINB in relation with mutations describing endosperm texture in soft/hard wheat, i.e. wild-type PINA (PINA-D1a) and PINB (PINB-D1a), and mutants PINB (PINB-D1b) and PINB (PINB-D1d) containing the Gly-46 to Ser-46 and the Trp-44 to Arg-44 mutations respectively. We also studied the aggregative properties of PINA and PINB mixtures in relation with the observed interdependence of both proteins on grain hardness ([Wanjugi et al., 2007b](#))

3.2. Materials and methods

Chemicals.

All chemicals were sourced from Sigma-Aldrich or Merck and were of the highest purity available. Protein solutions (0.5 g. L⁻¹) were prepared in phosphate buffer solution Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ at ionic strength 0.02 and 0.1 M at pH 7.2, pH 5.5 or pH 9.0.

Wheat material.

PINA and PINB were purified from three wheat *Triticum aestivum* varieties: the soft variety Paledor (*Pina-D1a* and *Pinb-D1a* alleles), the hard varieties, Recital (*Pina-D1a* and *Pinb-D1b* alleles-G46S mutation) and Courtot (*Pina-D1a* and *Pinb-D1d* alleles-W44R mutation). These varieties from the 2013 harvest were kindly provided by INRA (Le Rheu, France), SECOBRA Recherches (Maule, France) and Groupe Soufflet (Corbeil, France). PIN solutions were prepared by vortexing the lyophilized protein powder in the corresponding phosphate buffers, and allowed to equilibrate at room temperature for one hour prior to experiments.

Purification and characterization of puroindolines

PINs, were extracted from wheat flour (500g) using Triton X-114 phase partitioning and purified following the procedure used for GSP1 as described by Elmorjani et al. (2013). PINB was also extracted by a second method using carboxymethylcellulose (CMC) following the procedure described by Day et al. (2006) and finally purified by reversed-phase HPLC on a C4 NUCLEOSIL® 300-5 column (250 x 10mm, Macherey-Nagel, France) as previously described ([Blochet et al., 1993](#)).

The purity of PINA and PINB was checked by SDS-PAGE according to the procedure of [Laemmli](#) (1970), by one-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis at acidic pH (acid-PAGE), C18-PentaFluoroPhenyl (C18-PFP) reversed-phase HPLC column ACE® (Advanced

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

Chromatography Technologies, Scotland) and mass spectrometry (ESI-MS, LCQ Advantage Thermo-Finnigan, SanJose, USA), as previously described ([Elmorjani et al., 2004](#)).

For acid-PAGE, proteins solution was diluted in 25 mM acetic acid, 6 M urea and 20% (v/v) glycerol. The proteins were fractionated at pH 3.0 by using AE-6500 Dual Mini Slab apparatus (ATTO, Nh-bio, France). Resolving gels were mixed with 12% acrylamide and 1.2% bis-acrylamide in acid-PAGE solution (2 M urea, 0.1% ascorbic acid, 0.0014% ferrous sulfate, 0.8% acetic acid) and polymerized with H₂O₂ (25 µL of 0.6% stock solution) for 30 min. The 1 mm thick gels were run at 250 V for 45 min with 45 mM acetic acid as anode buffer and 25 mM acetic acid as cathode buffer. The proteins were fixed for 5 min in 10% (w/v) trichloroacetic acid solution, and stained by addition of a few drops of a 0.4% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in ethanol solution.

HPLC analysis of purified fractions was performed on a Waters alliance system (Millford, Ma, USA). Proteins solutions were injected in an ACE 10 C18-PFP column (250 x 4.6 mm) equilibrated with 73% solvent A (H₂O, Trifluoroacetic acid (TFA) 0.11%) and 27% solvent B (acetonitrile, TFA 0.09%) 27%. Elution was performed at a flow rate of 1 mL.min⁻¹ and 40 °C by an increasing gradient from 27 to 42% solvent B in 20 min. UV detection of proteins was performed at 214 and 280 nm on a dual λ absorbance detector, model 2487 (Waters).

Dynamic light scattering (DLS)

The hydrodynamic radius (R_H) distribution of particles and aggregates was determined by dynamic light scattering (DLS). A Malvern Zetasizer Nano ZS90 Instrument (Malvern, UK) has been used for the measurements, with a 3.0 mW helium-neon laser emitting at 632.8 nm and with a detection scattering angle of 173°. To analyze the dependence of both the light scattering intensity and the R_H of particles on time, the distribution of the proteins was measured at fixed temperatures. Dilute solutions were measured in a 1 cm path-length spectroscopic plastic cell (BRAND, France) at 25 °C and during 30 s.

The occurring time-dependent fluctuations in the global sample intensity of scattered light were analyzed using an auto-correlator which determines the autocorrelation function of the signal (ACF). The ACF is the sum of a distribution of exponential functions, analyzed using the Malvern Zetasizer Software v6.34. Two methods are commonly applied to processing DLS data, namely the method of cumulants and the regularization method. The method of cumulants assumes that there is a single population of particle sizes, whereas regularization allows computation of multiple decay time constants to obtain relaxation time

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

distribution corresponding to multiple radii. The translational diffusion coefficient (D_t) could then be determined from the decay rate and the R_H of spherical particles in solution using the Stokes-Einstein relationship:

$$R_H = kT/6\pi\eta D_t \quad (1)$$

where k is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature and η is the viscosity of the solution.

The size distribution intensity was obtained by fitting the experimental data points and converted to in volume size distribution. The R_H and the polydispersity index (Pdl) of protein solutions were determined. Pdl describes the width of the assumed Gaussian distribution. In terms of protein analysis, a Pdl below 20% indicates that the sample is monodisperse. The calculations for these parameters are defined in the ISO standard document ISO 22412:2008. Freeze-dried PINs were solubilized in 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.2, pH 5.5 or pH 9.0 and analyzed at a concentration of 0.5 g.L⁻¹. The solution concentration was calculated by measuring optical density at 280nm with an UV-spectrophotometer (Perkin Elmer lambda 2) and by using extinction coefficient of the protein (for PINA, 2.3 L.mol⁻¹.cm⁻¹; for PINB, 1.8 L.mol⁻¹.cm⁻¹). PINA/PINB mixtures were prepared by mixing PINA and PINB solutions in phosphate buffer to obtain the appropriate ratio and final PIN concentration of 0.5 g.L⁻¹. At least five measurements for each sample were taken to assess the repeatability.

Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4) coupled with multi-angle laser light scattering and refractometric detections (AF4-MALLS-DRI)

The AF4 equipment, including an asymmetrical channel, Control-Box V3, Flow box P2.1, and a valve box, was obtained from Consensus (Ober-Hilbersheim, Germany). The channel geometry was trapezoidal with a tip-to-tip length of 286 mm and breadths at the inlet and outlet of 21.2 and 4.7 mm, respectively. A 350 μ m polyester spacer and a 10 kDa cut off cellulose membrane (Charlotte, NC), saturated with polyethylene glycol (PEG), were used. The sample was introduced into the channel using a 100 μ L loop injector (Valco Instruments Co., Inc., Houston, TX). The two on-line detectors comprised a multi-angle laser light scattering instrument (MALLS) Dawn® Heleos® fitted with a K5 flow cell and a Gas laser, ($\lambda=658$ nm), (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA) and an RID-10A refractometer from Shimadzu (Kyoto, Japan). Prior to use, the carrier (20 mM or 100 mM phosphate buffer solution at pH 7.2 containing sodium azide 0.2 g. L⁻¹) was carefully degassed and filtered through PVDF 0.1 μ m filter (Millipore Millex GV). Protein solutions (~1

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

(mg.mL⁻¹) were injected immediately into the setup. The carrier was eluted initially at 1 mL.min⁻¹ for channel flow in (F_{in}). The crossflow (F_c) was then set at 2 mL. min⁻¹, and the channel flow rate (F_{out}) at 0.4 mL. min⁻¹ for the sample introduction and relaxation/focusing period. The sample was injected at 0.2 mL. min⁻¹ for 60 s. After the injection, pump was stopped and the sample was allowed to relax and focus for 415 s. For elution, F_{out} was set at 0.7 mL. min⁻¹, and F_c was 3.5 mL. min⁻¹ for 800 s, after which, F_{out} was maintained at 0.7 mL.min⁻¹ for 925 s without crossflow (F_c). For elution of higher size particles, the method previously described by [Rolland-Sabate et al. \(2007\)](#) was tested with carrier 100 mM phosphate buffer solution at pH 7.2 with sodium azide 0.2 g. L⁻¹. F_{out} was set at 1 mL. min⁻¹, and F_c was reduced from 0.4 to 0 mL. min⁻¹ for 400s, after which F_{out} was maintained and F_c was stopped for 925 s.

Samples recoveries were calculated from the ratio of the mass eluted from the channel (integration of the differential refractive index, DRI, signal) to the injected mass determined by using spectrophotometer ($\lambda=280$ nm). Molar masses (\overline{M}_n , \overline{M}_w) and the dispersity ($\overline{M}_w / \overline{M}_n$) were determined using the ASTRA[®] software from Wyatt Technology Corporation (version 6.1 for PC) as previously described ([Rolland-Sabate et al., 2007](#)). A value of 0.168 mL.g⁻¹ was used as the refractive index increment (dn/dc) and the normalization of photodiodes was achieved using a low molar mass pullulan standard (P20). Size distributions (R_H distributions) were determined using R_H versus elution time and volume calibration curves as previously described ([Rolland-Sabate et al., 2014](#)). AF4 calibration was done by means of the following equation:

$$\frac{t^0}{t_{ri}} \approx \frac{6 D_i V^0}{F_c w^2} \quad (2)$$

which was used to determine the translational diffusion coefficient D_i of the slice i , according to the AF4 theory in the normal mode operation, under which small particles are eluted first. t_{ri} is the retention time (elution time) of the slice i , t^0 the void time (27.1 s), V^0 the geometric volume of the channel (0.922 mL), and w the channel thickness. An effective w of 256 μ m was used for the calculations and was determined as shown previously by [Rolland-Sabate et al. \(2014\)](#). R_H was then determined by using the Stokes-Einstein equation (1).

High-performance size-exclusion chromatography (HPSEC)

The HPSEC system include a HPLC system (Waters, Milford, USA), consisting of an autosampler (Waters 717), binary HPLC pump (Waters 1525), dual wavelength detector

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

(Waters 2487) driven by a Breeze program. The column (1 cm x 42 cm) was packed with Bio-Gel® A-1.5 m gel, fractionation Range 10 000-1 500 000 Daltons (Biorad, France).

The eluting buffer was sodium phosphate 0.02 M pH 7.2 with 0.1 M NaCl, carefully degassed and filtered before use through Millex-GV (0.22 µm) membranes (Millipore, France). HPSEC analysis of PINs was carried out by injecting 0.05 mL of 0.5 mg. mL⁻¹ PINs solutions at a flow rate of 0.2 mL. min⁻¹. A double detection of proteins, at 280 nm and 214 nm was measured (Ve). To determine the R_H and molar mass by HPSEC the sample K_{av} was compared to a set of standard proteins with known R_H and molar masses (bovine serum albumin-66.7 kDa, /R_H=3.48 nm, ovalbumin-43 kDa/ R_H=3.05 nm, β-lactoglobulin dimer-36.8 kDa, /R_H=2.6 nm, β-lactoglobulin monomer-18.4 kDa, /R_H=2.2 nm and lysozyme, -14.7 kDa /R_H=1.7 nm). The K_{av} is defined by the following equation:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o} \quad (3)$$

where V_e is the sample elution volume, V_o is the column void volume (69 min, 13.8 mL) and V_c is the column geometric volume (206 min, 41.2 mL).

3.3. Results and discussion

Characterization of purified puroindolines

PIN proteins were isolated from three wheats cultivars displaying contrasted endosperm textures: soft Paledor (*Pina-D1a* and *Pinb-D1a* alleles), hard variety Recital (*Pina-D1a* and the mutant *Pinb-D1b* alleles) and hard variety Courtot (*Pina-D1a* and *Pinb-D1d* alleles).

In a preliminary step, the purity and primary structure of isolated PINs was checked by using different methods, including SDS and acid-PAGE, reversed-phase HPLC and mass spectrometry. In SDS-PAGE, PINA and PINB migrated as a single band with identical apparent molar mass. No differences could be observed between wheat cultivars conversely, acid-PAGE, where proteins migrate as a function of their size and global electric charge, allows a better separation of PINs (**Supplemental figure 3A**). All PINB variants migrate farther than PINA-D1a, in good agreement with their higher net positive charge at pH 3. PINB-D1a (Paledor) and PINB-D1b (Recital) that have identical positive charge display the same mobility in the gel while PINB-D1d (Courtot) with a higher positive charge migrates farther (**Supplemental figure 3A**). In the case of PINA-D1a, a faint band in acid-PAGE is observed for the three varieties. This minor band with a higher mobility than the major one is related to

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

the protein with the N-terminal aspartyl residue deleted and accordingly has a higher net positive charge at acidic pH ([Blochet et al., 1993](#); [Day et al., 2006](#))

Figures 3.3A and 3.3B show the elution pattern of purified PINs using C18-PFP reversed-phase chromatography. Four HPLC fractions are observed for PINA extracted from soft cultivar Paledor, hard cultivars Recital and Courtot (**Figure 3.3A**). The elution time was similar for the three cultivars. Mass spectrometry analysis of major peaks of the three cultivars purified PINA-D1a (HPLC fractions F3 and F4) highlighted 3 species with molar masses of 12748, 12918 and 12632 Da while minor peaks (HPLC fractions F1 and F2) correspond to the oxidized forms of these proteins (**Figure 3.3C**). These results show that the relative proportion of the three PINA proteins can differ according to the cultivar (Fig. 3.3A). The major mass observed (12748 Da) in HPLC fraction F3 corresponds to PINA protein with a threonine residue at C-terminus (115 AA). The two other molecular masses correspond to a major polypeptide chain (i) having lost C-terminus threonine (114 AA, 12632 Da), and (ii) with an Ile-Gly dipeptide extension at the C-terminus (117 AA, 12918 Da). This protein species is predominantly found in HPLC fraction F4.

It has been previously shown that these masses correspond to a unique polypeptide chain subject to a series of sequential proteolytic cleavages ([Blochet et al., 1993](#)). Indeed, puroindolines are synthesized as pre-proteins that are post-translationally matured. The N-terminal signal peptide and a propeptide are systematically cleaved. At the C-terminus a tripeptide, containing aromatic amino acids (Tyr-Tyr-Trp), is also cleaved. This processing was particularly well characterized in the case of PINA where in addition to the N-terminal aspartyl residue, up to four residues can be removed at the C-terminus. These sequential cleavages lead to heterogeneous puroindoline population ([Blochet et al., 1993](#); [Day et al., 2006](#); [Gautier et al., 1994](#)). Indeed, some significant differences were observed in the proportion of the different PINA species isolated from the three cultivars (**Figure 3.3A**).

In the case of PINB, preliminary results prompt us to choose C18-PFP reverse-phase chromatography that ensures a better resolution than the C18 reverse-phase chromatography. A single peak was eluted by C18-PFP reversed-phase chromatography in the case of PINB-D1a and PINB-D1d and two in the case of PINB-D1b (**Figure 3.3B**). The elution times of PINB proteins are clearly different for the proteins isolated from the soft variety Paledor (PINB-D1a) when compared to the proteins isolated from the hard ones, Recital (PINB-D1b) and Courtot (PINB-D1d). The polypeptide amino acid sequences

were confirmed by mass spectrometry. In the case of PINB-D1a, two main species corresponding to proteins with molar mass of 13075 and 13242 Da are resolved.

The major lower molar mass corresponds to the 116 amino acid sequence that ends with a glycine residue and the higher molar mass corresponds to an additional C-terminal tyrosine (**Figure 3.3D**). In the case of PINB-D1b, the major peak (retention time 13 min) corresponds to a species with molar mass of 13109 Da and ending with a glycine residue while the first eluting peak (retention time 12.5 min) corresponds to an oxidized form of 13109 Da. For PINB-D1d a unique molar mass of 13049 Da is observed corresponding to a 116 amino acid sequence ending with a glycine residue.

The same heterogeneity was observed whatever the purification process, either TX114 phase partitioning ([Elmorjani et al., 2013](#)) or CMC procedure ([Day et al., 2006](#)). Data obtained with C18-PFP chromatography for PINB gave different elution time according to cultivars. The C18-PFP phase exhibits multiple retention mechanisms, i.e. both electrostatic and hydrogen bonds, compared with the classical C18 hydrophobic phase,. The polarity of PINB-D1b (Recital) is modified due to an additional hydroxyl group (glycine to serine substitution) while the impact of the substitution of a tryptophan by an arginine is more drastic for PINB-D1d (Courtot) and may explain its shorter elution time.

Extraction and characterization of PINA and PINB from wheat flour cultivars Paledor, Recital and Courtot allowed to obtain these different proteins purified from “soft” and “hard” wheat varieties, wild-type PINA and PINB (PINA-D1a and PINB-D1a), and two mutants PINB (PINB-D1b and PINB-D1d) containing the Gly-46 to Ser-46 and the Trp-44 to Arg-44 mutations respectively.

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

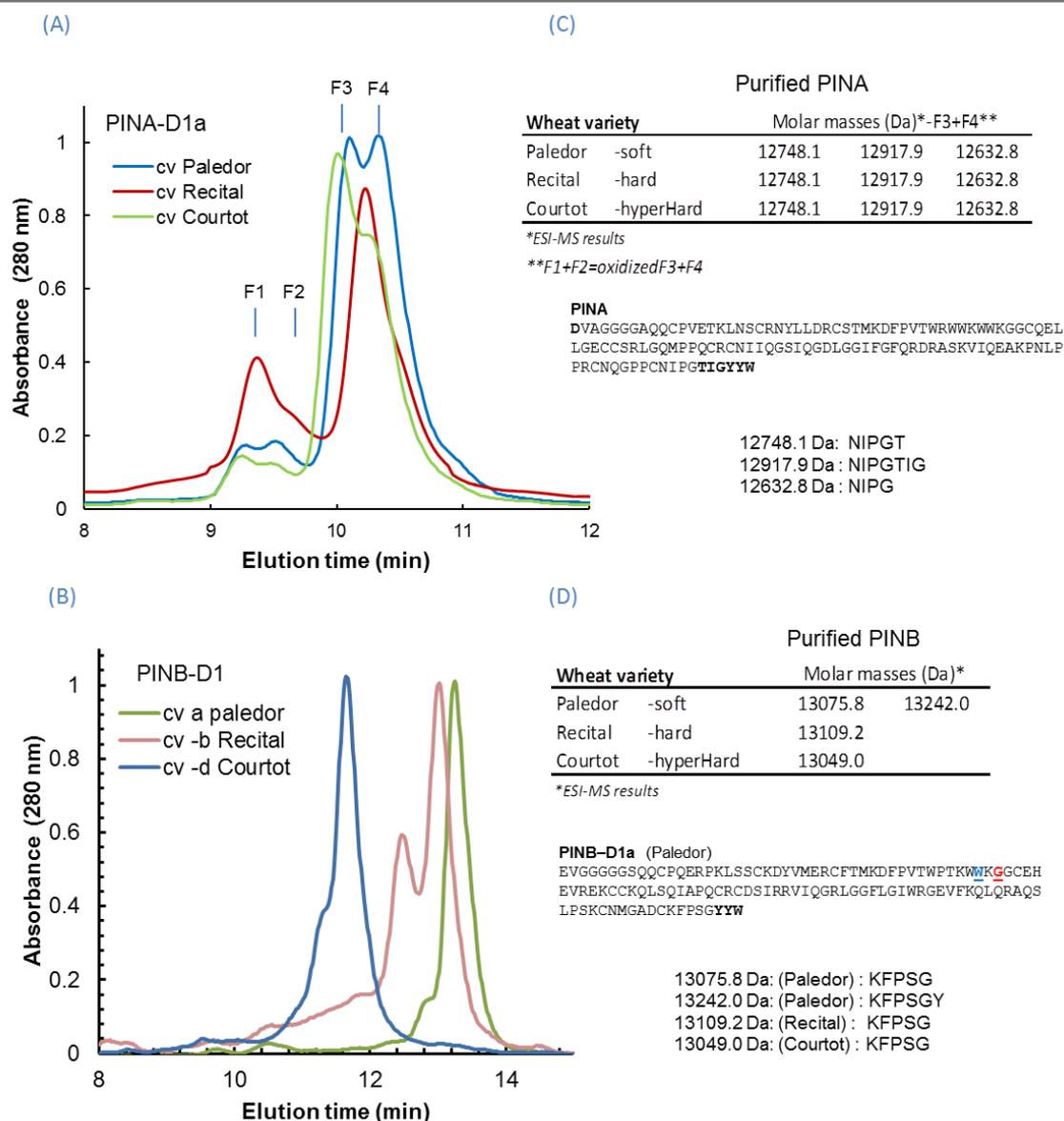


Figure 3.3: C18-PFP RP-HPLC elution profile of purified (A) PINA and (B) PINB from cultivars Paledor (PINB-D1a), Recital (PINB-D1b) and Courtot (PINB-D1d). (C-D) Relative molar masses of purified PINs determined by mass spectrometry analyses and deduced corresponding primary structures and C-terminal sequences cleavages. Proteolytic cleavages are indicated with bold letters. Serine residue replaces a glycine residue (G46S) in PINB-D1b (cv Recital). Arginine residue replaces a tryptophan residue (W44R) in PINB-D1d (cv Courtot) (*red and blue letters*).

PINA-D1a forms small aggregates in solution.

Protein behavior in solution was studied by three complementary techniques: dynamic light scattering (DLS), asymmetrical flow field flow fractionation (AF4) coupled to MALLS and refractometric detectors (AF4-MALLS-DRI), and high performance size-exclusion chromatography (HPSEC).

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

DLS experiments performed for solutions of PINA-D1a (Paledor, Recital and Courtot) in 20 mM phosphate buffer pH 7.2 at 25 °C showed a monomodal Gaussian distribution by volume of R_H (**Figure 3.4A**). The fraction of the sample in each maximum size was obtained from size distributions by volume. The experimental correlation suggested predominance of a population of particles with $R_H \sim 2.8$ nm for all samples (**Figure 3.4A**).

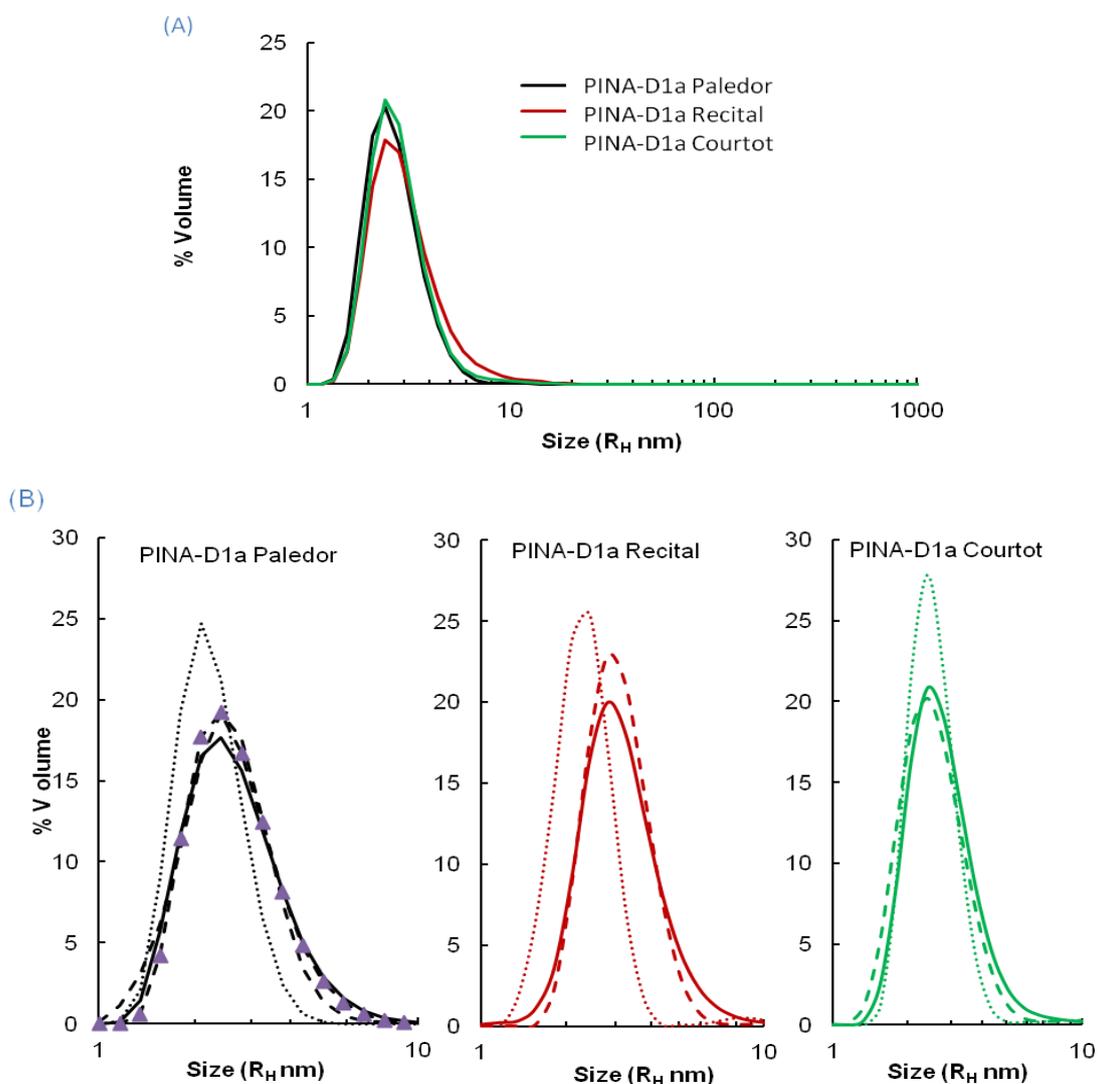


Figure 3.4: Particle size distribution by volume of PINa Paledor, Recital and Courtot in (A) 20 mM phosphate buffer pH 7.2 (continuous), (B) pH 9.0 (dashed) or pH 5.5 (dot) or pH 7.2 with NaCl 0.1 M (dashed with triangle) measured by DLS. Values are expresses as mean of five measurments.

PINA particle size distributions from “hard” cultivar Recital was slightly modified by varying pH. R_H was 2.2 nm at pH 5.5. and 2.8 nm at pH 9.0 and pH 7.2. PINA particle size distributions were not modified by varying pH and ionic strength for the two other cultivars Paledor and Courtot (**Figure 3.4B**). Weak or no impact of pH on PINA aggregation is in good agreement with a previous report on Claire, another soft wheat cultivar (Clifton *et al.*, 2011a). According to this result, one can conclude that PINA-D1a heterogeneity due to

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

variability in the post-translational processing (as discussed above) does not impact significantly the aggregative properties of this protein in 20 mM phosphate buffer solution at pH 7.2. The R_H vary from 1.8 to 5 nm. For all cultivars studied in this work, the Pdl are less than 0.7 but higher than 0.2 indicating that the particle sizes are not monodisperse. This polydispersity suggests the presence of small aggregates (e.g. dimers, trimers) in solution.

Therefore, in order to resolve dimers and trimers from the monomers, PINA-D1a solutions were further analyzed by AF4-MALLS-DRI and HPSEC.

For AF4-MALLS-DRI experiments, the proteins were solubilized and fractionated in 20 mM or 100 mM phosphate buffer pH 7.2. Elution recoveries, which represented the percentage of macromolecules percolating through the AF4 system, ranged from 21% for PINA-D1a (Paledor) to 26% for PINA-D1a (Recital) in 20 mM phosphate buffer pH 7.2 (**Supplemental table**). The low sample recoveries obtained here indicated that the fractionation responses were not quantitative and the proteins could interact with the AF4 cellulose membrane. The R_H was not determined with this phosphate buffer. When 100 mM phosphate buffer was used, the elution recoveries obtained were improved, ranged from 48% for PINA-D1a (Paledor) to 50% for PINA-D1a (Recital) (**Supplemental table**). AF4-MALLS-DRI elugrams were transformed to size distributions, using hydrodynamic radius (R_H) versus elution volume (or elution time) calibration (Rolland-Sabate et al., 2014) (**Figure 3.5A**). PINA size distributions in 100 mM phosphate buffer showed one peak at $R_H \sim 5$ and 4.4 nm for PINA-D1a (Paledor) and PINA-D1a (Recital), respectively (corresponding to the apex of the DRI peak and thus representing the major PINA fraction). The molar masses were $\sim 27 \times 10^3$ g.mol⁻¹ for PINA-D1a (Paledor) and $\sim 28 \times 10^3$ g.mol⁻¹ PINA-D1a (Recital) in 100 mM phosphate buffer (**Supplemental table**). Therefore, the majority of PINA forms dimers in solution. Nevertheless, according to this method, the presence of monomeric form cannot be ruled out and could explained lighter shoulder observed on size (R_H) curve for PINA Recital (**Figure 3.5A**). The small difference of R_H between PINA extracted from cultivar Recital and Paledor could be explained by differences in the interaction with the membrane, related likely to differences in the proportions of the cleaved proteins (see **Figure 3.3A**).

For HPSEC experiments, the proteins were solubilized in 20 mM phosphate buffer pH 7.2 and eluted in the same buffer containing 0.1 M NaCl to avoid any non-specific interaction between the protein and the hydrophilic agarose stationary phase. Like AF4-MALLS-DRI, one peak was observed (**Figure 3.5B**). Elution times for PINA from Paledor and Recital cultivars

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

corresponds to R_H of 1.2 nm and 1.0 nm, respectively and a calculated molar mass of ~10 kDa Mw returned from standard curves (**Supplemental figure 3B**).

Under these experimental conditions, it seems that the proteins are rather in monomeric form. In another study ([Clifton et al., 2011a](#)), PINA extracted from the soft wheat cultivar Claire, displayed also both monomers and aggregates ($n= 4 -5$). The later were not observed in our experiments.

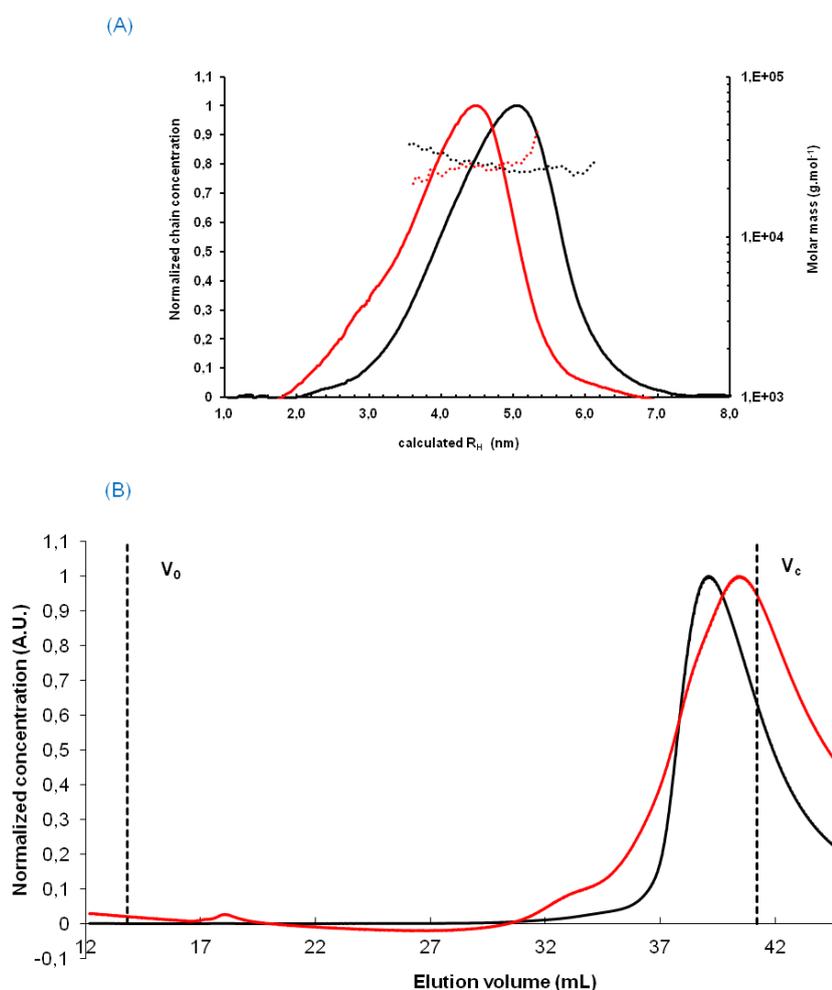


Figure. 3.5: (A) Size (R_H) and molar masses distributions of PINA-D1a Paledor (*black*) and PINA-D1a Recital (*red*) obtained using AF4 with 100 mM phosphate buffer pH=7.2. *Full lines* represent the normalized concentration (obtained from DRI values) and *dotted lines* represent the molar masses. (B) HP-SEC (BIO-GelA 1.5M) elugrams of PINA-D1a Paledor (*black line*) and PINA-D1a Recital (*red line*) obtained with 20 mM phosphate pH=7.2 with 0.1M NaCl. V_0 is the column void volume (35 mL) and V_c is the column geometric volume (103 mL).

Consequently, DLS, AF4-MALLS-DRI and HPSEC methods show experimental complementary informations. The DLS technique does not allow to distinguish monomeric particles from small aggregates ($n=2$ or 3). DLS shows a widening of the population of particles around a mean R_H of 2.8 nm (17% by volume). The particle size volume distribution

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

is a Gaussian curve where size distribution varies from 1.3 to 18.9 nm with. A mean size R_H of 9 nm was obtained by [Clifton et al. \(2011a\)](#). In our PINA solutions, only 0.6% by volume correspond to this R_H (**Supplemental figure 3C**). PINs resuspended in phosphate buffered solution interacts with the AF4 membrane. Yet, the molar masses obtained by this technique suggest that PINA-D1a is mainly dimeric with a $R_H \sim 4$ nm. PINA is eluted near the geometric volume of the HPSEC column. This leads to truncated distributions in the low size area and may also lead to an underestimation of PINA size owing to interaction in the column ($R_H \sim 1$ nm). The DLS results and the two fractionation methods suggest that the PINA-D1a population consists mainly of dimers and contains small quantity of monomers in the same solution (molar masses and large distribution).

PINA-D1a (Paledor, Recital) have in common the same amino acid sequences with only differences in the proportion of their post-translationally cleaved products. Therefore, according to our datas, this does not impact significantly puroindoline self-assembly.

Impact of a single amino acid substitution on PINB aggregative properties

Using the same experimental conditions, the particle size distributions of PINB-D1a (Paledor), PINB-D1b (Recital) and PINB-D1d (Courtot) were determined by DLS in 20 mM phosphate buffer pH 7.2 (**Figure 3.6A**). PINB-D1a displays a single population of particles with a smaller size (R_H of 2.2 nm) than PINA-D1a (R_H around 3 nm). This population is polydisperse with a Pdl > 0.6 and in solution, particle sizes expressed as volume vary from 1 nm to 5 nm (less than 0.5% volume). DLS analyses return a R_H of ~ 550 nm for the PINB-D1b and ~ 410 nm for the PINB-D1d (**Figure 3.6A**). The Pdl is above 0.6 and the widths of the particle size distributions, expressed as volume, were about 600 nm ($< 0.3\%$ by volume for the smaller). However, these results should be analyzed carefully since $R_H \sim 500$ nm corresponds to the maximum size limits measurable by DLS technique. Therefore, the R_H of PINB-D1b and PINB-D1d is about 200 times higher than the R_H of PINB-D1a when these proteins are solubilized in 20 mM phosphate buffer at pH 7.2. Indeed, the PINB-D1b and PINB-D1d solutions turned turbid in few seconds suggesting a tendency for an aggregation process and in line with an aggregate size of about 1 μm in diameter. These experiments showed sharp differences in the particle size distribution associated with single mutation (**Figure 3.6A**). In addition the impact of pH and salt concentration on the PINB aggregative properties were checked from the three proteins (**Figure 3.6B**). Particle size distribution was measured by DLS for PINB-D1a, PINB-D1b and PINB-D1d in phosphate buffer 20 mM at pH

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

5.5, pH 9.0 or at pH 7.2 with 0.1 M NaCl. PINB-D1a showed a monomodal Gaussian distribution by volume with $R_H=2.2$ nm whatever phosphate buffer pH (pH 7.2, 5.5 or 9.0) or the ionic strength conditions (with or without 0.1 M NaCl). A slight impact of pH and ionic strength is observed for PINB from Recital and Courtot cultivars (**Figure 3.6B**), although large aggregates are measured in all conditions. In addition, particle size distribution of PINB-D1b was compared with the particle size distribution of protein purified by the method using the CMC purification procedure (Day et al., 2006). Whatever the purification procedure, the aggregative behavior of the proteins was identical (**Supplemental figure 3D**) but with an R_H smaller for PINB-D1b purified by the CMC procedure (~ 250 nm). Accordingly, these results demonstrated that PINB proteins from hard wheat cultivars, exhibited stronger aggregative properties than the wild type PINB, i.e. PINB-D1a.

Aggregative properties of PINB-D1a and PINB-D1b were further characterized by AF4-MALLS-DRI experiments. Elution recoveries, ranged from 19% in 20 mM phosphate to 35% in 100 mM phosphate buffer pH 7.2. The low sample recovery obtained indicated that the PINB could interact with the AF4 cellulose membrane. Contrary to the results obtained in DLS experiments, the fractionation of PINB-D1b solution in 100 mM phosphate pH 7.2 (**Figure 3.7A**) does not show aggregates but small particles with R_H around 2.8 nm and a weight average molar mass (M_w) ~ 14000 g.mol⁻¹ as it as for observed for PINB-D1a . With HPSEC, PINB-D1b was eluted as a single peak with 20 mM phosphate buffer pH 7.2 with 0.1 M NaCl, (retention time 187 min) corresponding to $R_H\sim 1.5$ nm and $M_w\sim 11900$ g.mol⁻¹ (**Figure 3.7B**). Small shoulder before the major peak were observed, could suggested than a higher population existed in this solution (dimers, $R_H=2.2$ nm and $M_w=21000$ g.mol⁻¹).

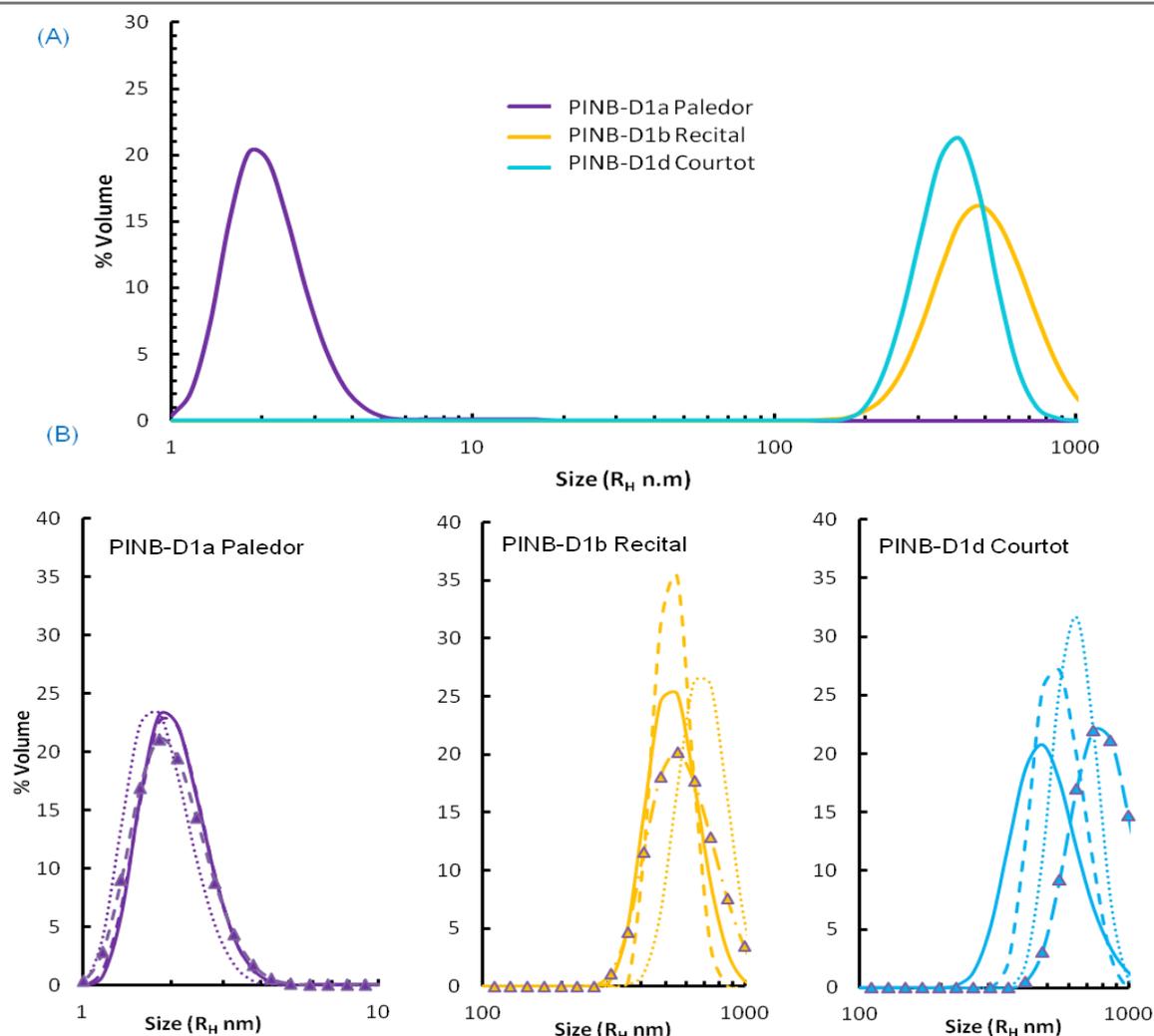


Figure 3.6: Size (R_H) of PINB-D1a, cv Paledor, PINB-D1b, cv Recital and PINB-D1d, cv Courtot; in (A) 20 mM phosphate buffer pH 7.2 only, in (B) pH 7.2 (continuous), pH 9.0 (dashed), pH 5.5 (dot), or pH 7.2 with NaCl 0.1 M (dashed with triangle) measured by DLS. Values are expressed as mean of five measurements.

These contradictory results between DLS and AF4/HPSEC led us to test the impact of filtration on the aggregative properties of PINB. While the protein concentration of the filtrate was the same before and after filtration, the larger aggregates were no longer observed (% intensity lower than 8% for all population, **Supplemental figure 3E**). This observation suggests that aggregates could dissociate due to the shear forces exerted during filtration. This unexpected result suggests that weak interactions govern the formation of large aggregates that can reversibly disaggregate to monomeric forms during AF4 and HPSEC analyses.

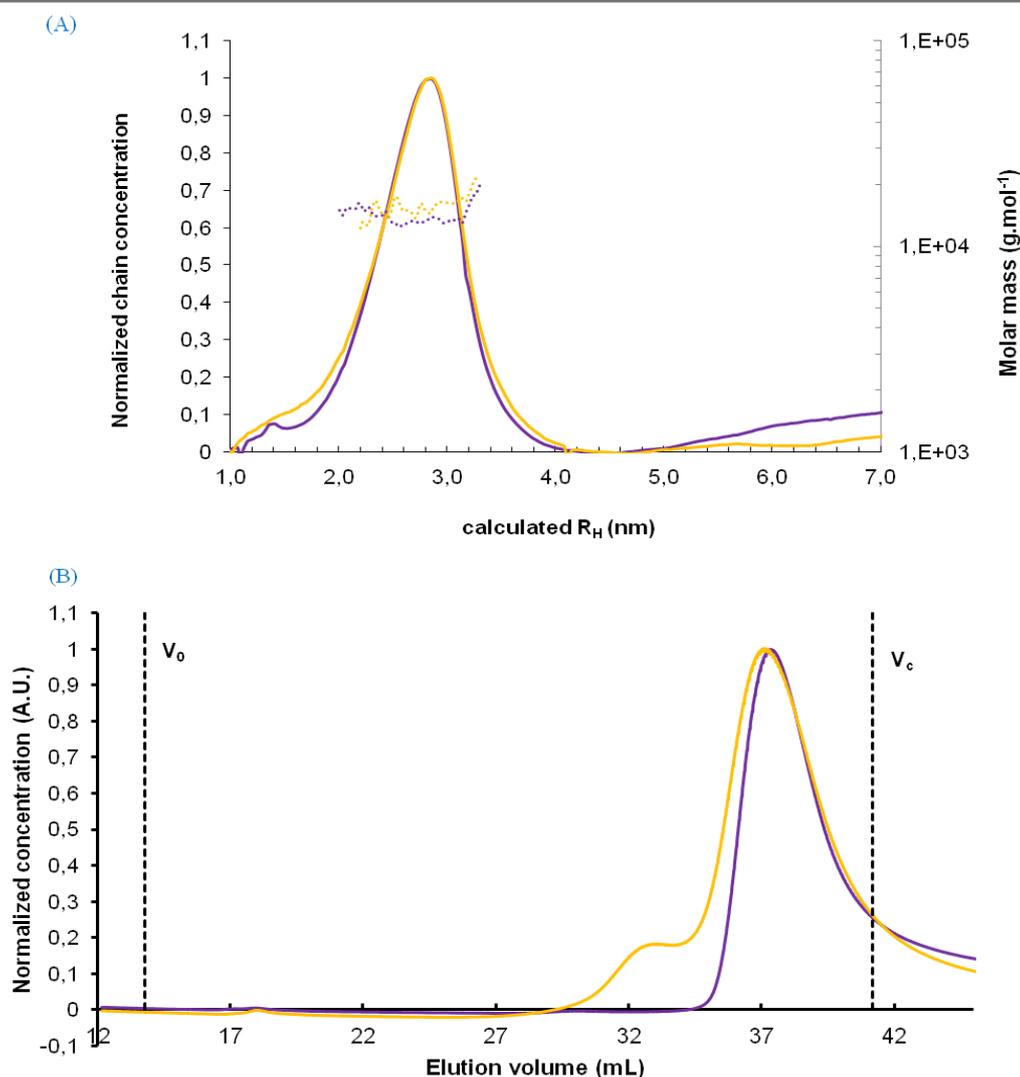


Figure 3.7: (A) Size (R_H) and molar mass distributions of PINB-D1a Paledor (*purple*) and PINB-D1b Recital (*orange*) obtained using AF4-MALLS-DRI with 100 mM phosphate buffer pH=7.2. *Full lines* represent the normalized concentration (obtained from DRI values). *Dotted lines* represent the molar masses. (B) HP-SEC (BIO-GelA, 1.5M) elugrams of PINB-D1a (cv Paledor) (*purple*) and PINB-D1b (cv Recital) (*orange*) obtained with 20 mM phosphate pH=7.2 with 0.1M NaCl. V_0 is the column void volume (35 mL) and V_c is the column geometric volume (103 mL).

As shown by FTIR (Clifton et al., 2007b), the global folding of the proteins is not impacted by these single mutations. Nevertheless, the hydrophobicity of the complete Trp-rich domain and its flexibility, due to hydrogen bonds between serine or arginine and other polar amino acids, are modified and could account for their reversible aggregative behaviour. The PINB variants used in this work display mutations only in the tryptophan-rich domain. It is noteworthy that in the hard protein variant PINB-D1c, the Leu60Pro mutation is located in another domain (Lillemo and Morris, 2000), named the hydrophobic domain, that could be also involved in PIN self-assembly (Alfred et al., 2014). Whatever the reversibility of

PINB self-assembly under shear stress, it is noteworthy that the different aggregative behaviour between wild type PINB and natural mutants is associated to endosperm texture.

Heteromeric self-assembly of PINA and PINB

Owing to the interactions observed between PIN proteins in yeast two-hybrid experiments ([Alfred et al., 2014](#); [Ziemann et al., 2008](#)) and the cooperative impact of these proteins on grain hardness ([Wanjugi et al., 2007b](#)) we investigated the aggregative properties of PINA-PINB mixtures. Using DLS, two protein systems, i.e. PINA-D1a/PINB-D1a and PINA-D1a/PINB-D1b, that mimic conditions encountered in soft and hard cultivars, were characterized (**Figure 3.8**).

Remarkably, at the three weight ratio (the weight ratio is close to the molar ratio since the molecular mass of PIN proteins are almost identical) of the hard-like PIN mixture, only large aggregates were observed suggesting that PINA-D1a/PINB-D1b form heteromeric assemblies. Furthermore, the large aggregates displayed by the hard version of PINB, i.e. PINB-D1b, remained as such even in the presence of an excess of PINA (**Figure 3.8B**). Indeed, the PINA-D1a/PINB-D1b ratio 4:1 (w:w) is the ratio found for Recital cultivar. As for pure PINB-D1b, the large aggregates reverse to lower aggregates after filtration. For mixed soft PINA and PINB proteins, the DLS resolution of low sized particles is not sufficient as mentioned above for the pure proteins. However, the increase or decrease of PINA/PINB ratio induced a slight but significant shift of particle size distribution. Indeed, at the PINA/PINB ratio 1:1 and 4:1 (w:w) of the soft like PIN mixture, the size distribution is intermediate between pure PINB and pure PINA (**Figure 3.8A**). At the PINA/PINB ratio 1:4 (w:w) the particle size distribution is almost identical to that of the pure WT PINB. As observed for the pure proteins, the particle size distributions of PIN mixtures are polydisperse, i.e. with a Pdl of 0.5 ± 0.1 . Since AF4 allowed to reveal the presence of monomers and dimers for the corresponding PINB-D1a and PINB-D1a dispersions, the results suggest that homomeric and heteromeric structures could coexist in the mixed protein dispersions. Finally, these experiments on mixed PIN dispersions show that PINA and PINB proteins can interact and that each PINB acts on the aggregation of PINA.

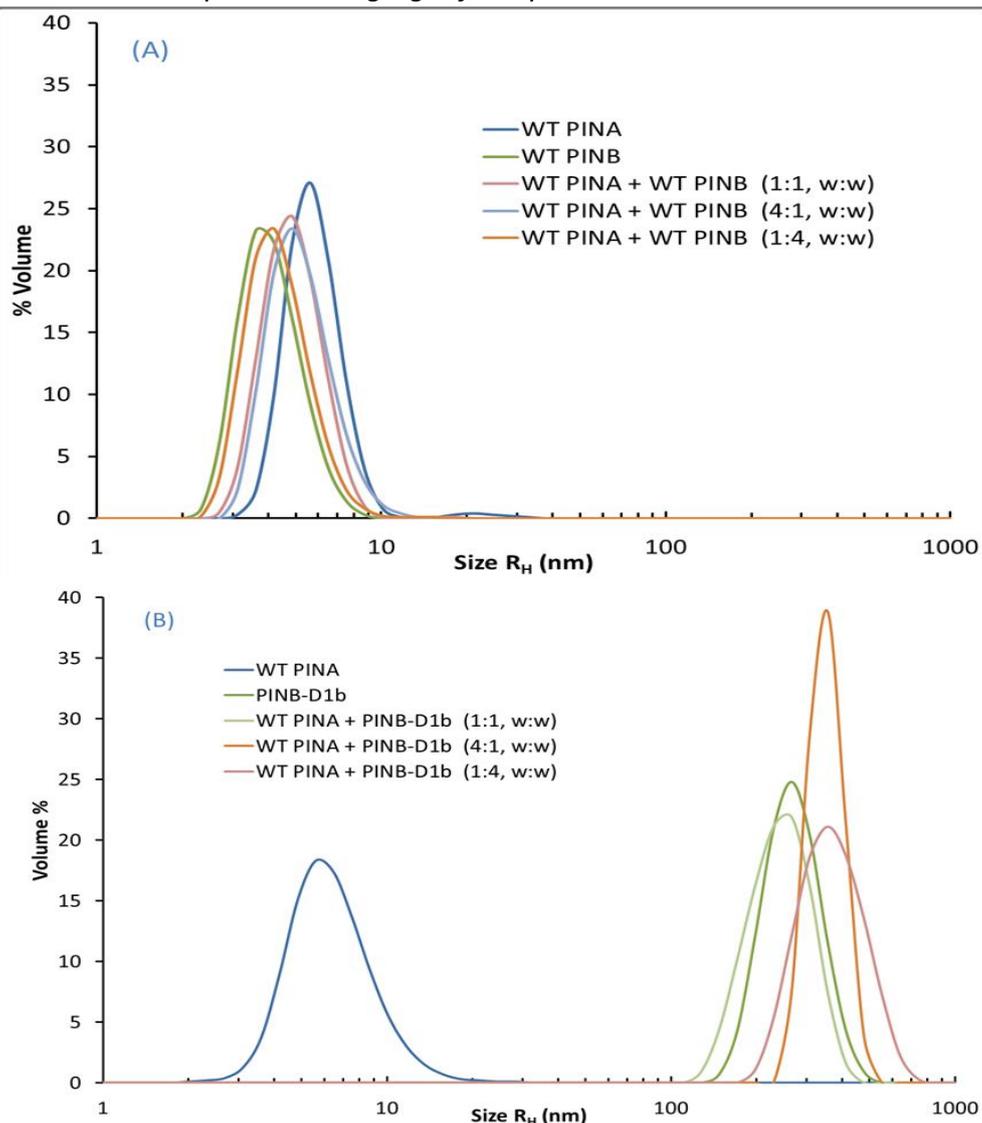


Figure. 3.8. Size (R_H) obtained for solution of PINA-PINB mixtures in 20 mM phosphate buffer pH 7.2. (A) PINA-D1a Paledor (WT PINA), PINB-D1a Paledor (WT PINB), and three weight ratio of WT PINA/WT PINB. (B) PINA-D1a Recital (WT PINA), PINB-D1b Recital (PINB-D1b) and three weight ratio of WT PINA/PINB-D1b.

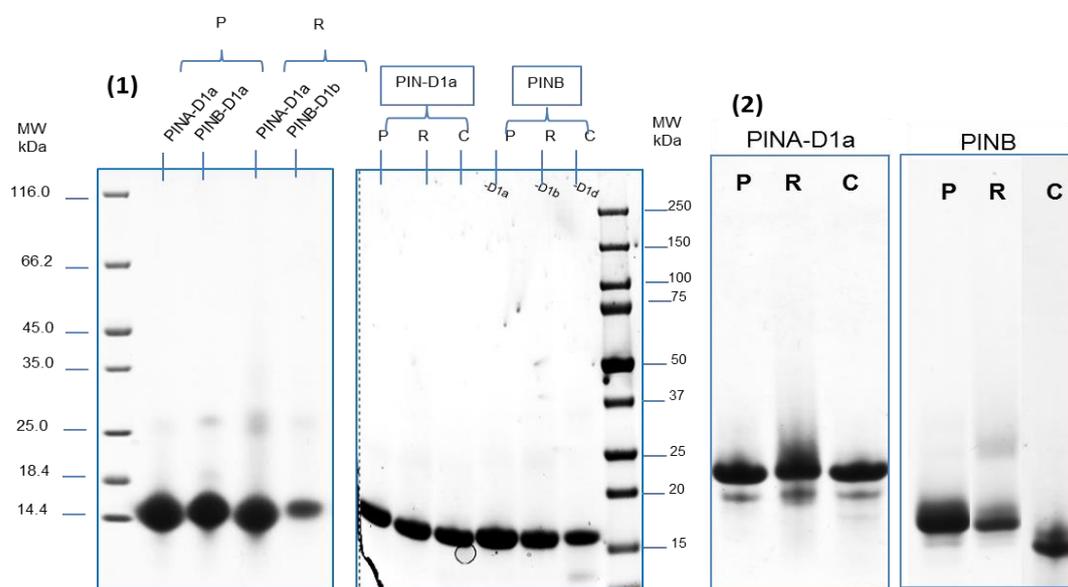
3.4. Conclusion

In solution, PINs form aggregates that are polydisperse in size. A significant proportion of PINA self-associates into dimers while different aggregative properties are displayed by PINB proteins. Indeed, wild type PINB, i.e. PINB-D1a, tends to form monomers while PINBs from hard varieties, i.e. PINB-D1b and PINB-D1d, form large aggregates. The aggregative properties of mixed protein dispersions show that PINB proteins interfere with PINA aggregation in good agreement with the independence of these proteins on grain hardness. The large aggregates can reverse to aggregates of lower size by applying shear forces. This

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

suggests that the aggregative properties of PINs and especially those of PINB could be governed by both weak interactions and subtle conformational changes. Whatever the physicochemical basis of the effect of puroindolines on grain hardness, our results show that a single mutation can strongly impact puroindoline self-assembly, a property which must be now considered when one relates this protein family to the endosperm texture as well as to other functional properties, e.g. antimicrobial and foaming properties..

3.5. Supplemental data



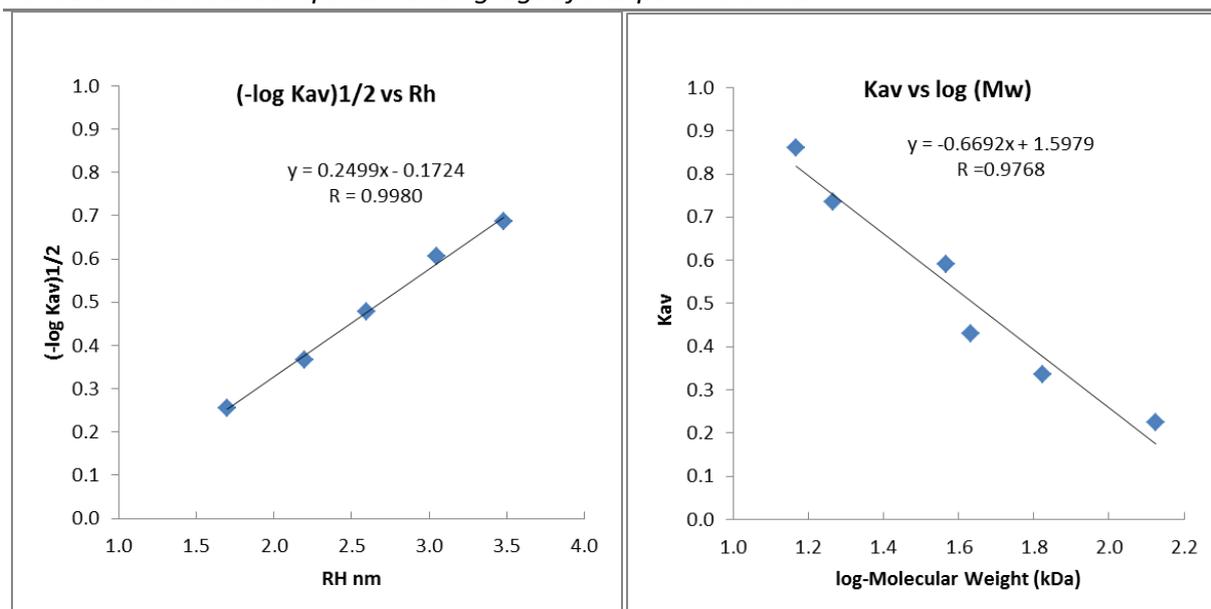
Supplemental figure 3A: (1) SDS-PAGE analysis of PINs purified by the first method (Elmorjani et al, 2013). (P) Paledor, (R) Recital and (C) Courtot. The size of the protein was estimated against protein molar masse markers (MW kDa). **(2)** Acid-PAGE analysis of PIN (P) Paledor, (R) Recital and (C) Courtot.

Supplemental table: Comparison R_H calculated from AF4-MALLS-DRI and DLS obtained for PINa-D1a (Paledor and Recital) in 20 or 100 mM phosphate buffer pH 7.2.

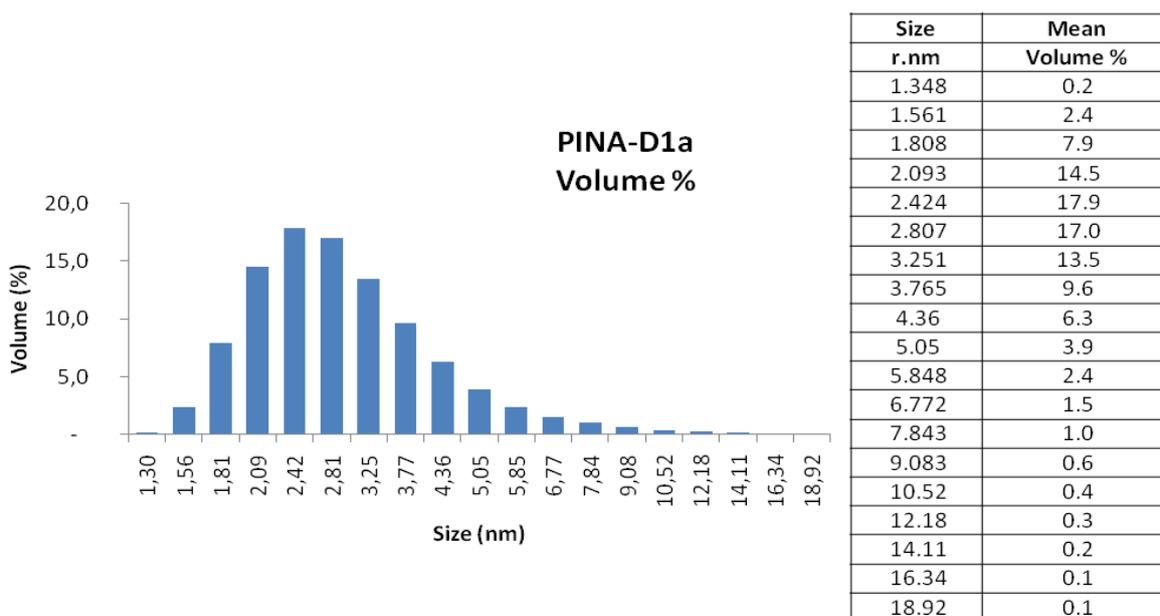
	Sample	AF4			DLS	
		Phosphate buffer (mM)	Mass recovery (%)	Mw (kDa)	R_H (nm)	R_H (nm)
Paledor	PINa-D1a	20	21	ND	ND	2.8
	PINa-D1a	100	48	27	5	3.2
Recital	PINa-D1a	20	26	ND	ND	2.8
	PINa-D1a	100	50	28	4.4	3.8

NDnon determined

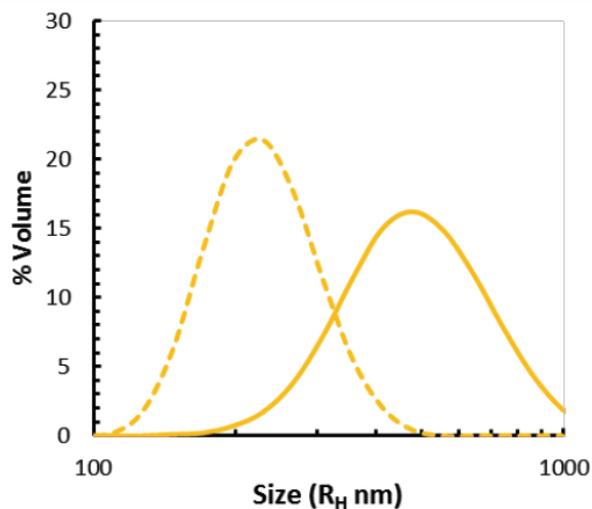
Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines



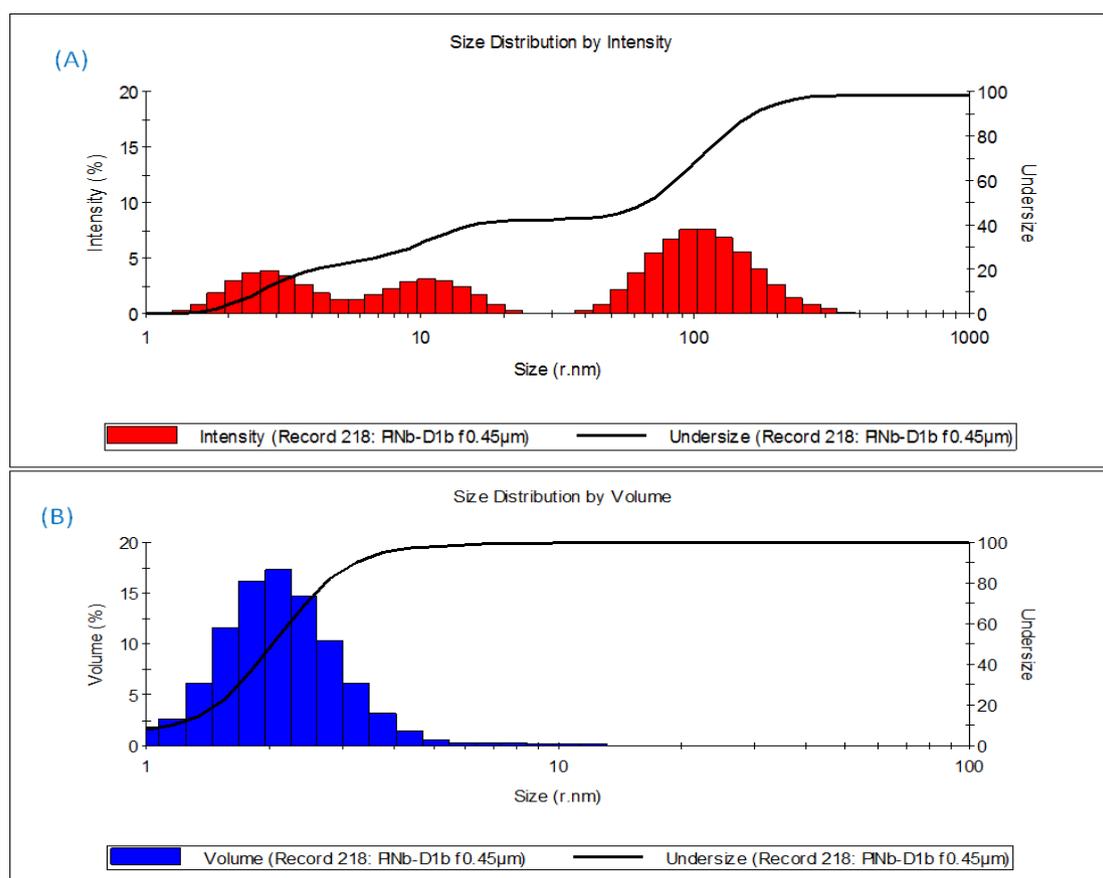
Supplemental figure 3B: The Hydrodynamic radius (R_H) and Molar Mass (Mw) were obtained to compare samples and standards Kav; $[-\log(Kav)]^{1/2}$ versus R_H (nm) and Log (Mw) versus Kav.



Supplemental figure 3C: Particle size distribution by volume for PINB-D1a Paledor, in 20mM phosphate buffer pH 7.2 measured by DLS. The values are expressed as mean of five measurements.



Supplemental figure 3D: Comparaison of size (R_H) of PINB-D1b recital purified with CMC (*dashed*) ([Day et al., 2006](#)) and purified by method described by ([Elmorjani et al., 2013](#)) (*continuous*) in 20 mM phosphate buffer pH 7.2 measured by DLS. The values are expressed as mean of five measurements.



Supplemental figure 3E: Particulate size distribution by intensity (A) and volume (B) of PINB-D1b (Recital) solution in 20 mM phosphate buffer pH 7.2 measured by DLS. The solution was filtrated 0.45 μm . The values are expressed as mean of five measurements.

4. Références

- Alfred, R.L., Palombo, E.A., Panozzo, J.F., and Bhave, M. **2014**. The co-operative interaction of puroindolines in wheat grain texture may involve the hydrophobic domain. *Journal of Cereal Science*. 60: 323-330.
- Bhave, M., and Morris, C.F. **2008a**. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant molecular biology*. 66: 205-219.
- Bhave, M., and Morris, C.F. **2008b**. Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications. *Plant molecular biology*. 66: 221-231.
- Blochet, J.E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.F., Joudrier, P., Pezolet, M., and Marion, D. **1993**. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett*. 329: 336-340.
- Clifton, L.A., Green, R.J., and Frazier, R.A. **2007a**. Puroindoline-b mutations control the lipid binding interactions in mixed puroindoline-a:puroindoline-b systems. *Biochemistry*. 46: 13929-13937.
- Clifton, L.A., Lad, M.D., Green, R.J., and Frazier, R.A. **2007b**. Single amino acid substitutions in puroindoline-b mutants influence lipid binding properties. *Biochemistry*. 46: 2260-2266.
- Clifton, L.A., Sanders, M.R., Castello, V., and Frazier, R.A. **2011a**. Puroindoline-a, a ligand binding protein from common wheat, spontaneously forms prolate protein micelles in solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13: 8881-8888.
- Clifton, L.A., Sanders, M.R., Hughes, A.V., Neylon, C., Frazier, R.A., and Green, R.J. **2011b**. Lipid binding interactions of antimicrobial plant seed defense proteins: puroindoline-a and b-purothionin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13: 17153-17162.
- Day, L., Bhandari, D.G., Greenwell, P., Leonard, S.A., and Schofield, J.D. **2006**. Characterization of wheat puroindoline proteins. *The FEBS journal*. 273: 5358-5373.
- Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K., and Marion, D. **2000**. Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. *Journal of Cereal Science*. 32: 1-20.
- Dubreil, L., Compoin, J.P., and Marion, D. **1997**. Interaction of Puroindolines with Wheat Flour Polar Lipids Determines Their Foaming Properties. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*,. 45: 108-116.
- Dubreil, L., Garorit, T., Bouchet, B., Gallant, D., Broekaert, W., Quillien, L., and Marion, D. **1998**. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein(ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science*. 138: 121-135.
- Dubreil, L., Vie, V., Beauvils, S., Marion, D., and Renaud, A. **2003**. Aggregation of Puroindoline in Phospholipid Monolayers Spread at the Air-Liquid Interface. *Biophysical Journal*,. 85: 2650-2660.
- Elmorjani, K., Geneix, N., Dalgalarrrondo, M., Branlard, G., and Marion, D. **2013**. Wheat grain softness protein (Gsp1) is a puroindoline-like protein that displays a specific post-translational maturation and does not interact with lipids. *Journal of Cereal Science*,. 58: 117-122.

Partie 3. Résultats-Comportement agrégatif des puroindolines

- Elmorjani, K., Lurquin, V., Lelion, A., Rogniaux, H., and Marion, D. **2004**. A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 316: 1202-1209.
- Gautier, M.F., Aleman, M.E., Guirao, A., Marion, D., and Joudrier, P. **1994**. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant molecular biology*. 25: 43-47.
- Giroux, M.J., and Morris, C.F. **1998**. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6262-6266.
- Laemmli, U.K. **1970**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Le Guernevé, C., Seigneuret, M., and Marion, D. **1998**. Interaction of the Wheat Endosperm Lipid-Binding Protein Puroindoline-a with Phospholipids. *Archives of biochemistry and biophysics* 360: 179-186.
- Lesage, V.S., Bouchet, B., Rhazi, L., Elmorjani, K., Branlard, G., and Marion, D. **2011**. New insight into puroindoline function inferred from their subcellular localization in developing hard and soft near-isogenic endosperm and their relationship with polymer size of storage proteins. *Journal of Cereal Science*. 53: 231-238.
- Lesage, V.S., Merlino, M., Chambon, C., Bouchet, B., Marion, D., and Branlard, G. **2012**. Proteomes of hard and soft near-isogenic wheat lines reveal that kernel hardness is related to the amplification of a stress response during endosperm development. *Journal of experimental botany*. 63: 1001-1011.
- Lillemo, M.C., and Morris, C.F. **2000**. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor Appl Genet*. 100: 1100-1107.
- Morris, C., Lillemo, C., Simeone, M., Giroux, M., Babb, S., and Kidwell, K. **2001**. Prevalence of Puroindoline Grain Hardness Genotypes among Historically Significant North American Spring and Winter Wheats. *Crop science*. 41: 218-228.
- Morris, C.F. **2002**. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant molecular biology*. 48: 633-647.
- Pauly, A., Pareyt, B., Fierens, E., and Delcour, J.A. **2013**. Wheat (*Triticum aestivum* L. and *T. turgidum* L. ssp. *durum*) Kernel Hardness: I. Current View on the Role of Puroindolines and Polar Lipids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12: 413-426.
- Rolland-Sabate, A., Colonna, P., Mendez-Montealvo, M.G., and Planchot, V. **2007**. Branching features of amylopectins and glycogen determined by asymmetrical flow field flow fractionation coupled with multiangle laser light scattering. *Biomacromolecules*. 8: 2520-2532.
- Rolland-Sabate, A., Guilois, S., Grimaud, F., Lancelon-Pin, C., Roussel, X., Laguerre, S., Vikso-Nielsen, A., Putaux, J.L., D'Hulst, C., Potocki-Veronese, G., and Buleon, A. **2014**. Characterization of hyperbranched glycopolymers produced in vitro using enzymes. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 406: 1607-1618.
- Wanjugi, H.W., Hogg, A.C., Martin, J.M., Giroux, M.J., and **2007b**. The role of puroindoline A and B individually and in combination on grain hardness and starch association. *Crop Sci* 47: 67-76.
- Ziemann, M., Ramalingam, A., and Bhave, M. **2008**. Evidence of physical interactions of puroindoline proteins using the yeast two-hybrid system. *Plant Science*. 175: 307-311.

Partie 4. Résultats

Interactions puroindolines-gliadines

1. Résumé

La dureté du grain est un trait de qualité important qui détermine les propriétés de fractionnement du blé et les utilisations ultérieures finales de la farine. La dureté du blé est liée à la compacité de la matrice amylo-protéique de l'albumen, principal tissu de réserve du grain. La matrice protéique est la résultante de l'agrégation des monomères de gliadines et des polymères de gluténines qui se déroule tout au long du développement de l'albumen. La dureté du blé est génétiquement contrôlée par un locus majeur (locus *Ha*) situé sur le bras court du chromosome 5D contenant notamment les gènes des PINs (Morris et al., 2001; Morris, 2002). Les mécanismes physico-chimiques qui sous-tendent les relations entre les PINs (notamment PINA et PINB) et la dureté du grain sont encore controversés. La seule hypothèse qui prévaut actuellement, suggère que les PINs en interagissant avec la surface des grains d'amidon empêcheraient l'adhésion des protéines à leur surface. Cette adhésion des PINs à la surface des grains d'amidon serait dépendante des lipides situés à leur surface en lien avec la capacité des PINs à interagir *in vitro* avec différents types de lipides. Ces hypothèses sont basées principalement i) sur le fait qu'au contraire des blés « soft », on retrouve peu ou pas de PINs sur les grains d'amidons isolés des blés « hard » (Morris, 2002) et ii) sur des observations en microscopie de fluorescence montrant qu'à maturité physiologique les PINs sont localisées autour des grains d'amidon (Feiz et al., 2009b). En fait, cette hypothèse ne prend pas en compte le fait que seule une faible proportion des PINs se retrouve à la surface de l'amidon, la majorité étant retrouvée dans la fraction gluten au cours de l'extraction de l'amidon (Jolly et al., 1993). Par ailleurs, la résolution de la microscopie de fluorescence ne permet pas de bien distinguer l'immunomarquage des PINs dans la matrice protéique de celui situé à la surface du grain d'amidon. La microscopie électronique à haute résolution a montré que la majorité des PINs étaient associée à la matrice protéique dans le grain à maturité physiologique et qu'au cours du développement de l'albumen, les protéines de réserve (les prolamines) et les PINs suivent le même routage à travers la voie sécrétoire (réticulum endoplasmique, corps protéique et fusion dans la vacuole) (Dubreil et al., 1998b). En outre, en utilisant des lignées isogéniques Falcon pour le caractère de dureté, il a été établi que la taille des polymères de gluténines était étroitement liée à la présence ou l'absence de PINA (Lesage et al., 2011). Ces faits suggèrent que les interactions PINs-prolamines pourraient, en contrôlant l'agrégation des prolamines, être également impliquées dans la compacité de la matrice amylo-protéique et *in*

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

fine dans la dureté du grain. Les prolamines de blé sont généralement divisés en polymères de gluténines et monomères de gliadines (α/β -, γ - et ω - types). Les structures primaires des gliadines présentent un degré élevé d'homologie avec un certain nombre de délétions d'acides aminés et des substitutions. Ces protéines sont constituées de séquences répétées riches en glutamine et proline (à savoir, QPQPFPQQPYP, pour α/β , QPQPFP, pour γ et PQQPFPQQ pour ω) associés à un domaine non répétitif stabilisé par des liaisons disulfures intramoléculaires.

En admettant que la propension agrégative de PINA *in vitro* est bien établie (Clifton et al., 2011; Dubreil et al., 2003) et qu'il faut en tenir compte dans les interactions protéines-protéines (cf. chapitre 3), nous nous sommes concentrés dans ce travail, sur le rôle de la PINA sur la dureté du grain et de ses interactions *in vitro* avec les gliadines. Une étude préliminaire par résonance plasmonique de surface (SPR) a permis de mettre en évidence que la PINA et les gliadines pouvaient interagir entre elles. L'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille (HPSEC), fait ressortir la formation d'agrégats lorsque la PINA est en contact avec les gliadines en solution. Ceci a pu être confirmé et analysé plus finement en combinant notamment des analyses de turbidimétrie et de diffusion de la lumière. Ainsi, la PINA interagit avec les gliadines en formant des particules de grandes tailles et les courbes de titration obtenues en turbidimétrie montrent que cette interaction est un phénomène hautement coopératif. Ceci suggère un phénomène de nucléation impliquant certaines gliadines qui pourraient ensuite provoquer l'agrégation des autres prolamines. Ces interactions impliqueraient le domaine répétitif des gliadines. Ces résultats obtenus *in vitro* doivent être analysés au vue de l'observation que la surexpression de PINA dans un fond génétique de blé « hard » entraîne une diminution de la dureté du grain. Par ailleurs, cette diminution est quasi proportionnelle à la quantité de PINA sans changement apparent de la composition et de la teneur des principaux composés du grain. De fait, une augmentation de la PINA pourrait se traduire par un changement de l'agrégation des prolamines et *in fine* par un changement de la cohésion entre la matrice protéique et les grains d'amidon.

2. Mise en évidence des interactions PINA-gliadines par SPR.

Le couplage a été effectué avec la PINA purifiée (PINA-D1a) sur une interface CM5 (Sensor-chips, Biacore). Un tampon HBS-EP (Hepes 10 mM pH 7,4, EDTA 3 mM, NaCl 0,15 M, Nonidet P20 0,05%) et une solution NaOH 10 mM ont été utilisés respectivement comme tampon d'éluion et solution de régénération pour toutes les expériences d'interactions, réalisées à 25° C et à débit constant de 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La protéine est couplée sur un des deux canaux, à un niveau d'immobilisation choisi de 500 RU, le deuxième canal, ne contenant pas de protéine couplée, est utilisé comme référence. Trois solutions de gliadines purifiées α -, β -, et γ -gliadines ont été testées pour les mesures d'interactions avec la PINA-D1a couplée à la chips. Les gliadines purifiées sont solubilisées à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans une solution éthanol-eau 50 : 50 puis diluées à 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le tampon d'éluion HBS-EP (pH 7,4). L'éthanol dans la solution diluée de gliadine n'est plus qu'à 1%. Aucune interaction avec la PINA couplée n'a été enregistrée même en augmentant la concentration. Par contre lorsque l'on diminue le pH du tampon d'éluion (pH 5), une interaction des gliadines avec la PINA est observée, avec un signal SPR augmentant en fonction des concentrations de gliadines injectées et plus particulièrement de l' α -gliadine (**Figure 4.1**). L'absence de réponse des gliadines à pH 7,4 pourraient s'expliquer par une précipitation ou une agrégation de ces protéines lorsque les dilutions sont effectuées dans ce tampon. L'idéal pour mesurer les interactions des gliadines avec la PINA est de travailler en couplant les gliadines solubles à pH acide ou avec des peptides mimant les séquences répétées des gliadines (plus solubles à pH neutre). La deuxième solution a été choisie et les résultats sont donnés ci-après dans l'article soumis à publication.

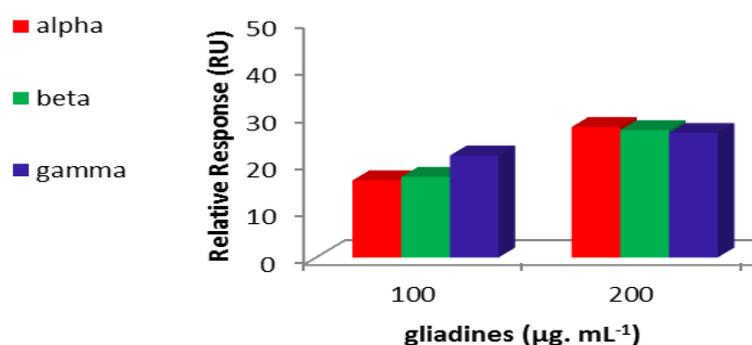


Figure 4.1: Réponse SPR de l'interaction de PINA-D1a couplée à 500 RU sur une CM5 avec 100 et 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d' α -gliadines (rouge) β -gliadines (vert) et γ -gliadines (bleu).

3. Mise en évidence des interactions PINA-gliadines par HPSEC

La colonne (1 cm x 42 cm) est remplie avec un gel Bio-Gel® A-1,5 gel (Biorad, France), permettant de fractionner les protéines de taille comprise entre 10 000-1 500 000 Daltons. Le tampon d'élution utilisé est du phosphate de sodium 0,02 M, pH 7,2, NaCl 0,1 M. L'analyse HPSEC des PINs associées ou non avec les gliadines est effectuée en injectant 150 µg de gliadines et/ou 30 µg de PINA à un débit de 0,2 mL. min⁻¹. Une double détection des protéines à 280 nm et 214 nm est réalisée. Les résultats des différentes chromatographies sont donnés dans la **Figure 4.2**.

Les mélanges préparés entre la PINA et les gliadines donnent des pics dont les temps d'élution sont plus courts que pour la PINA (**Tableau 4.1**). Le pic élué à 70 min (**Figure 4.2a**) pour le mélange gliadine totale/PINA correspondant à une masse calculée de 59 kDa qui pourrait être l'association des deux masses obtenues pour les protéines non mélangées, si on exclut des phénomènes d'interactions non spécifiques avec le support chromatographique. Toutefois, on peut noter que l'on ne retrouve pas le pic d'élution de la PINA, totalement associée avec les gliadines totales. Pour le mélange α -gliadine/PINA, le temps d'élution des pics obtenus sont plus longs que le temps du pic de l' α -gliadine (**Figure 4.2b**). Le profil HPSEC montre la présence du pic d'élution de la PINA et deux autres pics correspondant à des masses calculées de 26 et 22 kDa environ. Ces résultats montrent que la PINA s'associe aux gliadines pour former des agrégats de taille variable selon les gliadines.

Le gel utilisé pour l'HPSEC ainsi que l'utilisation de NaCl dans le tampon d'élution permet en théorie de limiter les interactions non spécifiques avec le support et notamment les phénomènes d'adsorption. Cependant, le passage successif des échantillons a entraîné des problèmes de rétention dans la colonne qui rendaient difficile la répétabilité des expérimentations.

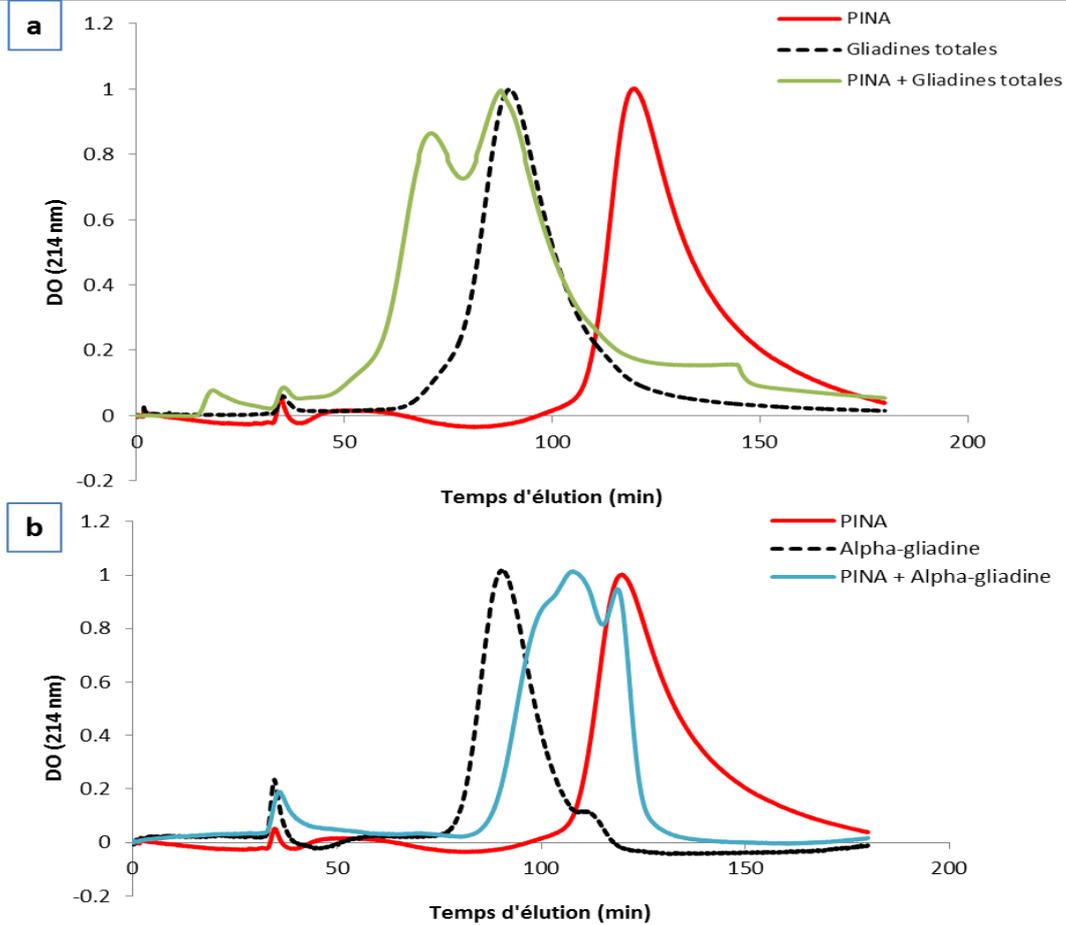


Figure 4.2: Profils normalisés HPSEC (a) des gliadines totales et du mélange gliadines totales associées à la PINA ou (b) de l' α -gliadine seule et du mélange α -gliadine associé à la PINA.

Tableau 4.1 : Masses moléculaires et rayons de Stokes calculés

	Temps d'éluion (min)	Mw calculé (Kda)	RH calculé (nm)
PINA	119.7	15.9	1.4
GT	89.6	35.3	2.4
α -gliadine	91	33.9	2.4
PINA + GT	70-87	59-37.8	3.1-2.5
PINA + α -gliadine	101-107-118	26.2-22.3-16.7	2.0-1.8-1.4

4. Article (soumis): Dose-response effect of puroindoline A on grain hardness and possible relationships with prolamin aggregation.

4.1. Introduction

Grain hardness is a major quality trait that determines the milling properties of wheat and subsequent end-uses of flour. Wheat hardness is related to the compactness of the endosperm starch-protein matrix, i.e. to adhesion strength between starch granules and the protein matrix. The protein matrix is composed mainly by aggregation of monomeric gliadins and polymeric glutenins. Hardness is genetically controlled and the corresponding major locus (*Ha* locus) is located on the short arm of chromosome 5D, containing the puroindoline genes (Morris et al., 2001; Morris, 2002). Two major proteins are expressed, puroindoline A (PINA) and puroindoline B (PINB). PINA and PINB are small (approximately 13 kDa) cationic proteins (pI around 10), containing five disulfide bonds and a tryptophan-rich-domain (TRD). TRD contains 5 Trp in PINA and 3 Trp in PINB (Bloch et al., 1993a; Gautier et al., 1994). Deletion of *Pina-D1* gene or single mutation of *Pinb-D1* gene is associated with a hard phenotype while the presence of both *Pina-D1a* and *Pinb-D1a* genes is associated with the soft phenotype (Morris, 2002). Single mutations can affect the TRD domain (*Pinb-D1b*, *Pinb-D1d*) or a small hydrophobic domain (*Pinb-D1c*). Null mutations of *Pinb-D1* gene, which is also associated to a hard phenotype, are due to the insertion of a stop codon in the coding sequence leading to the absence of PINB expression (Bhave and Morris, 2008; Feiz et al., 2009a; Morris, 2002).

The physico-chemical mechanisms underlying the relationships between PINs and grain hardness are still debated. Originally, it was observed that the 15 kDa proteins, named friabilins, were absent on the surface of starch granules isolated from hard wheat while they are present on starch granules isolated from soft wheat. It was suggested that friabilins could prevent adhesion of the protein matrix to starch granules (Greenwell and Schofield, 1986). When it turned out that friabilins were mainly composed of puroindolines (Oda and Schofield, 1997), proteins that strongly bind to membrane wheat lipids *in vitro* (Dubreil et al., 1997; Le Guernevé et al., 1998). Consequently it was suggested that the interactions between lipids and puroindolines could play a major role in grain hardness (Douliez et al., 2000; Morris, 2002). This hypothesis was strengthened by previous results that showed similar partition of friabilin and polar lipids at the surface of starch granules in soft and hard wheat (Greenblatt et al., 1995) and afterwards by the lower penetration of mutated PINB into anionic phospholipid monolayers (Clifton et al., 2007a).

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

However, numerous facts do not fit well with this assertion. First, during starch extraction only a small part of friabilin/puroindoline was found onto the starch granule surface while most friabilins/puroindolines were recovered in the gluten fraction (Jolly et al., 1993). Secondly, high-resolution electron microscopy showed that the majority of PINs was associated with the protein matrix and during endosperm development, storage proteins, i.e. prolamins, and puroindolines followed the same route through the secretory pathway, protein bodies and vacuoles (Dubreil et al., 1998a). Furthermore, using isogenic Falcon lines, it was established that glutenin polymer size is closely related to the presence or absence of PINA (Lesage et al., 2011). These facts suggest that puroindoline-prolamin interactions could be also involved in the compactness of the starch-protein endosperm matrix and in fine in grain hardness.

Wheat prolamins are commonly divided into polymeric glutenins (high and low-molecular types) and monomeric gliadins (α/β -, γ -, and ω - types). The primary structures of gliadins show a high degree of homology, with a number of amino acid deletions and substitutions. These proteins consist of repetitive sequences rich in glutamine and proline (i.e., QPQFPQQPYP, QPQQPFP, PQQPFPQQ for α/β -, γ -, and ω - type gliadins, respectively) associated to a non-repetitive domain stabilized by intramolecular disulphide bonds. Glutenin polymers involved intermolecular disulfide bonds between the high and low molecular weight subunits and glutenins also contain also proline-rich repetitive domains (Tatham and Shewry, 2012). It is worthy to recall that proline-rich polypeptides are known to interact with tryptophan protein side chains (Macias et al., 2002; Pires et al., 2001).

In regard to both mechanisms, i.e. lipid-protein or protein-protein interactions, it turns essential to take into account protein-protein interactions since aggregative propensity of PINA *in vitro* is well established (Clifton et al., 2011; Dubreil et al., 2003). We have recently demonstrated that a single mutation in PINB can strongly impact puroindoline self-assembly. Indeed, in aqueous media, mutated PINB proteins assemble in large aggregates while PINA and wild type PINB form small aggregates (Geneix et al., 2015). Furthermore, even in excess of PINA, PINA-PINB interactions lead to the formation of large aggregates that could account for dominance of PINB mutations or PINA deletions that lead to a hard phenotype. In regard to these aggregative properties, the extent of lipid monolayer penetration, when PINA and PINB mixtures were used, is significantly less in presence of mutated PINB than in the presence of wild type PINB (Clifton et al., 2007b). Consequently these aggregative properties may also impact the interactions of puroindolines with prolamins on their common route to form the starch-protein matrix during endosperm development.

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

In this work, we focused on the role of PINA on grain hardness and its interactions in vitro with gliadins. We showed that overexpression of PINA in a hard wheat genetic background decreased grain hardness in a dose-response way while it did not change contents and composition of lipids and proteins the possible targets of PINA. Furthermore, it was shown that PINA interacted with gliadins and that these interactions could involve the repetitive domain of α -gliadin. These results combined with the fact that PINA are mainly partitioned within the endosperm protein matrix open new hypothesis concerning the role of these proteins on grain hardness.

4.2. Materials and methods

Materials

All high quality chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and Merck. Isolated wheat proteins, i.e. PINA, total gliadins fraction and α - and γ -gliadins) were purified from the Hard wheat *Triticum aestivum* cultivar Recital provided by INRA (Le Rheu, France). PINA was purified and characterized as previously described ([Geneix et al., 2015](#)).

Genetic constructs and production of transgenic wheat lines

The gene specifying the PINA protein was isolated from the wheat "Renan" variety. Indeed, this variety harbors a wild type *Pina* gene, i.e. *Pina-D1a*. The wheat cultivar Courtot was chosen as the starting genetic background because its endosperm is particularly "hard". Indeed, it bears a mutant version of the *pinb* gene (*Pinb-D1d*), where a mutation leads to the substitution of a tryptophan side chain by an arginine at position 44, i.e. in the TRD that determines the physicochemical properties of PINs ([Douliez et al., 2000](#)).

After cloning and sequencing, the *PinaD1a* gene from the wheat cultivar Renan was inserted in the expression vector under the control of Bx7 promotor which controls the expression of a wheat high molecular weight glutenin allowing thus both specific and significant levels of expression in the starchy endosperm.

Once obtained and amplified, this genetic construction was introduced by biolistic into immature embryos of Courtot cultivar collected at 15 days after anthesis. After regeneration and selection, two years were required to obtain transgenic T4 generations, the most stable genetically. All the subsequent characterizations were done on these transgenic T4 generations. Plant were sown in pots and grown in a greenhouse with natural photoperiod under irrigated

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

conditions. At anthesis, ears were tagged and air temperatures were recorded every 30 min in four locations near the spikes in the greenhouse. Daily average temperatures were registered allowing the expression of grain development in thermal time ($^{\circ}\text{Cd}$).

Grain hardness

Grain hardness values were determined by NIRS (AACC method, 39-70A, 1999) from wholemeal flour ground in a Cyclotec 14920 mill (Hilleröd, Denmark). For particle size index, flour was sieved on 0.075 mm sieve for 10 minutes using sieve shaker. The sieve throw are weighed and PSI value are determined as percent mass of the flour sample.

Protein and lipid contents

Protein content was determined using Kjeldhal method and lipid contents, i.e. starch and non-starch lipids were determined as fatty methyl esters by gas chromatography ([Gayral et al., 2015](#)). Puroindoline contents were determined by ELISA according to a previously described procedure ([Turnbull et al., 2000](#)).

Extraction of gliadins

The wheat flour (500 g) was defatted with 2.5 L of cold acetone during one hour. After filtration on a Buchner funnel, the slurry was re-extracted with 2 L of methylene chloride overnight at room temperature followed by filtration. The defatted flour was dried overnight under fume hood. The defatted flour was stirred for 2 hours at 4°C with 2 L of 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.3 M NaCl and 5 mM EDTA. The solution was centrifuged at 8,000 rpm for 30 min and the pellet washed twice with deionised water. After centrifugation, gliadins were extracted by stirring the pellet with 2 L of 70% ethanol for 1.5 hours at 4°C . The solution was centrifuged at 8,000 rpm for 30 min. Gliadins were precipitated overnight at -20°C from the supernatant with 5 volumes acetone. The protein pellet was then washed twice with deionised water to remove residual acetone and freeze-dried.

Purification of α and γ -gliadins

Total gliadin fraction was fractionated by ion-exchange chromatography (IEC) on Sulphopropyl Ceramic Hyper D (10 x 90 cm column) with 0.01 M lactate pH 3.6, 0.5 M urea as equilibrium buffer and eluted with a gradient with the lactate-urea buffer containing 1 M NaCl as described by ([Popineau and Pineau, 1985](#)). The different fractions were dialyzed twice against water containing 0.01 M acetic acid and freeze-dried. After acid-PAGE the α -gliadin

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

fraction was fractionated by size exclusion chromatography (SEC) on preparative Sephacryl High Resolution column (S100, 50 x 100 cm) with 0.01 M lactate pH 3.6, 0.5 M urea as elution buffer.

γ -gliadins were purified from the Triton X-114 phase partitioning method used to extract puroindolines ([Elmorjani et al., 2013](#)). Briefly, the freeze-dried acetone protein powder of the detergent-rich phase was diluted in 50 mM acetic acid and the soluble fraction was fractionated by SEC on a column packed with Sephadex G50 (100 cm x 5cm, GE Healthcare). Fractions containing γ -gliadins were controlled by SDS-PAGE, pooled and dialyzed against deionized water and lyophilized. The γ -gliadins were subsequently purified by semi-preparative reversed-phase HPLC using a column (250 x 10 mm) packed with NUCLEOSIL® 300-5-C4 (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The C4 column was equilibrated with 80% solvent A (containing 0.11% (v:v) trifluoroacetic acid (TFA)) and 20% solvent B (acetonitrile, 0.09% TFA v:v) at 40°C. Gliadins were eluted with a gradient from 20 to 45% solvent B for 35 min at a flow rate of 3mL.min⁻¹. Proteins were detected at 214 and 280 nm on a dual absorbance detector model 2487 (Waters).

Production of repetitive domain of wheat gliadins

Synthetic gene encoding 8 repeats of the pentapeptide PQQPY was produced and purified as described by Sourice et al (2003), except some modifications for the final step in reversed phase chromatography. Briefly, after cleavage of the thioredoxin-DP-(PQQPY)₈ fusion protein in 70% formic acid the mixture was freeze-dried. The lyophilized powder was resuspended in H₂O containing 0.09% TFA (v/v) and applied to a 6 ml C18-T cartridge (Solid Phase Extraction Strata C18-T, Phenomenex, Torrance, USA) previously equilibrated with solvent A (H₂O, 0.11% TFA v:v) and (PQQPY)₈ fraction was eluted with 40% solvent B (acetonitrile, 0.09% TFA v:v) and analyzed by reversed-phase HPLC as described for the characterization of gliadin extracts. Purity of the synthetic polypeptide was controlled by mass spectrometry (electro-spray ionisation source with ion trap mass spectrometer, ESI-MS, LCQ Advantage Thermo-Finnigan, SanJose, USA), as previously described ([Elmorjani et al., 2004](#)).

Particle size analysis of protein aggregates using dynamic light scattering (DLS) and laser light diffraction.

The particle size of protein aggregates was measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS90 for DLS and a Mastersizer S Instruments (Malvern Instruments, UK) for laser light diffraction. DLS measures hydrodynamic diameters of particle size below 100 nm ([Geneix et al.,](#)

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

2015) and the laser light diffraction measures aggregates ranging from hundreds of nanometers up to several millimeters in size. The angular scattering intensity data is then analyzed to calculate the size of the particles using the Mie theory of light scattering. The analysis requires the relative refractive index of the continuous (water) and the dispersed phase: 1.33 and 1.52, respectively. The particle size is reported as a volume equivalent sphere diameter.

Dilute solutions of PINA and gliadins (0.5 mg mL^{-1}) in 20 mM TRIS-HCl pH 7.2 were measured in a 1 cm path-length spectroscopic plastic cell (BRAND, France) at 25° C and during 30 s for DLS. By using laser light diffraction, 1 mL of concentrated sample PINA/gliadins ratio 1:10 (w:w) was diluted with 15 mL deionised water in the sample dispersion curve under stirring.

Turbidity measurements.

Purified PINA was solubilized at 1 mg mL^{-1} in different buffers . Gliadins were solubilized in 70% ethanol to achieve a final concentration of 20 mg mL^{-1} . The concentration of PINA was calculated by measuring optical density at 280 nm with an UV-spectrophotometer (Perkin Elmer lambda 2) and by using extinction coefficient of PINA ($31,105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ or $2.376 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). The concentration of gliadin solution was adjusted as a function of optical density at 280 nm of standard solution of gliadin (1 mg mL^{-1} , $\text{DO} \approx 0.4$).

Gliadins were diluted at 2 mg mL^{-1} in 20 mM Tris-HCl at pH 7.2, 20 mM malate at pH 5 or 20 mM citrate at pH 5 buffer solutions in the absence or presence of salt (0.1 M NaCl). Increased quantities of PINA were added and after stirring 30 min at room temperature, the optical density at 540 nm of 0.1 mL mixture solution was measured in 96-wells microplate.

Blue Native polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) to probe the specificity of PINA-gliadin interactions.

α and γ -gliadins were suspended at 2 mg mL^{-1} in 20 mM Tris buffer pH 7.2, with 0 or 0.2 mg mL^{-1} of PINA. The solution was stirred for 30 min and diluted in BN-PAGE buffer. BN-PAGE method was used first for separate complexes.

BN-PAGE was performed in a Mini-Protean II cell (BIORAD) using NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Novex, Life technologies). 0.02% Coomassie Blue G250 was added to the cathode buffer (MES 50 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM) BN-PAGE fractionation of complex was performed in a Mini-Protean II cell (Bio-Rad) using 15% separating and 6% stacking polyacrylamide gels. 0.02% of Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB) was added to the cathode buffer (MES 50 mM, Tris 50

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

mM, EDTA 1 mM pH 7.2). 20 μ l of sample were diluted in BN-PAGE buffer containing MES 50 mM, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2 10% glycerol and 0.02% (w/w) bromophenol blue and migration was performed at 100 V until the blue front reached the middle of the gel. The blue cathode buffer was then replaced by anode buffer (MES-Tris-EDTA without CBB) and migration performed at 180 V during 3 hours.

The BN-PAGE was followed by resolution of protein constituents in a second dimension (2D) by SDS-PAGE, for resolution of the complexes into their individual protein subunits.

For this purpose, each lane from BN-PAGE was cut out with a razor blade. Gel strips were equilibrated for 10 min in loading buffer and placed in a SDS-PAGE gel of the same thickness, overlaid with agarose, and run was performed according to standard protocol.

Surface plasmon resonance (SPR)

SPR experiments were carried out at 25 °C using a BIAcore X100 instrument (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). SPR buffers, regeneration solutions and Sensor Chips coated with carboxylated dextran (CM5) were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Analyzed proteins were PINA (cultivar Recital) and (PQQPY)₈ coupled on CM5. The surface of CM5 was activated by injecting a solution of 0.05 M 1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide-hydrochloride and 0.2 M N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS), mixed just prior to injection for 7 min. For protein immobilization, 4 μ g of (PQQPY)₈ polypeptide was injected into one flow cell in 10 mM sodium acetate buffer pH 5 (flow rate: 10 μ L min^{-1}). The other channel received no protein to serve as a control. After immobilization, all flow cells are blocked by injection of 70 μ L of 1 M ethanolamine at pH 8.5 for 6 min, followed by buffer flow for 4 h.

For interaction measurements, various concentrations of PINA were injected at 30 μ L min^{-1} over (PQQPY)₈ immobilized surface in a 10 mM Phosphate Buffer Saline pH 7.4 (PBS). The sensor surface was regenerated between sample injections by washing with 50 mM NaOH for 0.5 min at 30 μ L min^{-1} . Association of PINA was monitored by injection for 2 min and its dissociation by buffer flow for 5 min.

The kinetic parameters (k_a : association rate constant; k_d : dissociation rate constant; $K_D = k_d/k_a$: equilibrium dissociation constant) were determined by globally fitting the experimental data using BIAevaluation software 4.1 (GE Healthcare).

Chapitre 4. Résultats-Interactions puréindolines-gliadines

When analyte A bind to ligand B to form complex AB, the rate of complex formation depends on the free concentration of the A and B components and on the stability of the formed complex. With SPR optical biosensors such as Biacore, the interaction is followed by monitoring AB (in resonance units, RU). The following mathematical model describes the interaction (1).

$$d(AB)/dt = k_a (A)(B) - k_d(AB) \quad (1)$$

(PQQPY)₈ was immobilized on a sensor surface. The concentration of the complex (PQQPY)₈/PINA is therefore identical to the concentration of bound PINA and proportional to the response R_{PINA}. The total concentration of active immobilized (PQQPY)₈ is obtained indirectly as it is saturated with PINA. The maximum response due to PINA binding, R_{max}, is proportional to total (PQQPY)₈ concentration and (R_{max}-R_{PINA}) is proportional to free (PQQPY)₈ concentration. The reaction between immobilized (PQQPY)₈ and PINA in solution can be expressed in terms of PINA response (2).

$$dR_A/dt = k_a C(R_{max} - R_{PINA}) - k_d R_{PINA} \quad (2)$$

For affinity analysis, at equilibrium dR_A/dt=0. Rearranging equation (2) the equation becomes (3).

$$R_{PINA}/C = K R_{max} - K R_{PINA} \quad (3)$$

Where K is the affinity constant $K = k_a/k_d$. K can be calculated at equilibrium by plotting R_{PINA}/C versus R_{PINA}.

For kinetic analysis, rate constants (2) can be calculated from plotting dR_{PINA}/d_t versus R_A provided R_{max} and C were known.

4.3. Results and discussion

Dose-response effect of the over-expression of PINA on wheat hardness.

On the basis of their expression levels, a total of 5 lines were selected for further characterizations. These lines express the PINA protein at different levels in regard to the null segregants. The corresponding null segregants were used as control lines, since they were submitted to the same genetic events while having lost the transgene due to genetic segregation.

Hardness, measured by both particle size index and by NIRS, was significantly reduced in the case of overexpression of *Pina-D1a* allele compared to the corresponding null segregant, from 78 to 42 (**Tableau 4.2**). This effect was already observed for the expression of PINA in

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

other genetic hard wheat background ([Hogg et al., 2004](#)). However, it was observed here that hardness level decreased proportionally to the expression levels of the recombinant protein with a significant R² of 0.94 for the PSI. This correlation is less significant when NIRS is used for evaluating grain hardness (**Supplemental Figure 4.1**). It should be emphasized that this dose-effect phenomenon has never been reported before.

Tableau 4. 2 : Hardness and composition of transgenic lines overexpressing PINA (A5; NS null segregant).

lines	PINA mg %	PSI(%)	NIRS	Protein %	Non-starch lipids %	Starch-lipids %
A1	70±8	45	60	18.1	1.6	0.36
A2	155±10	49	66	18.9	1.7	0.35
A3	127±23	46	56	17.4	1.7	0.37
A4	214±12	51	42	17.1	1.7	0.36
A5NS	25±4	41	78	17.5	1.6	0.37
A6	163±21	50	52	17.9	1.6	0.37

When overexpressing a protein in eukaryotic cells, it is necessary to check if the expected structure is obtained. Indeed, this was not done in previous studies using transgenic wheat lines overexpressing PINs. This is particularly important for PINs that undergo a series of successive post-translational maturation, consisting of cleavages at both their N- and C-termini ([Blochet et al., 1993b](#)). We checked whether this posttranslational processing is affected by the expression of the transgene. Actually, the maturation of the protein was globally maintained as reported previously in different wheat cultivar ([Elmorjani et al., 2013](#); [Geneix et al., 2015](#)) except some slight differences in the maturation of the C-termini. Compared to the null-segregant, the ratio of the least truncated vs. more truncated forms of the PINA extracted from the transgenic lines is significantly higher (**Figure 4.3**). The posttranslational processing of the PINA is thus affected in the lines that overexpress the recombinant protein. This fact reports on two original characteristics of this process: on the one hand, that the maturation of the C-terminus is effected sequentially, and secondly that the machinery implicated in this process is certainly overwhelmed as a consequence precisely of this overexpression. Similar differences in the maturation of PINA between a soft and hard varieties have been previously observed ([Geneix et al., 2015](#)) and could be also related to the higher expression of PINA in very soft varieties than in very hard one ([Igrejas et al., 2002](#)). The impact of this posttranslational processing on grain hardness has therefore to be addressed although previous studies did not highlight differences

in the aggregative properties of PINA isolated from very soft and very hard wheat ([Geneix et al., 2015](#)). Furthermore, when integrating absorbance of the two main C-terminus processed PINA, we did not find any correlation between their ratio and PINA contents (**Figure 4.3**).

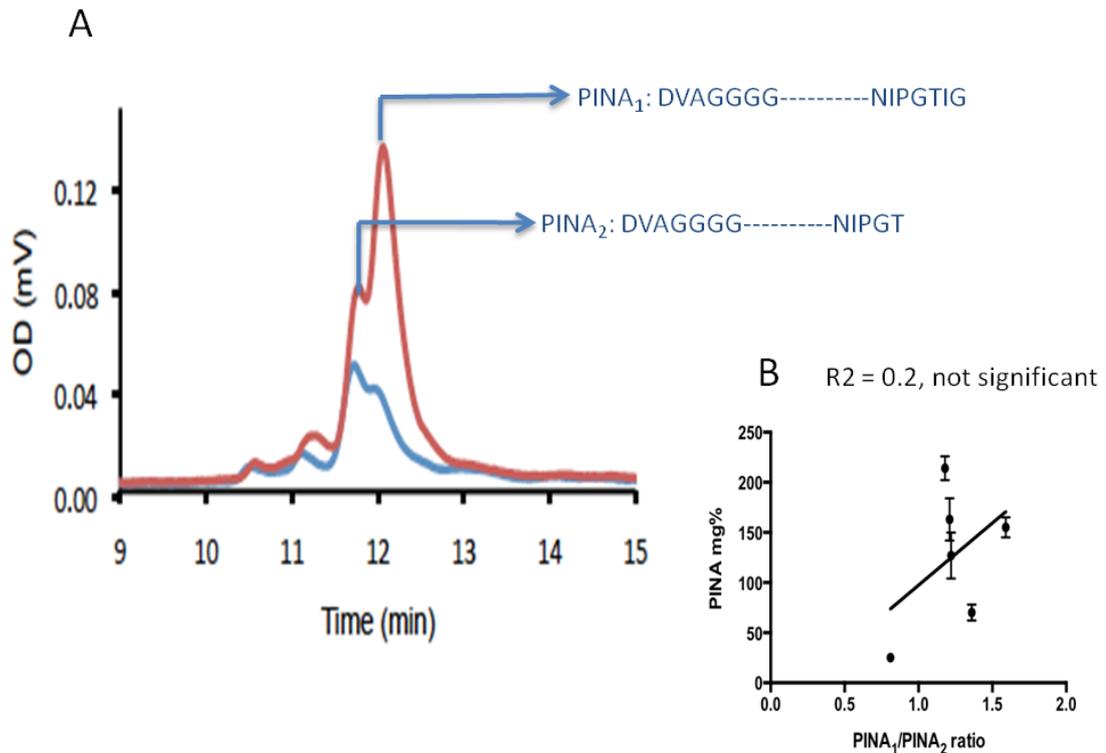


Figure 4.3: (A): RP-HPLC of PINA from transgenic line A4 overexpressing PINA and from null segregant. Mass spectrometry characterization of the different peaks was previously described ([Geneix et al., 2015](#)). (B): correlation between PINA content and the ratio of the two main C-terminus processed PINA, i.e. PINA₁ and PINA₂.

Content and composition of proteins and lipids extracted from these lines were determined. Indeed, PINA protein interacts with both lipids *in vitro* and *de facto* with storage proteins *in planta*, since they follow the same intracellular routing pathway. No significant correlation between the overexpression of PINA can be evidenced with the contents or with the compositions of the proteins and lipids (**Tableau 4.2**).

Since overexpression, of PINA does not impact either protein contents or lipid compositions of the transgenic lines while affecting significantly the hardness of the endosperm in dose-response way, we sought to check whether this fact could be related to the interaction between this protein and the prolamins, since prolamins and PINA are finally located in the protein matrix. We focused on the gliadin fraction, which is easy to extract and solubilise, in regard to glutenin polymers

PINA impacts the aggregation of gliadins

First of all we considered the interactions of PINA with total gliadins extracted from the cultivar Recital, a hard wheat. These gliadins were composed of α , β , γ and δ -gliadins as shown by electrophoresis and RP-HPLC (**Supplemental Figure 4.2**). These interactions were monitored through the impact of PINA on gliadin aggregation measured by light scattering and turbidity. Immediately after gliadin solubilization at $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in 20 mM Tris buffer pH 7.2, a turbid solution was observed in the absence or in the presence of $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PINA (**Figure 4.4**). The turbidity was still observed after 30 min for the PINA-gliadin mixture while it partly disappeared for gliadins. After 30 min, PINA solution displays a single particle population with a mean diameter of 4.8 nm. Gliadins display also a single particle population with a diameter of 6 nm (**Figure 4.4**). However, immediately after dilution in the aqueous buffers, particle size distribution of gliadins displayed a monomodal Gaussian distribution by volume with a diameter around 6 μm . Therefore, it seems that the 6 μm gliadin particles dissociated into smaller aggregates, i.e. 6 nm diameter, after 30 min. Regarding the high size of PINA/gliadin aggregates, particle size distribution was determined by laser light diffraction. PINA/gliadins mixture displayed a single population of large particles with diameter around 1 μm immediately after dilution and 16 μm after 30 min mixing. Any modification of particle size could be observed on longer time, suggesting that, at these relatively low concentrations, gliadin aggregation is a dynamic process controlled by structural rearrangements.

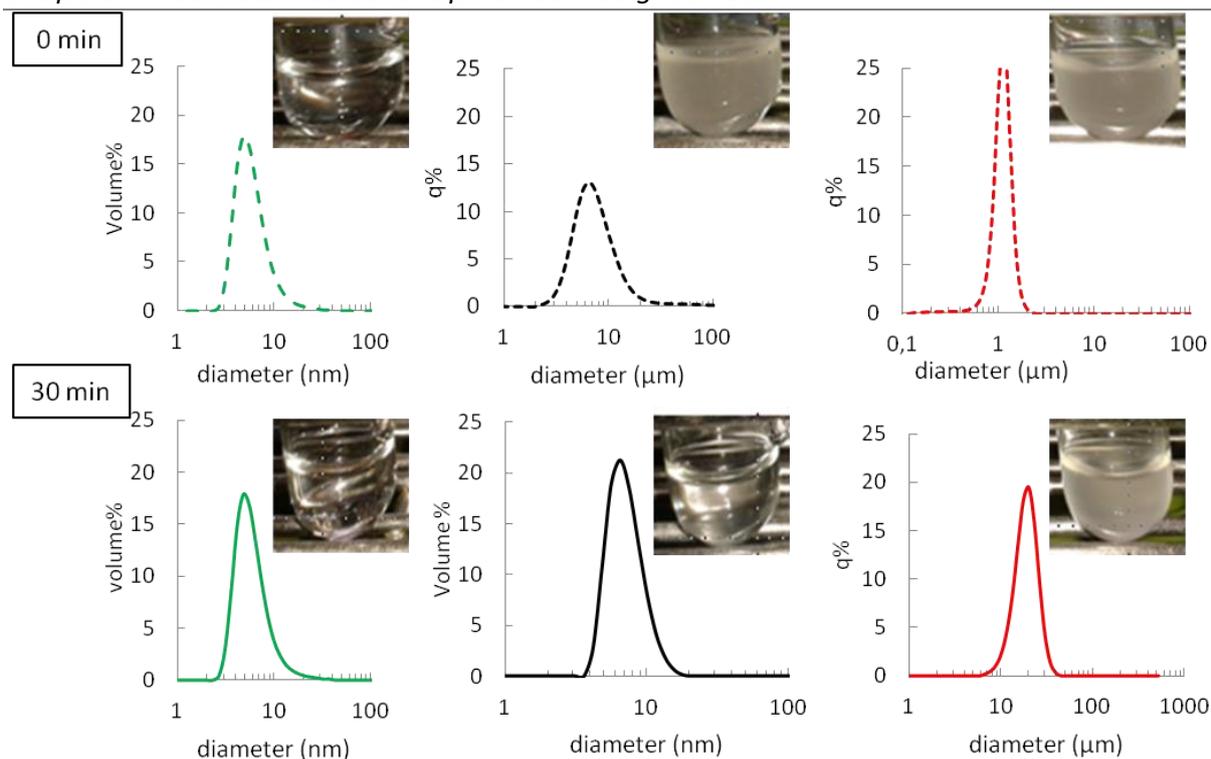


Figure 4.4: Representative images of interactions of PINA with total gliadin fraction (gliadins). Size distribution of particle in solution at 0 min (dashed lines) and after 30 min mixing (continuous lines). PINA (green line), gliadins (black line) and mixture PINA/gliadins (red line).

To check the dose-response effect of PINA on gliadin aggregation, turbidity measurements were realized at a constant concentration of gliadins (2 mg.mL^{-1}) while increasing concentrations of PINA either in Tris buffer pH 7.2, in 20 mM malate at pH 5 or in 20 mM citrate at pH 5, with the presence or absence of 0.1 M NaCl. As shown in **Figure 4.5**, turbidity increased following addition of PINA to reach a plateau at a PINA concentration of 2 μM at pH 7.2 and 1 μM at pH 5. The slight lag concentration effect of added PINA to gliadin solution suggests that the aggregation process is highly cooperative. Indeed, curve fitting using the Hill ligand-binding model, returned a Hill coefficient of 1.9 at neutral pH and of 3.5 at acid pH. This cooperativity could be associated with a nucleation effect, i.e. formation of PINA-gliadin complexes inducing further aggregation of other gliadin macromolecules. No effects of added salt was observed on these titration curves suggesting that the aggregation process was not driven by electrostatic interactions but only by the combined action of organic acids and-or pH.

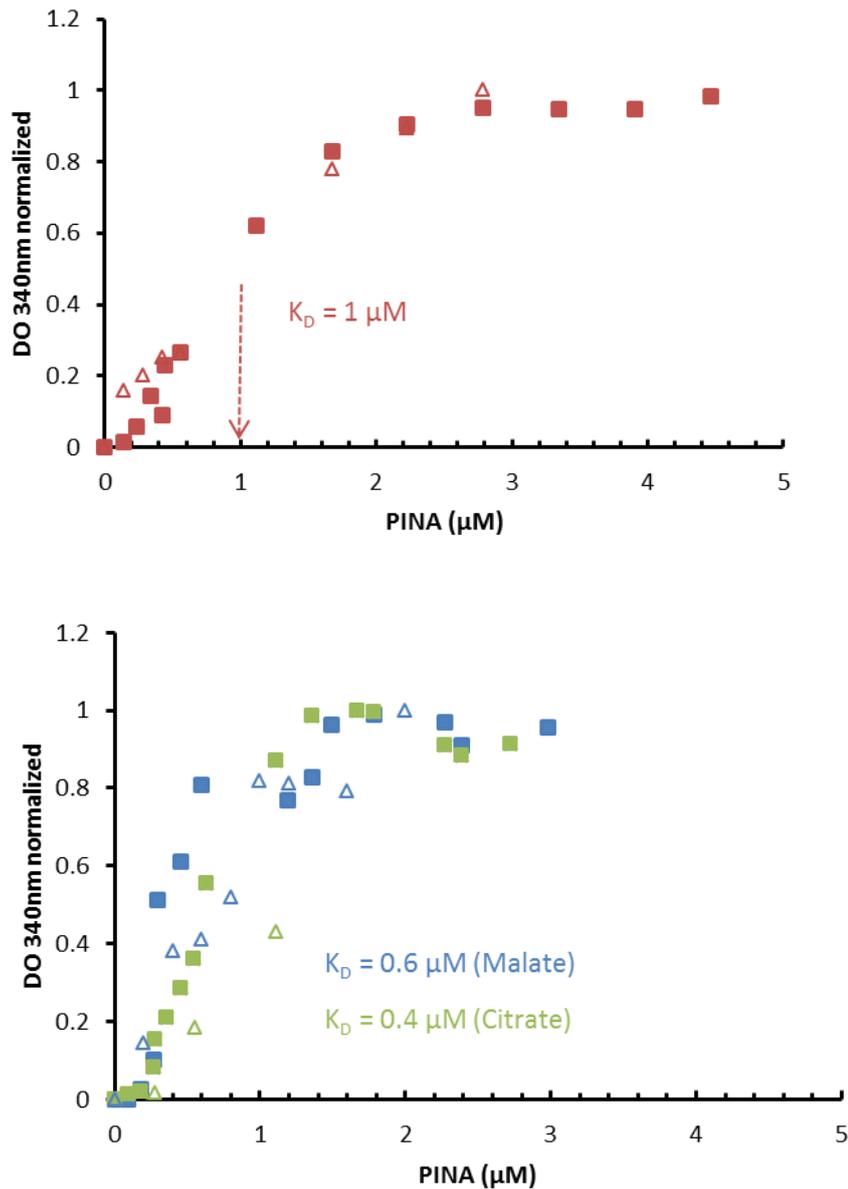


Figure 4.5: Optical density at 540 nm after 30 min mixing of gliadins with increased PINA concentration. The mixture solution was tested at pH 7.2; 20 mM Tris-HCl (red points) or at pH 5; 20 mM Malate (blue points) and 20 mM Citrate (green points) with presence (empty triangle) or absence (square) of 0.1 M NaCl. Values are expressed as mean of two measurements.

In regard to the biological context, it was previously observed that during barley endosperm development the pH decreases first slowly until 30 DPA, and then rapidly to reach about 4.5 at the end of development (50 DPA). Acidification correlates very well with accumulation of organic acids, i.e malate, citrate, lactate ([Charnet et al., 2003](#); [Macnicol and Jacobsen, 1992](#)). Since the synthesis of PINA and gliadins occur until 30 DPA ([Gautier et al., 1994](#)), this means that PINA-gliadin interactions could be initially formed at neutral pH, while rearrangements of aggregates could occur in late development. Finally, these experiments

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

demonstrate that low quantities of PINA, comparable to those found in wheat endosperm, could strongly impact gliadin aggregation *in vivo*.

Gliadins selectivity

Gliadins are classified into 4 classes, i.e. α , β , γ and ω gliadins, as a function of their electrophoretic mobility in acid-PAGE and their sequences ([Wieser, 1996](#)). We showed that PINA interacts with total gliadins to form large aggregates. Since α - and γ -gliadins are the major proteins in the gliadin fraction, they were chosen to probe their interaction with PINA. Purification of α - and γ -gliadins was controlled by acid-PAGE and SDS-PAGE (**Supplemental Figure 4.1**).

In contrast with total gliadin fraction, adding PINA to α and γ -gliadin fraction led only to a slight increase of turbidity of the gliadin fraction (datas not shown). This suggests that PINA did not change the aggregative properties of gliadins or induce a slight increase of the size of gliadin aggregates that could not be detected by turbidity measurements.

To probe protein-protein interaction we used BN-PAGE. This technique allows the separation of protein complexes in their native conformation with a high sensitivity ([Schagger et al., 1994](#); [Schagger and Von Jagow, 1991](#))

As for light scattering, α - and γ -gliadins were suspended at 2 mg mL^{-1} in 20 mM Tris buffer pH 7.2 with presence or absence of 0.2 mg mL^{-1} of PINA. The solution was mixed for 30 min and diluted in BN buffer. BN-PAGE method was used first for separate complexes. The BN-PAGE was followed by resolution of protein constituents in a second dimension by SDS-PAGE, for resolution of the complexes into their individual protein subunits. In the first dimension it seems that PINA is associated with ω gliadins since the band in the middle of the gel seems more intense and wider in the mixture gliadins/PINA than spots corresponding to proteins alone (**Figure 4.6**). In the second dimension (SDS-PAGE), a diffuse band was observed in gel corresponding to PINA only with molecular weight of 15 kDa (**Figure 4.6a**), 3 spots between 30 and 38 kDa γ -gliadin (**Figure 4.6b**) and 2 almost identical size spots around 30 kDa that correspond to α -gliadin (**Figure 4.6d**).

The second-dimension resolution of γ -gliadins/PINA by SDS-PAGE resulted in a protein subunit profile characteristic of PINA and γ -gliadin (**Figure 4.6c**). This second resolution of α -gliadins/PINA seems to highlight a spot corresponding to the PINA in vertical line of α gliadins (**Figure. 4.6e**, dashed circle).

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

In BN-PAGE, PINA aggregates in the stacking gel. This is probably due to the fact that it is a basic protein. The position of the two protein spots in one vertical line after BN and 2D-PAGE gel for α -gliadins/PINA solutions could be indicative of their presence in a same complex in solution at neutral pH. Each protein could also be part of separate complex that migrate at the same position in BN-PAGE. These results show that PINA interact with α -gliadin and not with γ -gliadin.

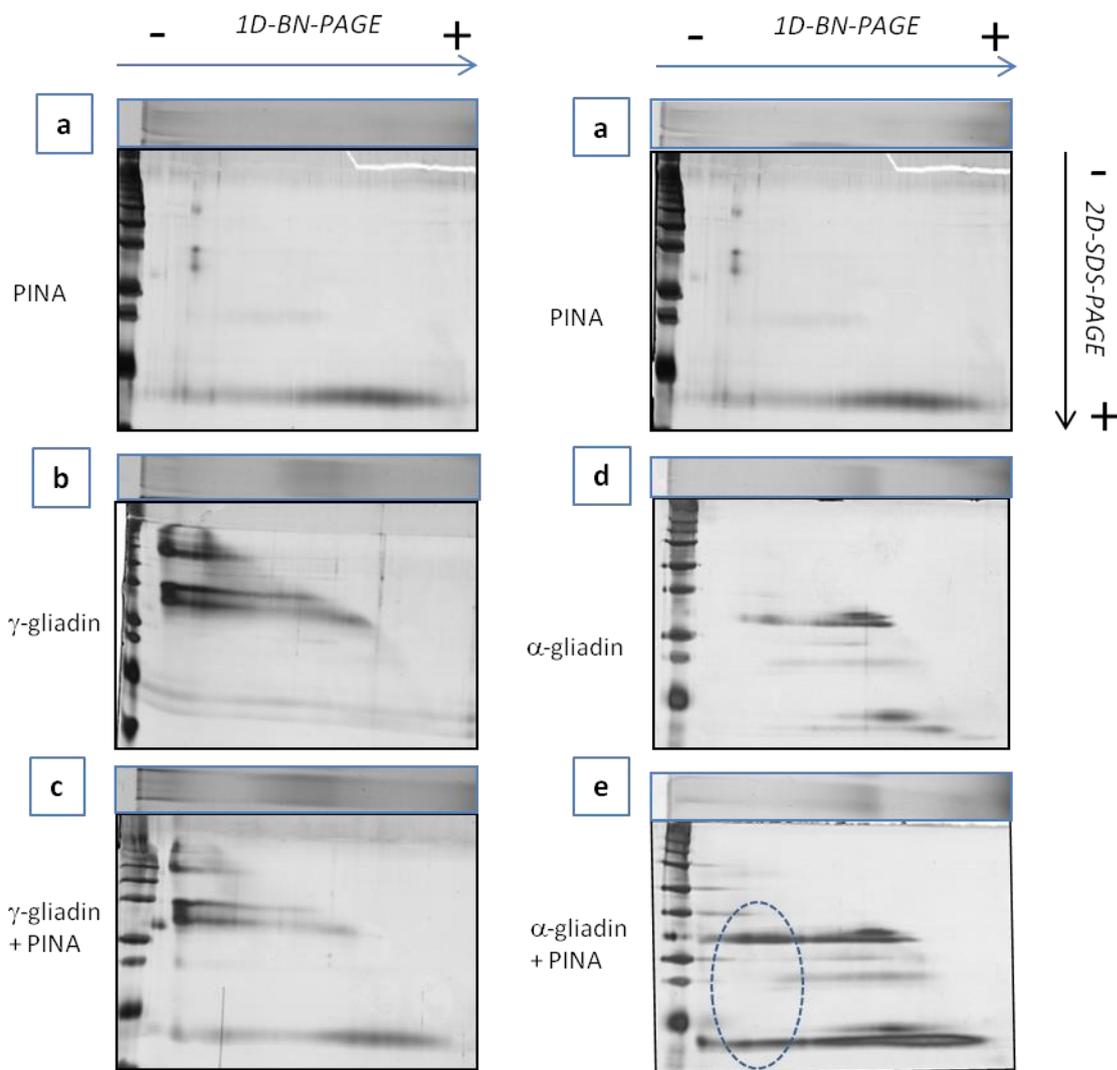


Figure 4.6: Two dimensional resolution of (a) PINA, (b) γ -gliadin, (c) γ -gliadin + PINA, (d) α -gliadin and (e) α -gliadin + PINA. 1D : Blue Native PAGE. 2D: denaturing SDS-PAGE 12% for resolution of the complexes into their individual protein subunits.

Involvement of gliadin repeat polypeptide in PINA-gliadin interaction

The structure of gliadins is characterized by the presence of N-terminal domain composed of repeated peptide sequence. Therefore, we checked whether the synthetic polypeptide $(PQQPY)_8$, mimicking the consensus repetitive sequences of α -gliadins, interacted *in vitro* with PINA by using SPR. The purity of this recombinant polypeptide was checked by RP-HPLC (**Figure 4.7**) and mass spectrometry. Especially, mass spectrometry (ESI-MS) measurements matched perfectly the expected mass: MW = 4924.5 Da (theoretical mass = 4924.3 Da).

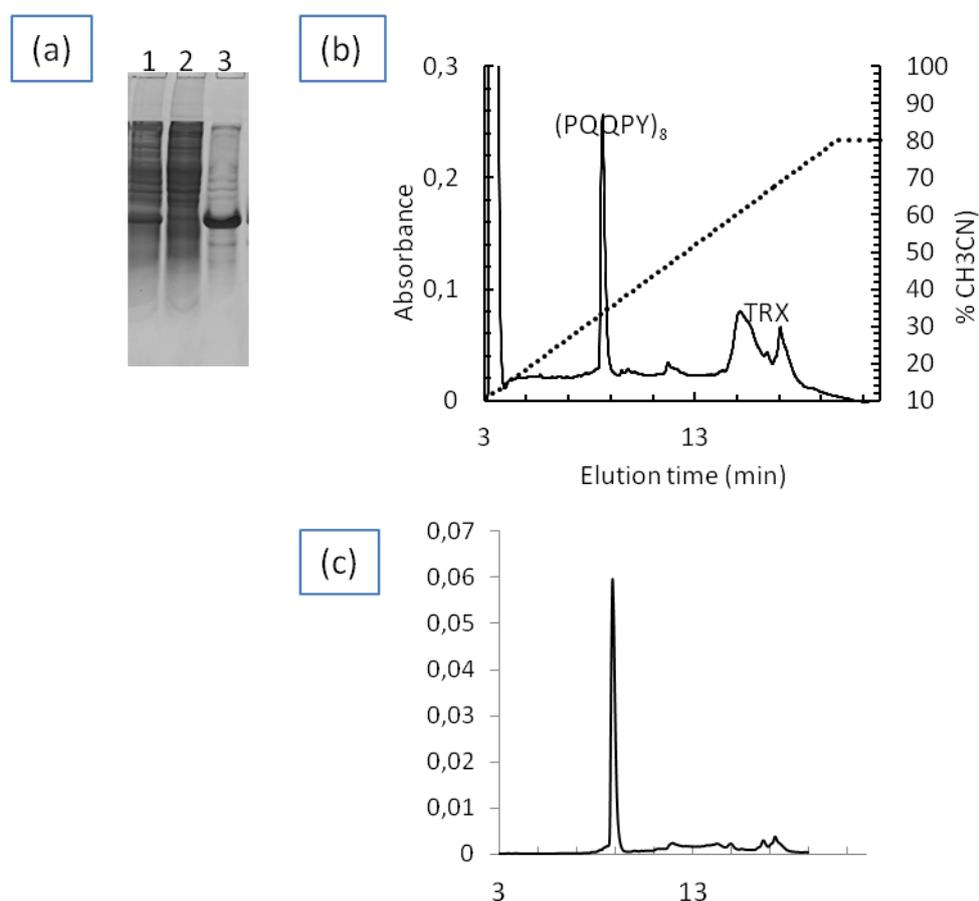


Figure 4.7: (a) Coomassie blue stained SDS-PAGE of (1) BLR strain carrying pETb $(PQQPY)_8$ plasmid, (2) non retained affinity column, (3) elution of TRX- $(PQQPY)_8$ protein. (b) control by HPLC elution profile of TRX- $(PQQPY)_8$ solubilized in 70% formic acid ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and (c) the acid reaction products purified through C18-T cartridge.

The $(PQQPY)_8$ polypeptide was immobilized covalently on the chips while the other binding partner, i.e. PINA, was flow in solution at a series of concentrations from 2 to 20 μM . The binding curves were globally analyzed using a model with one binding site. The corresponding sensorgrams are shown in **Figure 4.8a**. They highlight very fast association

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroidolines-gliadines

kinetics of PINA to (PQQPY)₈ polypeptide grafted onto the chips, with equilibrium (steady-state) binding achieved during the 20 s association phase. The binding curves obtained show that binding reaches a steady state plateau in the injection period so that both steady state and kinetic were analyzed. These data were then checked against a steady state binding model, as shown in **Figure 4.8b**. Using steady state analysis the K_D value is 5.24 μM (Figure 4.6c). From $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ the dissociation constant K_D was 0.29 μM ($k_{\text{off}} = 1.43 \cdot 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ and $k_{\text{on}} = 4.97 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

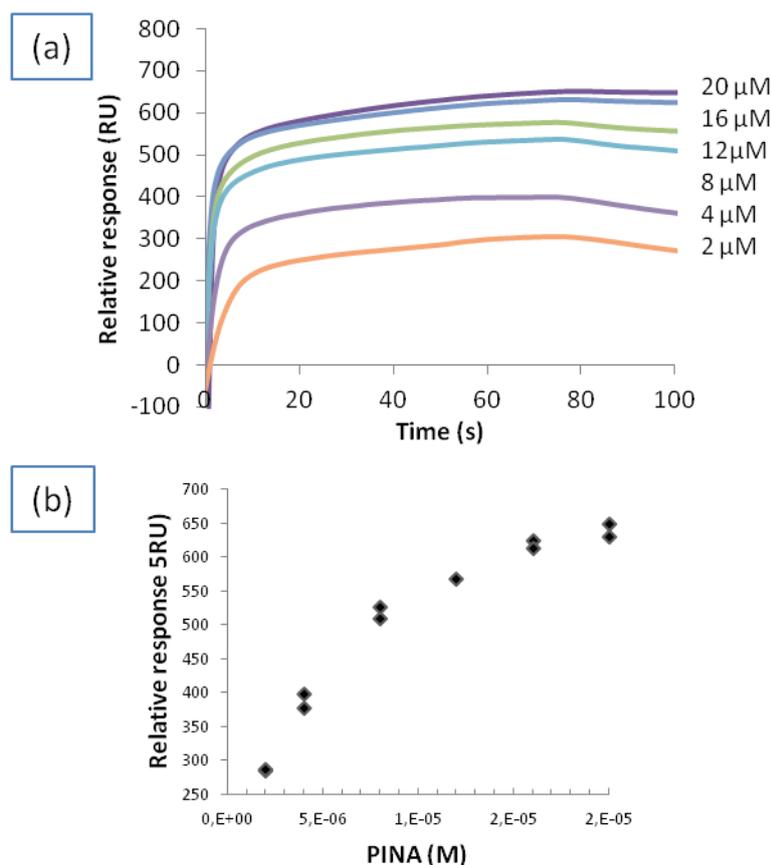


Figure 4.8: SPR analysis of PINA to immobilized (PQQPY)₈. (a) Example of sensorgrams recorded during the injection of 2, 4, 8, 12, 16 and 20 μM of PINA (from the bottom to the top). The flow rate was 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, with contact times of 120 seconds and dissociation times of 600 seconds, in PBS running buffer. (b) Fitted data to a steady state binding model using equation 3 (see material and methods) to estimate the affinity value (K_D) for PINA binding to (PQQPY)₈.

Therefore the fitting of data by the one to one binding model by evaluation software was not perfect. This method is extremely subjective when transformed data are curved and can only be used to interpret a simple one to one interaction (O'Shannessy, 1994). For interactions on a sensor surface, the reaction component in sample solution is injected over the flow cell surface and must be transported from the bulk solution to the surface (mass transport). In the

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

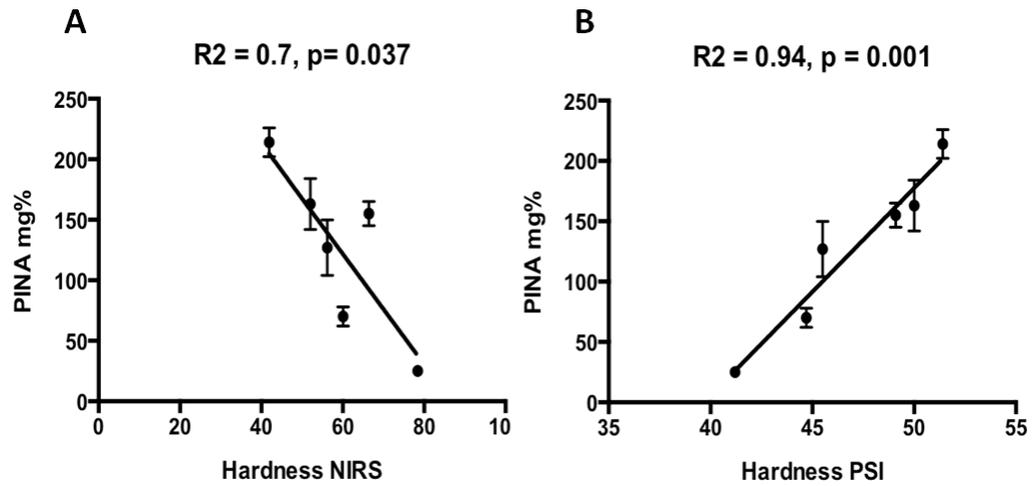
reaction of interest, PINA is transported to the immobilized (PQQPY)₈ for complex formation. This is a diffusion-controlled process, and the transport rate can directly influence the binding kinetics, if it is slower than the binding reaction ([Karlsson, 1999](#)). A similar factor that affects kinetics is the rebinding- induced slow dissociation. Indeed, after the formation of the (PQQPY)₈/PINA complex reaches the injection time limit, the running buffer flows over the sensor surface to dissociate the bound protein from the immobilized (PQQPY)₈. For proteins with very high binding affinities, they can frequently rebind (PQQPY)₈ after they dissociate from (PQQPY)₈ but before leaving the matrix. When rebinding occurs the rate of protein transport away from the surface is slow compared to the real dissociation rate at the surface, which results in a very slow apparent dissociation ([Rich and Myszka, 2010](#)).

This is linked to the fact that there is no enough information during a single progress curve to discriminate between different mechanisms. The interaction between PINA and (PQQPY)₈ is established but the data do not allow to recover information on the nature of this interaction. Gliadins contain a proline-glutamine rich repetitive domain (i.e. PQQPFPQQ). α - and γ -gliadins (MWs ~28000-35000) differ significantly in the contents of tyrosine (instead of phenylalanine). The consensus sequence of α/β - gliadins is polypeptide (QPQPFPQQPYP) and that for γ -gliadins is (QPQQPFP). Anyway, the results obtained with the polypeptide repeat mimicking the repeat domain of α -gliadin showed that PINA binds to the consensus polypeptide (PQQPY)₈ in agreement with the apparent specificity of interaction with α -gliadins observed by BN-PAGE.

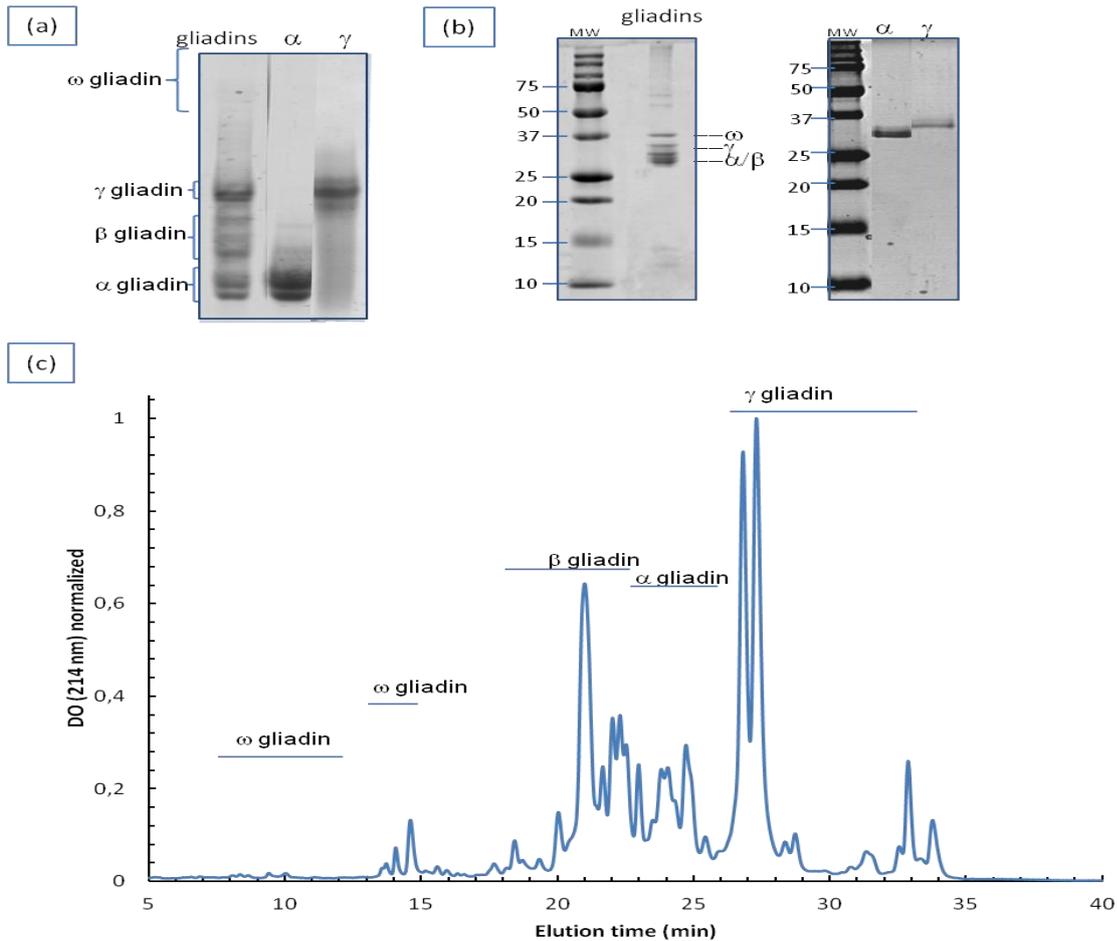
4.4. Conclusion

By combining different methods, i.e. turbidimetry, light scattering and surface plasmon resonance, it was clearly highlighted that PINA can interact with gliadins and impact their aggregative properties. At least, this interaction displays some specificity towards α -gliadins and can involve the repetitive domain of these prolamins. This specific interaction could cooperatively induce the aggregation of other gliadins to this nucleating heteromeric PINA- α -gliadin complex as it was observed for the interaction of PINA with a total gliadin extract. This could explain why a small increase of PINA in hard wheat drastically impact grain hardness with a dose-response effect. This cooperative phenomenon could spread to glutenins and impact their polymer size as observed in hard-soft isogenic lines ([Lesage et al., 2011](#)).

4.5. Supplemental data



Supplemental Figure 4.1: Correlations between PINA contents and hardness measured through NIRS (A) and PSI (B)



Supplemental Figure 4.2: Control of purifications total, α - and γ - gliadins proteins by (a) acid-PAGE, (b) SDS-PAGE and (c) C18-PFP RP-HPLC

5. Références

- Bhave, M., and Morris, C. **2008**. Molecular genetics of puroindolines and related genes: regulation of expression, membrane binding properties and applications. *Plant molecular biology*. 66: 221-231.
- Blochet, J., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.-F., Joudrier, P., Pezolet, M., and Marion, D. **1993a**. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *Federation of European Biochemical Societies*. 329: 336-340.
- Blochet, J.E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.F., Joudrier, P., Pezolet, M., and Marion, D. **1993b**. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett*. 329: 336-340.
- Charnet, P., Molle, M., Marion, D., Rousset, M., and Lullien-Pellerin, V. **2003**. Puroindolines Form Ion Channels in Biological Membranes. *Biophysical journal*. 84.
- Clifton, L., Lad, M., Green, R., and Frazier, R. **2007a**. Single amino acid substitutions in puroindoline-b mutants influence lipid binding properties. *Biochemistry*. 46: 2260-2266.
- Clifton, L., Sanders, M., Castello, V., and Frazier, R. **2011**. Puroindoline-a, a ligand binding protein from common wheat, spontaneously forms prolate protein micelles in solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13: 8881-8888.
- Clifton, L.A., Green, R.J., and Frazier, R.A. **2007b**. Puroindoline-b Mutations Control the Lipid Binding Interactions in Mixed Puroindoline-a : Puroindoline-b Systems. *Biochemistry*. 46: 13929-13937.
- Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K., and Marion, D. **2000**. Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. *Journal of Cereal Science*,. 32: 1-20.
- Dubreil, L., Compoin, J.P., and Marion, D. **1997**. Interaction of Puroindolines with Wheat Flour Polar Lipids Determines Their Foaming Properties. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*,. 45: 108-116.
- Dubreil, L., Garorit, T., Bouchet, B., Gallant, D., Broekaert, W., Quillien, L., and Marion, D. **1998a**. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein(ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science*. 138: 121-135.
- Dubreil, L., T. Gaborit, B. Bouchet, D. Gallant, W. Broekaert, L. Quillien, and Marion., D. **1998b**. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline- and puroindoline-b) and a non- specific lipid transfer protein (ns-LTPe1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci*. 138: 121-135.
- Dubreil, L., Vie, V., Beauvils, S., Marion, D., and Renaud, A. **2003**. Aggregation of Puroindoline in Phospholipid Monolayers Spread at the Air-Liquid Interface. *Biophysical Journal*,. 85: 2650-2660.
- Elmorjani, K., Geneix, N., Dalgarrondo, M., Branlard, G., and Marion, D. **2013**. Wheat grain softness protein (Gsp1) is a puroindoline-like protein that displays a specific post-translational maturation and does not interact with lipids. *Journal of Cereal Science*,. 58: 117-122.

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

- Elmorjani, K., Lurquin, V., Lelion, A., Rogniaux, H., and Marion, D. **2004**. A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316: 1202-1209.
- Feiz, L., Beecher, B.S., Martin, J.M., and Giroux, M.J. **2009a**. In planta mutagenesis determines the functional regions of the wheat puroindoline proteins. *Genetics*. 183: 853-860.
- Feiz, L., Wanjugi, H.W., Melnyk, C.W., Altosaar, I., Martin, J.M., and Giroux, M.J. **2009b**. Puroindolines co-localize to the starch granule surface and increase seed bound polar lipid content. *Journal of Cereal Science*. 50: 91-98.
- Gautier, M.-F., Aleman, M.-E., Guirao, A., Marion, D., and Joudrier, P. **1994**. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant molecular biology*. 25: 43-57.
- Gayral, M., Bakan, B., Dalgalarondo, M., Elmorjani, K., Delluc, C., Brunet, S., Linossier, L., Morel, M.H., and Marion, D. **2015**. Lipid partitioning in maize (*Zea mays* L.) endosperm highlights relationships among starch lipids, amylose, and vitreousness. *Journal of agricultural and food chemistry*. 63: 3551-3558.
- Geneix, N., Dalgalarondo, M., Bakan, B., Rolland-Sabaté, A., Elmorjani, K., and Marion, D. **2015**. A single amino acid substitution in puroindoline b impacts its self-assembly and the formation of heteromeric assemblies with puroindoline a. *Journal of Cereal Science*. 64: 116-125.
- Greenblatt, G.A., Bettge, A.D., and Morris, C.F. **1995**. Relationship between endosperm texture and the occurrence of friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem*. 72: 172-176.
- Greenwell, P., and Schofield, J.D. **1986**. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem* 63: 379-380.
- Hogg, A.C., Sripo, T., Beecher, B., Martin, J.M., and Giroux, M.J. **2004**. Wheat puroindolines interact to form friabilin and control wheat grain hardness. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 108: 1089-1097.
- Igrejas, G., Leroy, P., Charmet, G., Gaborit, T., Marion, D., and Branlard, G. **2002**. Mapping QTLs for grain hardness and puroindoline content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 106: 19-27.
- Jolly, C.J., Rahman, S., Kortt A.A., and Higgings, T.J.V. **1993**. Characterisation of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 86.
- Karlsson, R. **1999**. Affinity analysis of non-steady-state data obtained under mass transport limited conditions using *Journal of molecular recognition : JMR*. 12: 285-292.
- Le Guernevé, C., Seigneuret, M., and Marion, D. **1998**. Interaction of the Wheat Endosperm Lipid-Binding Protein Puroindoline-a with Phospholipids. *Archives of biochemistry and biophysics* 360: 179-186.
- Lesage, V.S., Bouchet, B., Rhazi, L., Elmorjani, K., Branlard, G., and Marion, D. **2011**. New insight into puroindoline function inferred from their subcellular localization in developing hard and soft near-isogenic endosperm and their relationship with polymer size of storage proteins. *Journal of Cereal Science*. 53: 231-238.
- Macias, M.J., Wiesner, S., and Sudol, M. **2002**. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Letters*. 513: 30-37.
- Macnicol, P.K., and Jacobsen, J.V. **1992**. Endosperm acidification and related metabolic changes in the developing barley grain. *Plant physiology*. 98: 1098-1104.

Chapitre 4. Résultats-Interactions puroindolines-gliadines

- Morris, C., Lillemo, C., Simeone, M., Giroux, M., Babb, S., and Kidwell, K. **2001**. Prevalence of Puroindoline Grain Hardness Genotypes among Historically Significant North American Spring and Winter Wheats. *Crop science*. 41: 218–228.
- Morris, C.F. **2002**. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant molecular biology*. 48: 633-647.
- O'Shannessy, D.J. **1994**. Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature. *Current Opinion in Biotechnology*. 5: 65-71.
- Oda, S., and Schofield, J.D. **1997**. Characterisation of friabilin polypeptides. *Journal of Cereal Science*. 26: 29-36.
- Pires, J.R., Taha-Nejad, F., Toepert, F., Ast, T., Hoffmüller, U., Schneider-Mergener, J., Kühne, R., Macias, M.J., and Oschkinat, H. **2001**. Solution structures of the YAP65 WW domain and the variant L30 K in complex with the peptides GTPPPYTVG, N-(n-octyl)-GPPPY and PLPPY and the application of peptide libraries reveal a minimal binding epitope1. *Journal of Molecular Biology*. 314: 1147-1156.
- Popineau, Y., and Pineau, F. **1985**. Fractionation and Characterisation of γ -Gliadins from Bread Wheat. 3: 363-378.
- Rich, R.L., and Myszka, D.G. **2010**. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *Journal of molecular recognition : JMR*. 23: 1-64.
- Schagger, H., Cramer, N., and von Jagow, G. **1994**. Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Proteins Complexes by blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Native Electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 217: 220-230.
- Schagger, H., and Von Jagow, G. **1991**. Blue Native Electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*. 199: 223-231.
- Tatham, A.S., and Shewry, P.R. **2012**. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *In Journal of Cereal Science*. Vol. 55. 79-99.
- Turnbull, K.M., Gaborit, T., Marion, D., and Rahman, S. **2000**. Variation in puroindoline polypeptides in Australian wheat cultivars in relation to grain hardness. *Aust J Plant Phys*. 27: 153-158.
- Wieser, H. **1996**. relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta. Paediatr*. 412: 3-9.

Partie 5. Conclusion et perspectives

La texture du grain est un paramètre important de la valeur d'usage et de la valeur commerciale du blé tendre. La dureté, facteur principal décrivant la texture du grain, est associée à un locus où se trouvent les gènes codant pour les puroindolines (PINs), PINA et PINB, dont l'expression se déroule uniquement et spécifiquement dans l'albumen amylicé du grain de blé tendre. Il est généralement admis aujourd'hui qu'une délétion du gène codant pour la PINA ou de simples mutations de la PINB sont, au niveau génétique, des marqueurs spécifiques du caractère « hard ». Le caractère « soft » est dominant et implique la présence des deux types sauvages, PINA et PINB. Les mécanismes physico-chimiques qui sous-tendent ces relations sont sujets à controverse. L'hypothèse qui prévaut suggère que les PINs seraient adsorbées à la surface des grains d'amidon empêchant l'adhésion entre les grains d'amidon et la matrice protéique. Du fait de la présence de lipides à la surface des grains d'amidon (surface starch lipids) et des interactions entre les PINs et les lipides observées *in vitro*, il a été suggéré que ces interactions entre PINs et lipides sont responsables des différences de compacité de la matrice amylo-protéique entre des blés « soft » et des blés « hard ». L'absence d'interaction entre une autre PIN dont le gène est situé sur le locus de dureté, la GSP1, et les lipides suggère que ces interactions ne sont pas systématiquement impliquées dans la texture du grain (Elmorjani et al., 2013). Par ailleurs, les puroindolines suivent le même routage intracellulaire que les protéines de réserve au cours du développement de l'albumen amylicé et se retrouvent majoritairement piégées dans la matrice protéique du grain mature (Lesage et al., 2011). Il était donc évident que les hypothèses initialement formulées, principalement déduites de la composition biochimique des surfaces des grains d'amidon isolés des blés « soft » et des blés « hard », devaient être revisitées. Sur ces éléments de colocalisation des PINs et des protéines de réserve au sein de la matrice protéique de l'albumen amylicé, nous avons émis l'hypothèse que les interactions entre les PINs et les protéines de réserve pourraient jouer un rôle majeur sur la cohésion de la matrice amylo-protéique. Plusieurs approches *in vitro* ont été utilisées pour étudier les interactions protéines-protéines en solution.

L'étude des différences de propriétés agrégatives des puroindolines purifiées à partir des variants de blé tendre Soft et Hard a donc été le point de départ pour vérifier cette hypothèse. L'objectif était d'identifier l'auto-association de PINA et surtout PINB en relation avec les mutations décrivant la texture du blé Soft/ Hard : les protéines PINA (PINA-D1a) et PINB (PINB-D1a) présentes dans le type sauvage et les mutants PINB (PINB-D1b) et PINB (PINB-

D1d) contenant la mutation d'une glycine en sérine (Gly-46/ Ser-46) et la mutation d'un tryptophane en arginine (Trp-44/ Arg-44) respectivement.

L'extraction et la caractérisation des PINA et PINB à partir de farine d'un cultivar de blé « soft » et de deux cultivars de blé « hard », ont permis d'obtenir ces différentes protéines purifiées. Cette première étape a permis de mettre en évidence également des clivages protéolytiques post-traductionnels N- et C-terminaux des PINs purifiées (mélange de protéines différemment clivées).

L'analyse des PINs en solution montre que ces protéines forment des agrégats de différentes tailles (**Figure 5.1.**). Une proportion importante de PINA s'auto-associe en dimère et une faible quantité en monomère dans la même solution. Les PINA-D1a isolées des deux variétés soft et hard ont la même séquence en acides aminés, la seule différence étant observée au niveau de leurs clivages post-traductionnels. Ce dernier n'impacte pas leurs propriétés d'auto-agrégation.

Concernant les PINB, différentes propriétés d'agrégation ont pu être montrées en fonction des mutations ponctuelles. La PINB issue de la variété « Soft » (PINB-D1a) forme plutôt des monomères tandis que les PINB issues des variétés « Hard » (PINB-D1b et PINB-D1d) ont tendance à former des agrégats de grande taille (**Figure 5.1.**). Les gros agrégats peuvent se dissocier en agrégats plus petits sous l'effet de contraintes mécaniques suggérant que les propriétés agrégatives des PINs et plus particulièrement celles des PINB sont contrôlées par des interactions faibles et de minimes changements de conformation probablement liés à la dynamique de ces protéines. Dans cette dynamique, le domaine riche en tryptophane pourrait jouer un rôle majeur si on considère les données de modélisation par homologie (Lesage et al., 2011) associées au fait que nos résultats ont été obtenus à partir de PINB présentant des mutations ponctuelles situés au sein de ce domaine. Ainsi, le repliement global de ces protéines n'est pas touché par les mutations d'un seul acide aminé de ces PINB (Clifton et al., 2007). En revanche l'hydrophobicité du domaine riche en tryptophane (TRD) et sa flexibilité due aux liaisons hydrogènes entre l'arginine ou la sérine et d'autres résidus polaires sont modifiées et pourraient être responsables de la réversibilité de l'agrégation.

Les propriétés agrégatives de mélanges de PINA et PINB en solution montrent que les « variants hard » de PINB interfèrent avec l'agrégation des PINA en interagissant avec ces dernières (**Figure 5.1.**). Ceci est en accord avec le fait que la présence de PINB mutante induit le caractère « hard » malgré la présence de PINA. Ainsi, l'association PINB mutante-PINA se

Partie 5. Conclusion et perspectives

comporte comme la PINB mutante seule et conduit à un phénotype équivalent à celui des variants null PINA. Des études faites sur des lignées transgéniques de blé ont montrées que les deux PINA et PINB de type sauvage étaient nécessaires pour obtenir la texture Soft avec un niveau important de PINs associés aux granules d'amidon isolés de ces lignées transgéniques (Wanjugi et al., 2007). Ceci est à rapprocher de nos résultats montrant que le mélange des deux protéines sauvages ne conduit pas à un changement significatif de l'agrégation de ces protéines suggérant que ces protéines pourraient avoir un effet additif sur la compacité de la matrice amylo-protéique. Nos résultats montrent également cette interdépendance dans les propriétés d'agrégation. Toutefois il convient de rester prudent car nous ne connaissons pas i) le comportement des mutants PINB affectés dans une autre partie de la PINB (cas de la PINB-D1c mutation de la proline-60 par une leucine) et ii) la teneur en PINA des mutants PINB null (PINb-D1e, PINB-D1f et PINB-D1g). Dans le cas de ces mutants l'absence de PINB et la seule présence de PINA devrait conduire à un blé au phénotype « soft ».

L'effet dose marqué de la PINA sur la dureté que nous avons constaté en utilisant différentes lignées transgéniques surexprimant la PINA confirme bien que cette protéine seule impacte significativement la dureté du grain. Dans les variétés « hard » PINB nulle, seul une baisse importante de la PINA devrait maintenir le caractère « hard ». Ces résultats et la réversibilité de l'auto-association des PINs en solution laissent supposer que ce phénomène n'est peut être que le marqueur d'autres interactions.

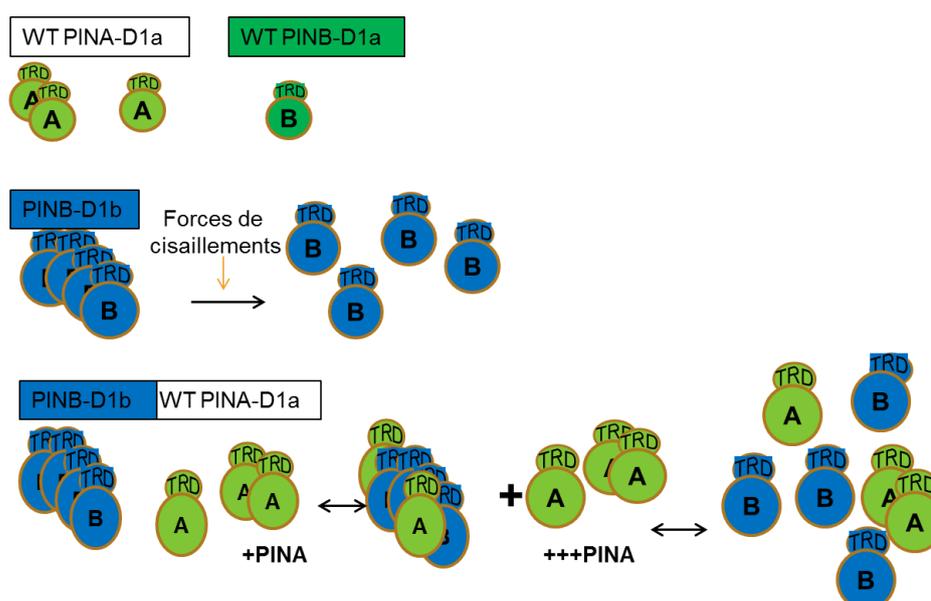


Figure 5.1 : Schéma représentatif du comportement agrégatif des puroindolines

C'est pourquoi dans une seconde étape nous avons tenté de vérifier si les PINs pouvaient jouer un rôle sur l'agrégation des protéines de réserve, en nous focalisant plus particulièrement sur l'analyse d'interactions entre la PINA (PINA-D1a) et les gliadines.

Les résultats obtenus montrent que la présence de PINA affecte le comportement agrégatif des gliadines en solution et que cette agrégation se produit quels que soient le pH ou la force ionique du milieu (malate, citrate). Les gliadines forment des particules de taille nanométrique en solution diluée. En présence de PINA la taille des particules dans la solution est augmentée d'un facteur 10 avec la formation d'agrégats de taille proche de 16 μm (**Figure 5.2.**). La turbidimétrie montre que l'interaction de la PINA avec les gliadines est un phénomène hautement coopératif. Ceci suggère que l'initiation de complexe PINA-gliadines pourrait ensuite faciliter l'agrégation des autres gliadines. Nos résultats sur des α - et γ -gliadines montrent que cette nucléation initiale de complexe pourrait impliquer les α -gliadines et en particulier leur domaine répétitif (**Figure 5.2.**). Cette coopérativité est plus marquée à pH acide en présence de malate et citrate qu'à pH neutre. Des études antérieures menées sur l'albumen amylicé d'orge ont mis en évidence une accumulation d'acides organiques au cours du développement entraînant une acidification progressive de l'albumen (Macnicol and Jacobsen, 1992). Cette coopérativité des interactions PINA-gliadines permettrait l'amplification de l'agrégation des prolamines au cours du développement de l'albumen favorisant ainsi au cours de la dessiccation les associations protéines-protéines au détriment des associations amidon-protéines. Au delà de cette étude, ces interactions PIN-prolamines pourraient expliquer le fait qu'aucune corrélation entre teneur en PINs et dureté ne soit observée quand on considère une large population variétale de blés « medium soft » et « medium hard ». Seule la dureté des blés « very soft » et « very hard » est corrélée à la dureté (Igrejas et al., 2002). La composition, notamment le rapport gliadines /gluténines et la teneur en prolamines doit minimiser l'impact des PINs sur la dureté dans une classe de dureté excepté dans les blés riches en PINs (« very soft ») comme Palédor ou très pauvres en PINs (« very hard ») comme Courtot.

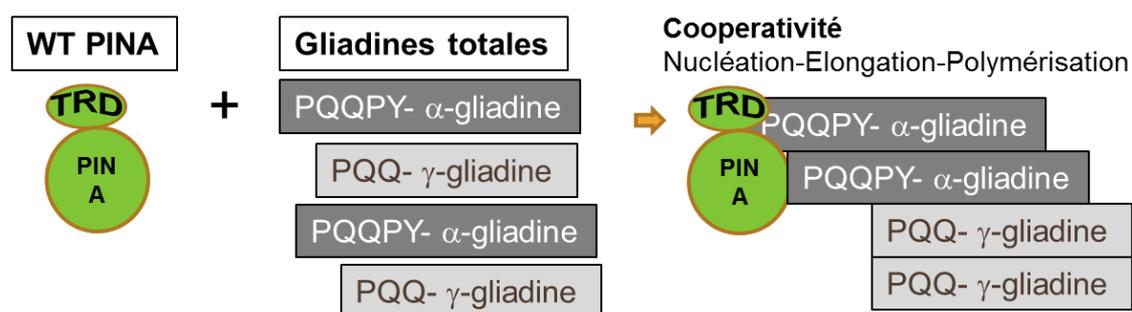


Figure 5.2 : Schéma représentatif du comportement des gliadines en présence de PINA

Ces études doivent être poursuivies en considérant également le rôle de la PINB et de ses « variants hard », seules ou en association avec la PINA. Si de telles approches permettent de mettre en évidence le rôle possible des interactions protéines-protéines dans la texture du grain, il faut souligner qu'elles ont été réalisées *in vitro* en solution diluée, très loin des conditions rencontrées dans l'albumen, milieu confiné et concentré. Comment mettre en évidence ces associations *in situ* ou en milieu concentré?

Pour cela il existe différentes approches ciblées, certaines que nous avons utilisées (Blue Native/SDS-PAGE, précipitation) et qui permettent de mettre en évidence des interactions stables *in vitro*. Pour capturer les interactions moins stables entre protéines et dans leur milieu biologique, la chimie de réticulation serait une méthode adaptée. Pour cela des agents de réticulations se conjuguent à deux protéines suffisamment proches (impliquées dans une interaction). Pour visualiser les interactions, ces agents de réticulations possèdent un groupement photoréactif activé par les radiations UV ou deux groupements fonctionnels (photoréactif et thermoréactif). La chimie de réticulation couplée à la spectrométrie de masse permettrait d'aborder les contraintes de distances entre deux protéines qui interagissent (Paramelle et al., 2011).

Pour aborder les interactions protéines-protéines en milieu concentré, l'utilisation de glutens isolés de lignées isogéniques sur la composition en PIN couplé à des mesures rhéologiques semble prometteuse. En effet comme souligné précédemment les PINs se concentrent dans le gluten. Dans ce contexte nous avons débuté une étude du comportement du gluten issu de deux lignées isogéniques. Falcon soft et Falcon hard en régime harmonique dans le domaine de fréquence 10^{-3} à 36Hz à 20°C. Ces glutens ne diffèrent que par la présence (lignée Soft) ou l'absence (lignée Hard) de PINA. Au préalable les farines ont été délipidées afin

d'éviter les interférences des interactions PIN-lipides sur les interactions protéines-protéines. L'évolution des modules G' et G'' en fonction de la fréquence (rad/s) sont représentés sur une échelle bi logarithmique (**Figure 5.3**).

Le gluten de la lignée Soft montre des valeurs inférieures de G' et G'' que celles de la lignée hard. Les valeurs de G' et G'' sont peu différentes contrairement à ce qui est observé pour le gluten de la lignée hard. Ces résultats montrent que les propriétés des glutens de composition protéique identique, excepté la PINA, présentent des propriétés viscoélastiques très différentes. Cette approche pourrait se poursuivre en incrémentant la teneur en PINA des farines avant ou après la préparation du gluten. Elle pourrait également être complétée par une étude à partir des lignées transgéniques Courtot (blé hard) sur-exprimant la PINA à différents niveaux.

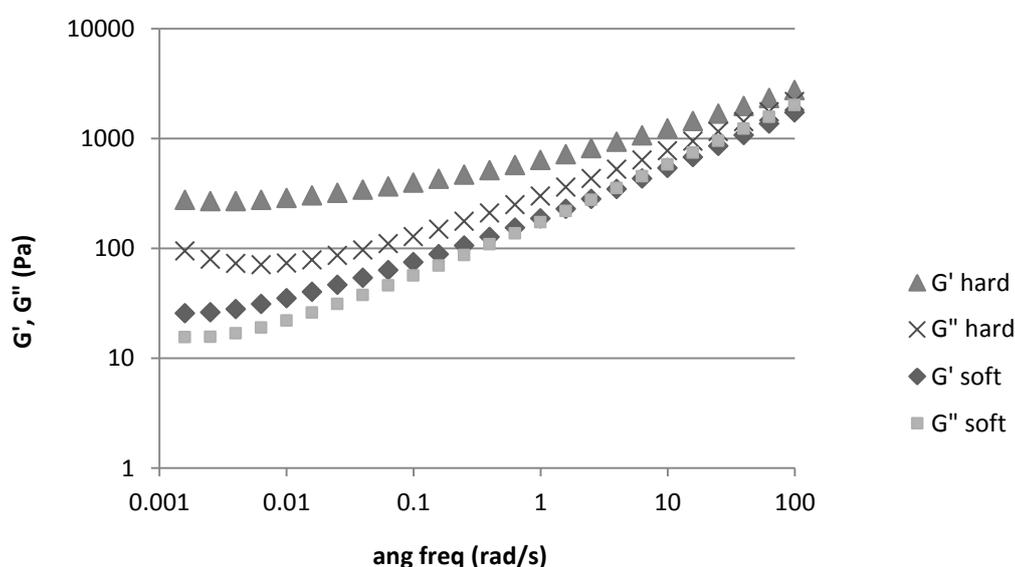


Figure 5.3 : spectres rhéologiques des glutens issus des lignées isogéniques Falcon Hard (absence de PINA) et Soft (présence de PINA).

Le rôle des interactions protéines-protéines et notamment PIN-prolamines sur la dureté du blé ouvre de nouvelles perspectives pour la sélection variétale. En effet si le locus situé sur le bras court du chromosome 5D est associé à un QTL fort expliquant 60% de la dureté, il reste néanmoins une fraction importante non expliquée et qui semble liée à de nombreux QTL mineurs. Il conviendrait de rechercher si ces QTL ne sont pas associés à d'éventuels partenaires protéiques des PINs. Enfin il convient de s'interroger au vu de nos résultats sur l'influence de la

Partie 5. Conclusion et perspectives

teneur en protéines sur la dureté en lien avec la nutrition azotée dans le contexte d'une agriculture durable où l'on cherche à diminuer les intrants sans diminuer la qualité des blés. En effet, la teneur en protéines du blé est étroitement dépendante de l'apport en azote et la dureté des blés augmente avec la teneur en protéines, sans cependant changer le classement « hard » ou « soft » des blés (Abecassis et al., 1997). Il a été par ailleurs montré que la teneur en PINs n'est pas corrélée à la teneur en protéines du grain (Igrejas et al., 2002) ce qui suggère que la nutrition azotée devrait impacter différemment la dureté des blés « soft » et des blés « hard ».

Références

- Abecassis, J., Chaurand, M., and Autran, J.C. **1997**. Structural basis of wheat hardness and technological conséquences. *Int. Agrophysics*. 11: 273-281.
- Clifton, L., Lad, M., Green, R., and Frazier, R. **2007**. Single amino acid substitutions in puroindoline-b mutants influence lipid binding properties. *Biochemistry*. 46: 2260-2266.
- Elmorjani, K., Geneix, N., Dalgarrondo, M., Branlard, G., and Marion, D. **2013**. Wheat grain softness protein (Gsp1) is a puroindoline-like protein that displays a specific post-translational maturation and does not interact with lipids. *Journal of Cereal Science*,. 58: 117-122.
- Igrejas, G., Leroy, P., Charmet, G., Gaborit, T., Marion, D., and Branlard, G. **2002**. Mapping QTLs for grain hardness and puroindoline content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 106: 19-27.
- Lesage, V.S., Bouchet, B., Rhazi, L., Elmorjani, K., Branlard, G., and Marion, D. **2011**. New insight into puroindoline function inferred from their subcellular localization in developing hard and soft near-isogenic endosperm and their relationship with polymer size of storage proteins. *Journal of Cereal Science*. 53: 231-238.
- Macnicol, P.K., and Jacobsen, J.V. **1992**. Endosperm Acidification and Related Metabolic Changes in the Developing Barley Grain. *Plant physiology*. 98: 1098-1104.
- Paramelle, D., Enjalbal, C., Amblard, M., Forest, E., Heymann, M., Cantel, S., Geourjon, C., Martinez, J., and Subra, G. **2011**. Solid-Phase Cross-Linking (SPCL): a new tool for protein structure studies. *Proteomics*. 11: 1277-1286.
- Wanjugi, H.W., Hogg, A.C., Martin, J.M., Giroux, M.J., and **2007**. The role of puroindoline A and B individually and in combination on grain hardness and starch association. *Crop Sci* 47: 67-76.

Thèse de Doctorat

Nathalie ANCIAUX-GENEIX

Interactions protéines-protéines et construction de la texture du grain de blé

Protein-protein interactions and construction of wheat grain texture

Résumé

Il est admis que la texture du grain est un paramètre clé de la valeur d'usage du blé. La dureté, qui décrit cette texture (caractère « hard » ou « soft ») est associée à un locus contenant les gènes des puroindolines (PINs), PINA et PINB, protéines spécifiques de l'albumen. Les mécanismes physico-chimiques associés à ces relations génétiques sont inconnus. Dans ce contexte, l'étude de l'auto-association des PINs montrent qu'une simple mutation de la PINB modifie ses propriétés agrégatives et indirectement celles de la PINA avec laquelle les formes mutées de la PINB interagissent. Ces interactions sont en parfaite adéquation avec l'expression des phénotypes « hard » ou « soft » du blé tendre et soulignent l'importance des interactions protéines-protéines dans l'expression de la texture du grain. En raison de la co-localisation des PINs et des protéines de réserve, au sein de l'albumen de blé, les interactions entre les gliadines et la PINA ont été étudiées. La PINA interagit avec les gliadines selon un phénomène hautement coopératif conduisant à la formation de gros agrégats protéiques. Cette interaction impliquerait préférentiellement les α -gliadines et notamment leur domaine répété. Ces résultats montrent pour la première fois que les interactions protéines-protéines sont vraisemblablement un mécanisme important dans l'expression de la texture du grain. En accord avec ce mécanisme nous avons observé que le niveau de surexpression de la PINA dans un fond génétique « Hard » est significativement et linéairement corrélé au PSI (Particle Size Index), un indicateur de la dureté et indirectement des forces associant matrice protéique et grain d'amidon au sein de l'albumen.

Mots clés

Blé, dureté, puroindoline, gliadine, interaction protéines-protéines.

Abstract

The texture of wheat kernel is essential for its end-uses. Hardness, the main parameter describing kernel texture ("hard" and "soft" phenotypes), is closely related to a locus containing the genes encoding puroindolines (PINs), PINA and PINB, proteins located in the starch-protein matrix of the wheat endosperm. The physicochemical mechanisms, which accounts for these relationships are still matter of debate. In this context, the self-association of PINs shows that a single mutation of PINB changes its aggregative properties and indirectly, those of PINA. These interactions fit well with the expression of the "hard" and "soft" phenotype and emphasize the significant role of protein-protein interactions in the expression of kernel texture. In regard to the co-localisation of PINs and prolamins, storage proteins of wheat, within the endosperm, we investigated the interactions between PINA and gliadins, a protein fraction of prolamins. The interaction of PINA with gliadins is a highly cooperative phenomenon leading to the growth of large protein aggregates. This interaction could specifically involve α -gliadins and especially their repeat domain. These results show, for the first time, that protein-protein interactions are seemingly a significant mechanism for the expression of kernel texture. In agreement with this mechanism, we observed a close and linear relationship between the expression level of PINA in a "hard" genetic background through PSI (Particle Size Index) measurements, a marker of grain hardness and indirectly of the strengths that control the assembly of the endosperm starch-protein matrix.

Key Words

Wheat, hardness, puroindoline, gliadin, protein-protein interaction.