



Optimiser la composition protéique des graines de légumineuses



Gallardo Karine, Le Signor Christine

Cartelier Kévin, Vernoud Vanessa, Thompson Richard, Burstin Judith



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche



Composition des graines de légumineuses

Graine mature de pois



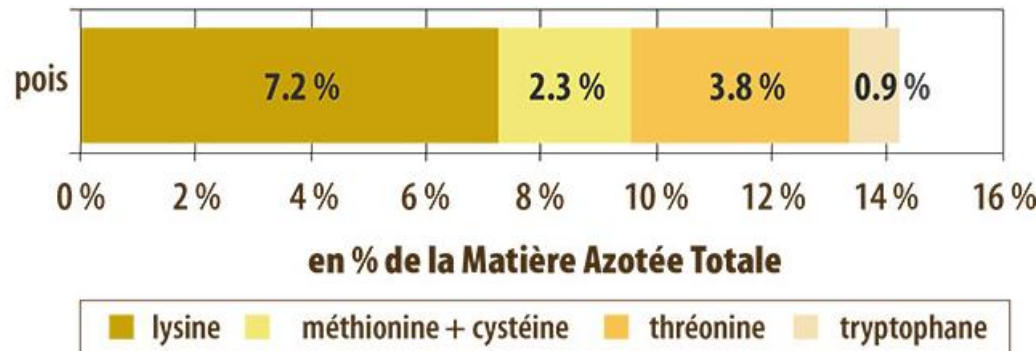
cv. Cameor



Nutrition

Forte teneur en protéines

Teneur en AA essentiels dans les graines de pois



Proportion of essential amino acids in pea seeds - Source: INRA-AFZ-2004

L'équilibre en AA et la digestibilité sont d'importants déterminants de la qualité nutritionnelle des graines



La composition protéique des graines de pois: un caractère complexe

Protéines de réserve :

ALBUMINES

Albumines (●)
(PA1 & PA2)



Riches en S

$0,41 \pm 0,23$

GLOBULINES 7S et 11S

Vicilines (●)
Convicilines (●)



Pauvres en S

$0,88 \pm 0,04$

Légumine (●)



Riches en S

$0,63 \pm 0,04$

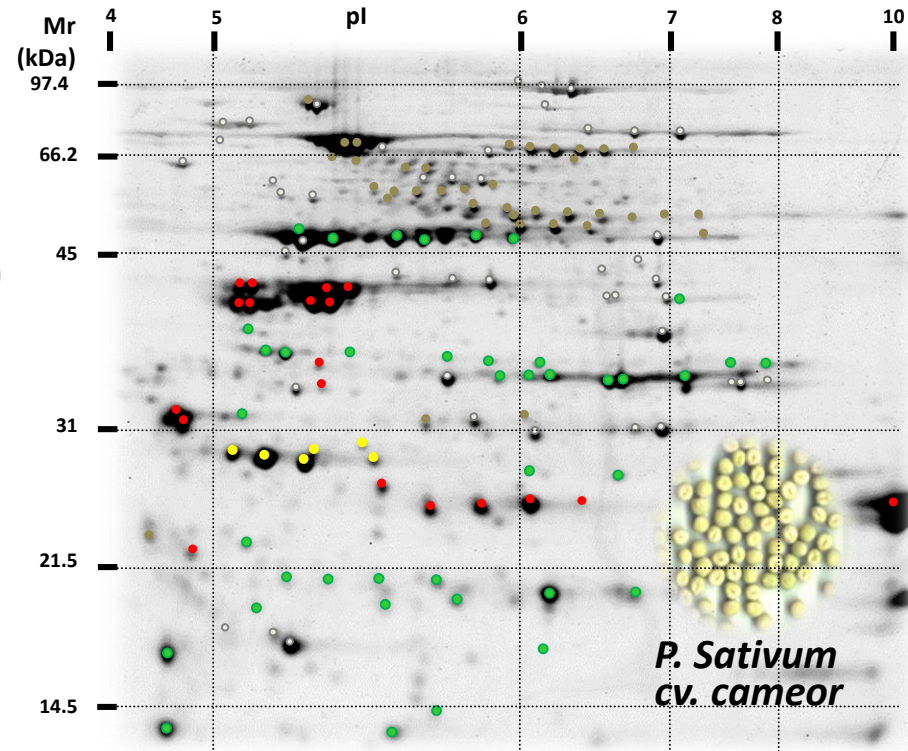
Digestibilité *in vitro*

Rubio et al., J Sci Food Agric. 2014

Variabilité structurelle

>30 gènes codant ces protéines de réserve

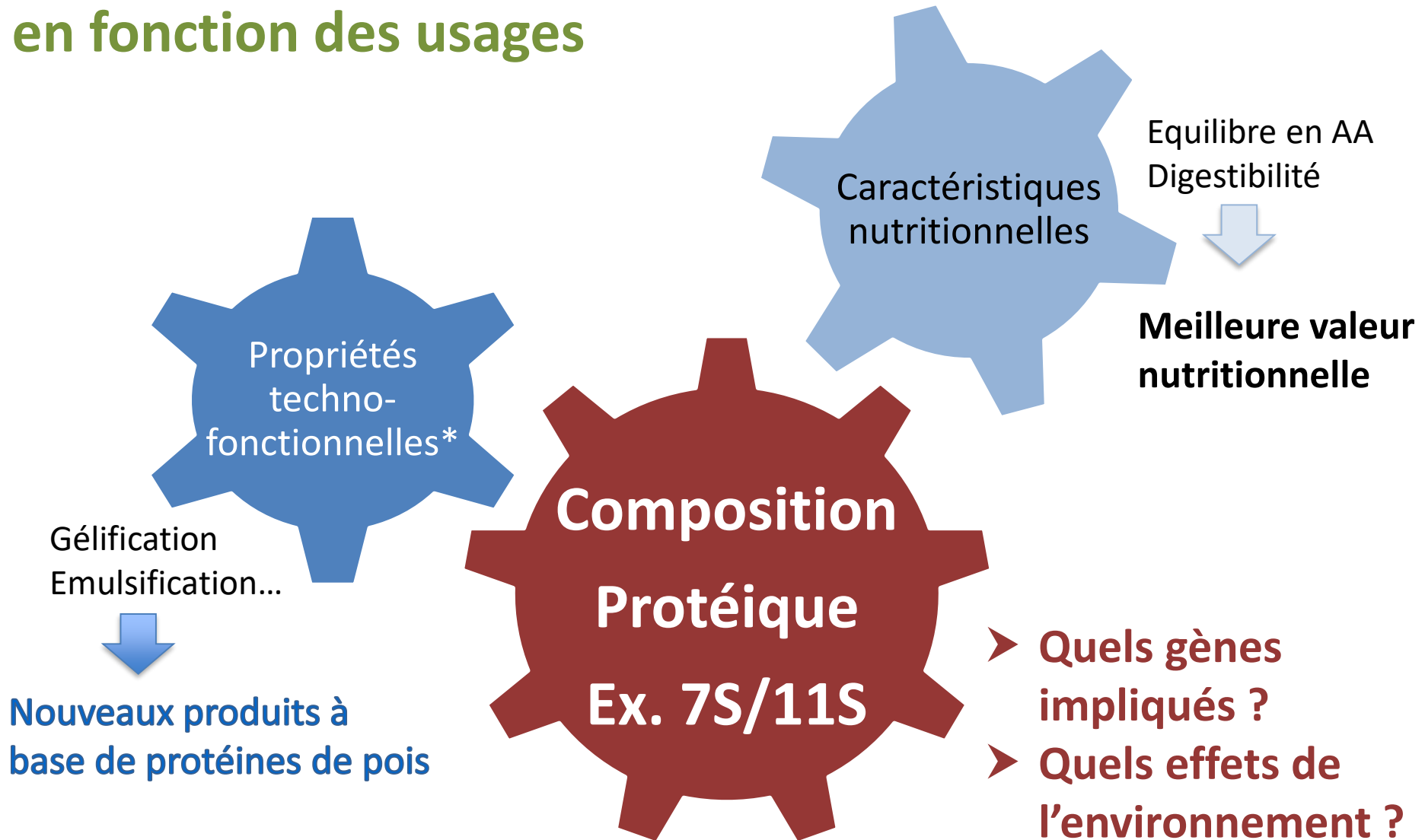
Nombreuses modifications post-traductionnelles (95 spots identifiés)



<http://195.220.91.17/legumbase/peaseedmap/index.html>

Bourgeois et al. Proteomics 2009. Vol 9 254-71

Adapter la composition protéique des graines de pois en fonction des usages

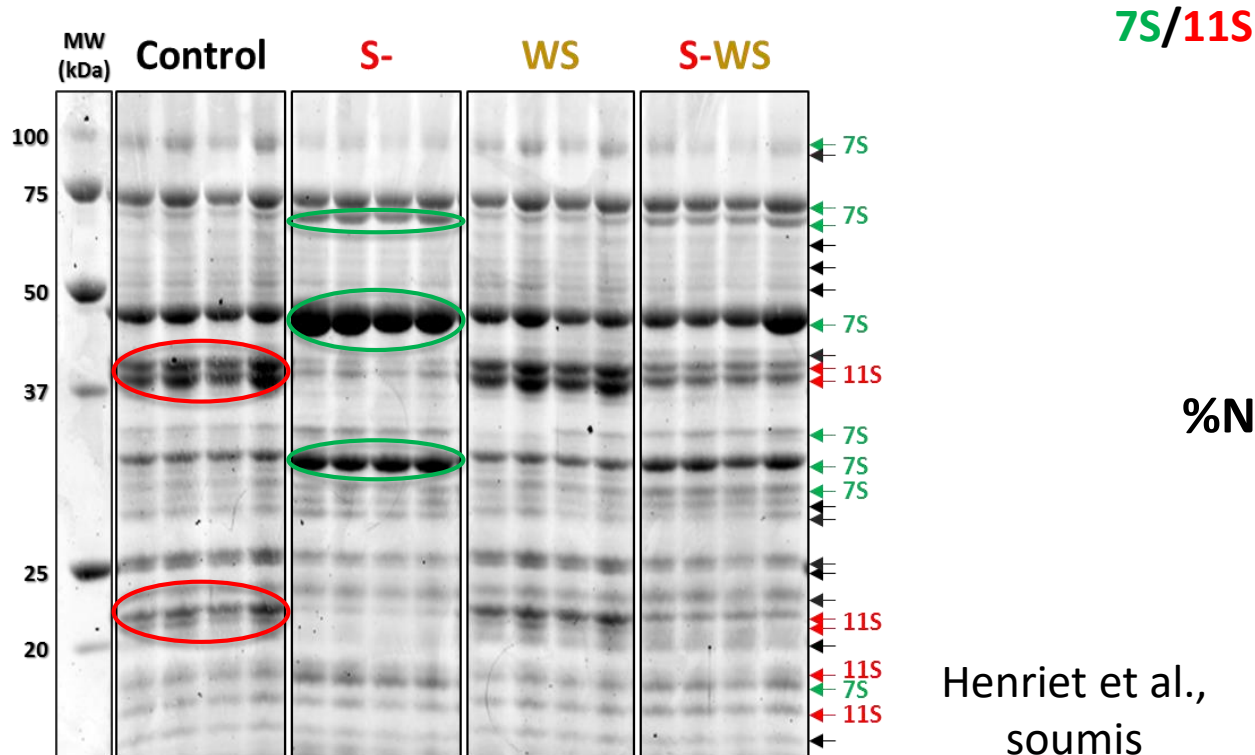


Effet d'une carence en soufre et/ou d'un stress hydrique sur la composition protéique des graines de pois

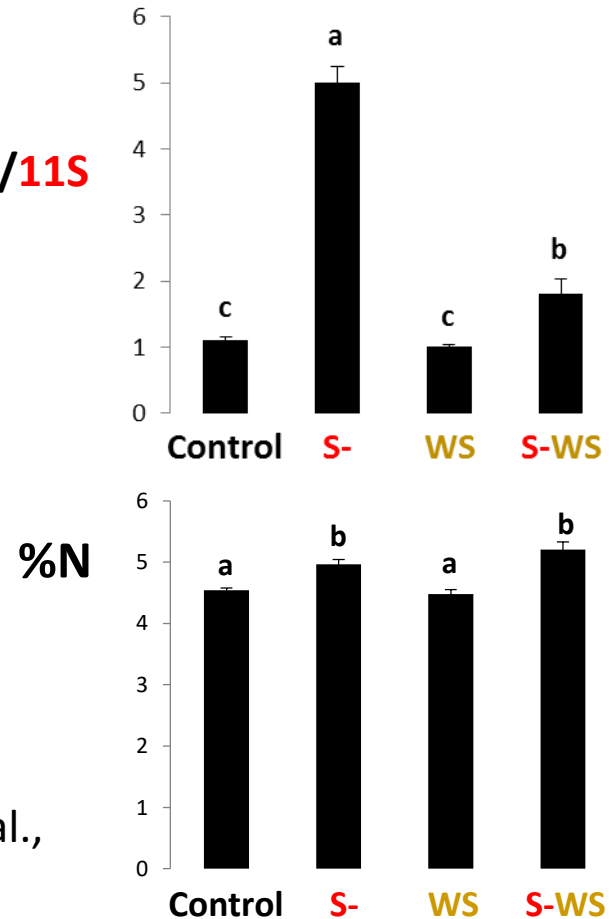
S- = carence en soufre depuis un stade mi-végétatif

WS = stress hydrique modéré de 9j à partir de floraison

S-WS = les deux stress combinés



Profil protéique après électrophorèse mono-dimensionnelle



Quels gènes impliqués ?

Atouts du modèle *Medicago truncatula*

→ Forte synténie avec le génome du pois

→ Séquences génomiques disponibles pour > 200 écotypes rendant possible des analyses GWAS (Génétique d'association à l'échelle du génome)

Stanton-Geddes et al., PloS One 2013.

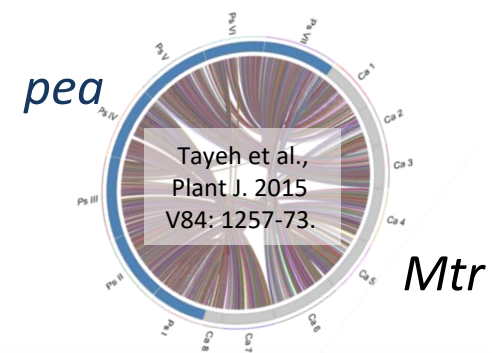
→ La composition protéique des graines est proche de celle du pois

Gallardo et al., C R Biol. 2008.

et caractérisée par protéomique

<http://www.thelegumeportal.net/medicago-seed-proteome/>

Zuber et al., Plant J 2013



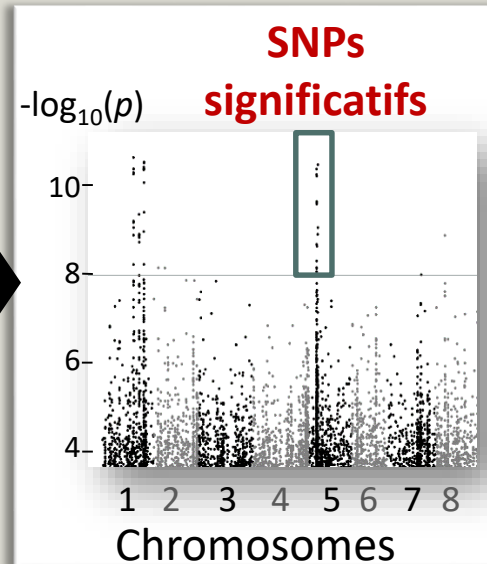
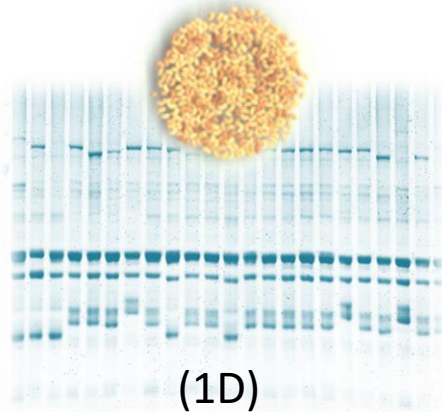
GWAS pour la composition protéique des graines chez *M. truncatula*



Photo CC192,
UMR AGAP

175 écotypes de *M. truncatula* (core-collection CC192, Ronfort *et al.*, BMC Plant Biol. 2006)

PROTEOTYPAGE DES GRAINES



GENOTYPAGE PAR SEQUENCAGE

HAPMAP

medicagohapmap.org
Stanton-Geddes *et al.*, 2013

↪ **6 013 644 SNPs**

- Position des SNPs (exons, introns, intergéniques, ..)
- Annotation des gènes
- Profil d'expression (atlas) Benedito *et al.*, 2008

Gènes porteurs des **SNPs significatifs** = **candidats**



M. truncatula ↔ *P. sativum*

Orthologie et expression

Alves-Carvalho *et al.*, Plant J 2015; Tayeh *et al.*, Plant J 2015

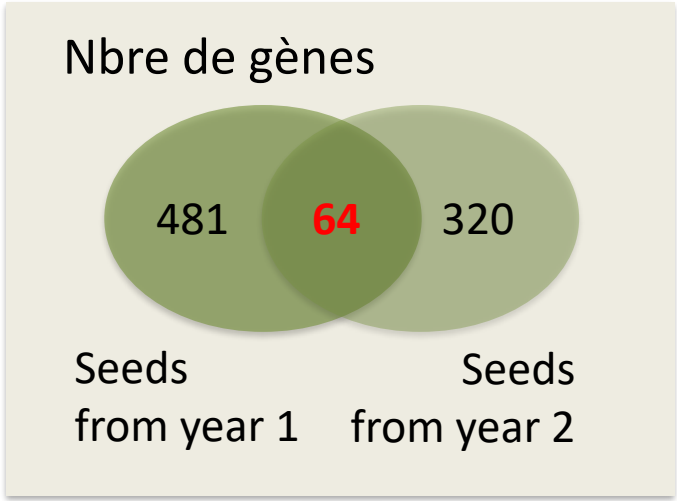
Recherche de variants alléliques (naturels ou induits) chez le pois



APPROCHE
TRANSLATIONNELLE



Gènes révélés par GWAS (1D) chez *M. truncatula*

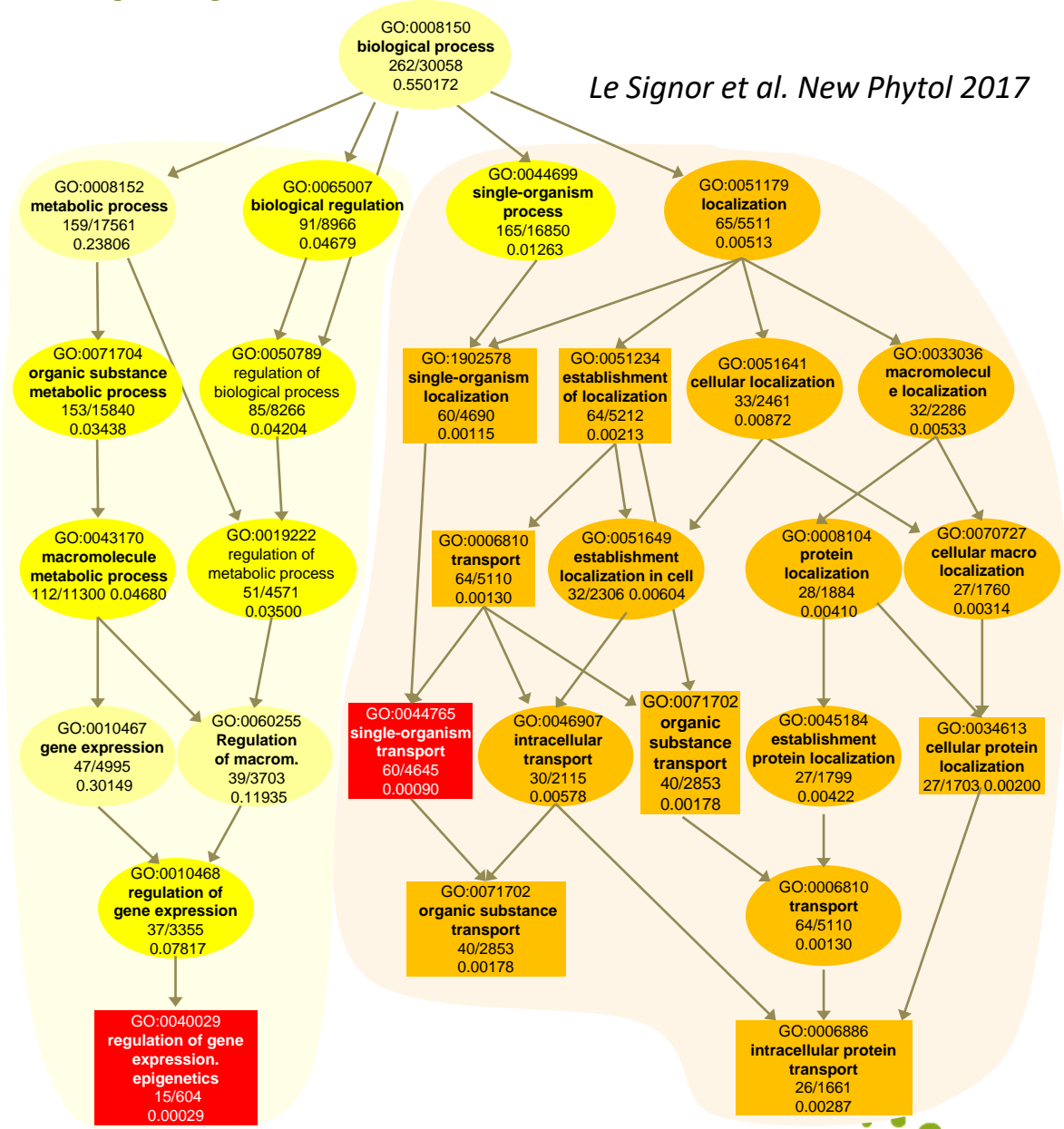


Deux processus biologiques majeurs révélés par enrichissement GO (TopGO):

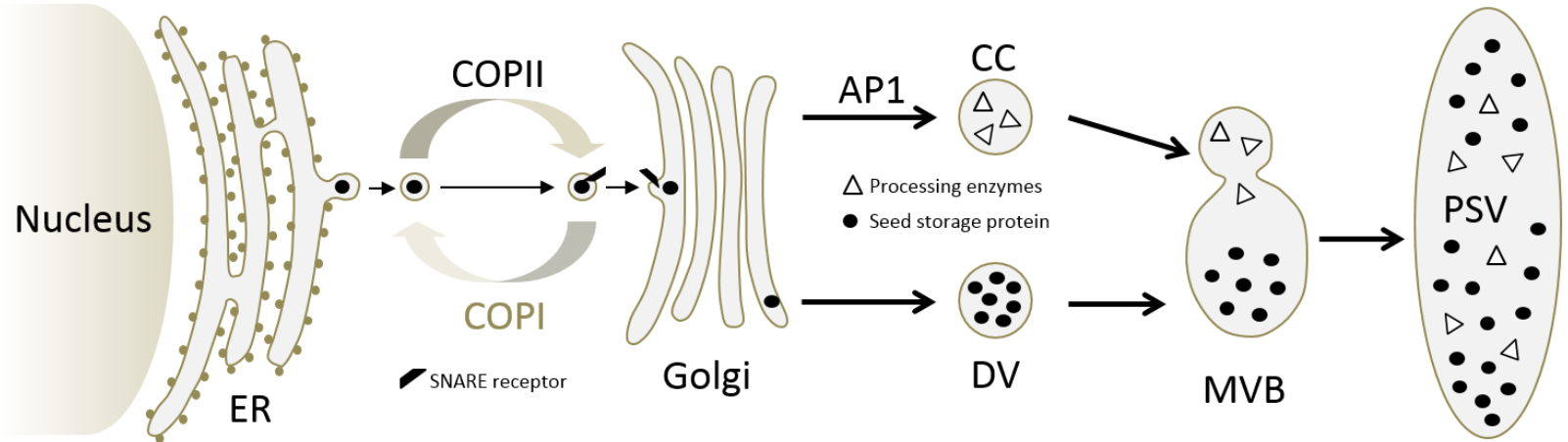
Regulation and transport

($P < 0.001$, Fisher test)

Le Signor et al. New Phytol 2017



Gènes candidats pour la synthèse, le transport et la mise en réserve des protéines dans les graines

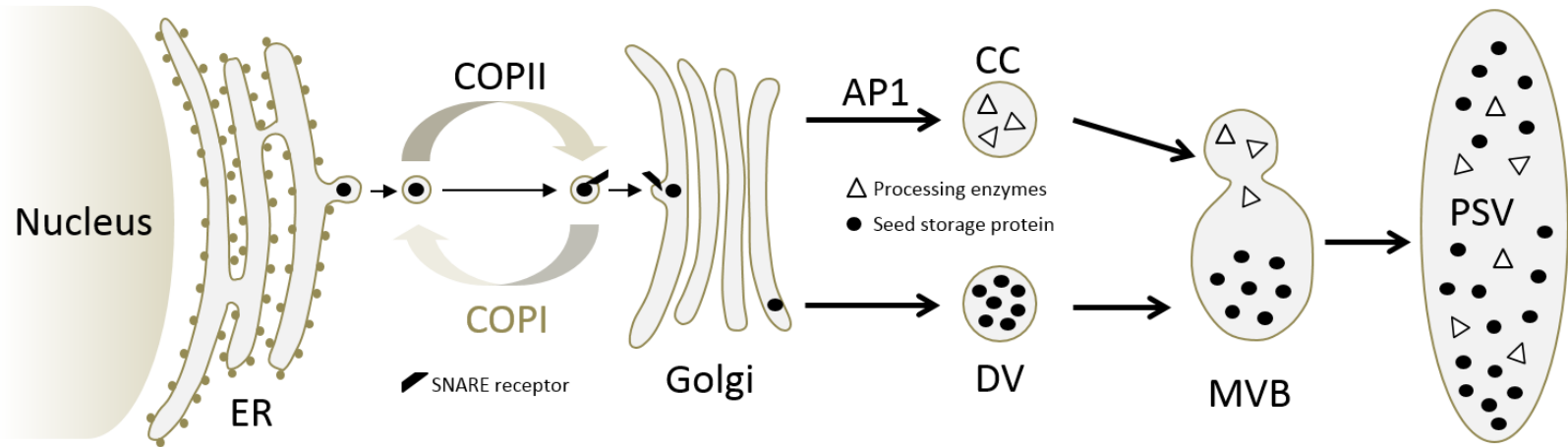


Synthesis	Sorting and trafficking (PTM)	Processing and deposition
¹ Medtr7g104480/ABI5* ¹ Medtr4g097950/bHLH#1* ¹ Medtr8g020560/GRF5* ¹ Medtr8g043960/bZIP* ¹ Medtr8g020490/MYB#1* ² Medtr1g070460/SRP9* ² Medtr1g017870/FKBP* ² Medtr7g026260/GTF* ² Medtr7g060680/GTF* ³ Medtr7g104890/SRP54* ²⁻³ Medtr7g004180/PDI	²⁻³ Medtr7g111710/Sec23* ²⁻³ Medtr7g112090/SAR* ³ Medtr4g121860/SAR ⁴ Medtr6g069420/GST* ² Medtr4g006570/GOS11 ² Medtr7g112730/glycosidase ⁴ Medtr5g093600/SYP31* ³⁻⁴ Medtr8g023620*	²⁻³⁻⁴ Medtr7g097010/ESCRTI* ²⁻³⁻⁴ Medtr7g097170/ESCRTII* ¹ Medtr2g081620 ² Medtr4g101730/VPE* ³⁻⁴ Medtr1g101030/exopeptidase* Other uncharacterized proteases :

Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT), invagination and protein sorting to MVB (Winter and Hauser, 2006 Trends Plant Sci)
 ➔ a plant-specific ESCRTI component, FREE1, plays a crucial role in PSV biogenesis and transport of 12S globulins in Arabidopsis (Gao et al., 2015 PNAS).

ER, endoplasmic reticulum; DV, dense vesicles; MVB, multivesicular bodies; PSV, protein storage vacuoles; ap, adaptor protein complexes; CC, clathrin coat vesicles; PTM, post-translational modifications (glycosylation, phosphorylation).

Gènes candidats pour la synthèse, le transport et la mise en réserve des protéines dans les graines



Le Signor et al. New Phytol 2017

Processing and deposition

ID	annotation	CHR Mb	2D	1D	Affy_id <i>Benedito et al., 2008 Plant J</i>	Relative expression during seed development (days after pollination)	2-3-4Medtr7g097010/ ESCRTI* 2-3-4Medtr7g097170/ESCRTII*	1Medtr2g081620 2Medtr4g101730/VPE* 3-4Medtr1g101030/ exopeptidase*
						10 12 16 20 24 36		
Medtr1g051175	serine carboxypeptidase-like protein	1 20		Leg				
Medtr1g069870	peptidase S24/S26A/S26B/S26C family	1 30,5		Leg				
Medtr1g069890	peptidase S24/S26A/S26B/S26C family	1 30,5		Leg Leg				
Medtr1g073130*	carboxy-terminal processing peptidase-like	1 32,4	Leg	Leg+Conv	Mtr.50308.1.S1_at			
Medtr1g100980*	signal peptide peptidase-like protein	1 45,3	Leg	Conv	Mtr.37941.1.S1_s_at			
Medtr1g101030*	tripeptidyl peptidase II	1 45,4	Leg	Conv	Mtr.22279.1.S1_at			
Medtr2g449850	serine carboxypeptidase-like protein	2 22		Leg				
Medtr2g081620	serine carboxypeptidase-like protein	2 34,2	Leg		Mtr.16862.1.S1_at			
Medtr4g101730*	vacuolar processing enzyme	4 42	Leg		Mtr.19934.1.S1_at			
Medtr4g130550	S49 protease IV family peptidase	4 54,4	Leg		Mtr.26059.1.S1_s_at			

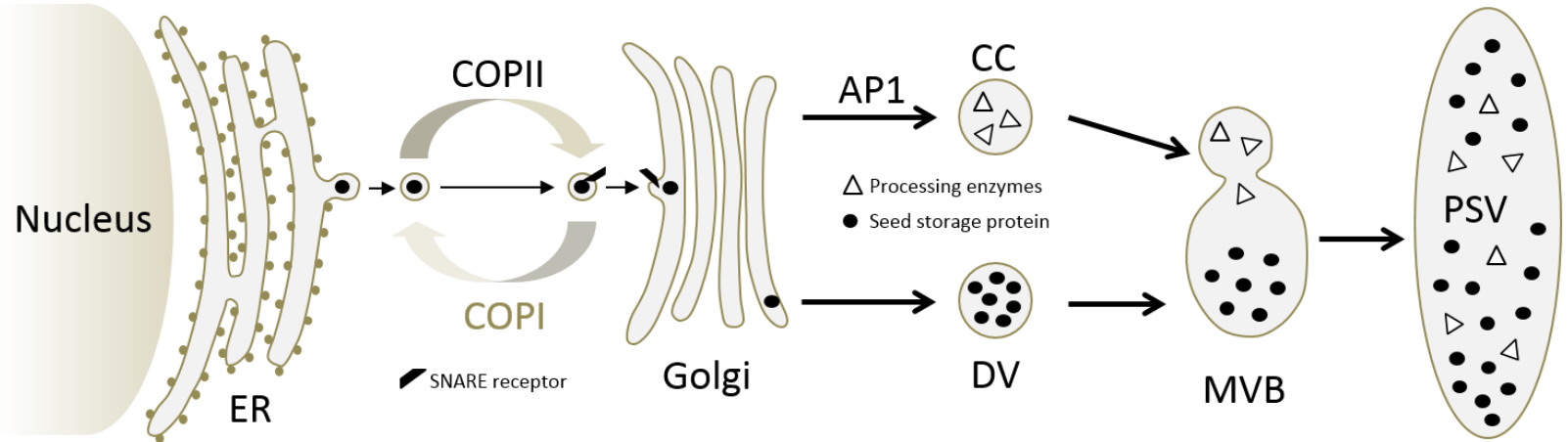
Cibles pour modifier la structure des globulines

Liste disponible dans Innov. Agro. (Gallardo et al. 2017, V60: 43-57)

(*) A putative ortholog was identified in the pea RNA-seq gene atlas from Alves-Carvalho et al., Plant J. (2015).



Gènes candidats pour la synthèse, le transport et la mise en réserve des protéines dans les graines



Synthesis

¹Medtr7g104480/ABI5*
¹Medtr4g097950/bHLH#1*
¹Medtr8g020560/GRF5*
¹Medtr8g043960/bZIP*
¹Medtr8g020490/MYB#1*
⁴Medtr3g083540/MYB5*
⁴Medtr3g095190/AP2
⁴Medtr1g072320/bHLH#3*
⁴Medtr4g047800/HDG2*
⁴Medtr8g070660*
³⁻⁴Medtr8g069935/WRKY
³⁻⁴Medtr5g038910/MYB#2*
³⁻⁴Medtr7g097090/NAC*
³⁻⁴Medtr7g097070/JMJC*

Sorting and trafficking (PTM)

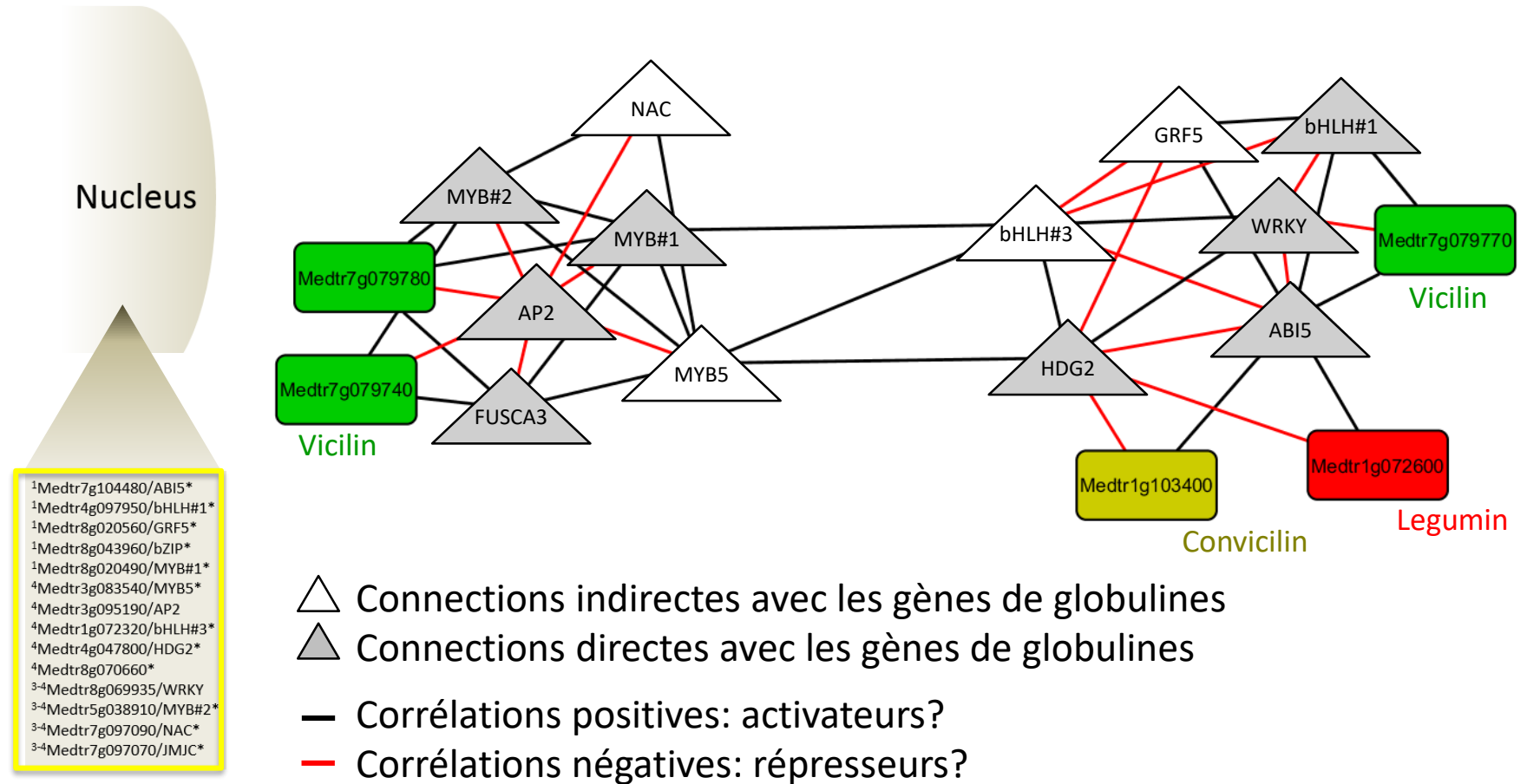
²Medtr1g070460/SRP9*
²Medtr1g017870/FKBP*
²Medtr7g026260/GTF*
²Medtr7g060680/GTF*
³Medtr7g104890/SRP54*
²⁻³Medtr2g094180/PDI
³⁻⁴Medtr3g030520/PDI
²⁻³⁻⁴Medtr7g097190*
²⁻³⁻⁴Medtr7g097200*
²Medtr2g016490/Kinase*
²⁻³Medtr7g111710/Sec23*
²⁻³Medtr7g112090/SAR*
³Medtr4g121860/SAR
⁴Medtr6g069420/GST*
²Medtr4g006570/GOS11
²Medtr7g112730/glycosidase
⁴Medtr5g093600/SYP31*
³⁻⁴Medtr8g023620*

Processing and deposition

²⁻³⁻⁴Medtr7g097010/ESCRTI*
²⁻³⁻⁴Medtr7g097170/ESCRTII*
¹Medtr2g081620
²Medtr4g101730/VPE*
³⁻⁴Medtr1g101030/
 exopeptidase*
 Other uncharacterized
 proteases :
²Medtr1g069870, ²Medtr1g069890, ²Medtr4g130550
³Medtr1g017520*, ³Medtr1g051175, ³Medtr1g100980*
³Medtr2g449850, ⁴Medtr1g073130*, ⁴Medtr5g019600*
⁴Medtr6g079440*

Parmi les 52 gènes identifiés, 41(*) ont un orthologue putatif chez le pois (RNA-seq gene atlas, Alves-Carvalho *et al.*, Plant J 2015).

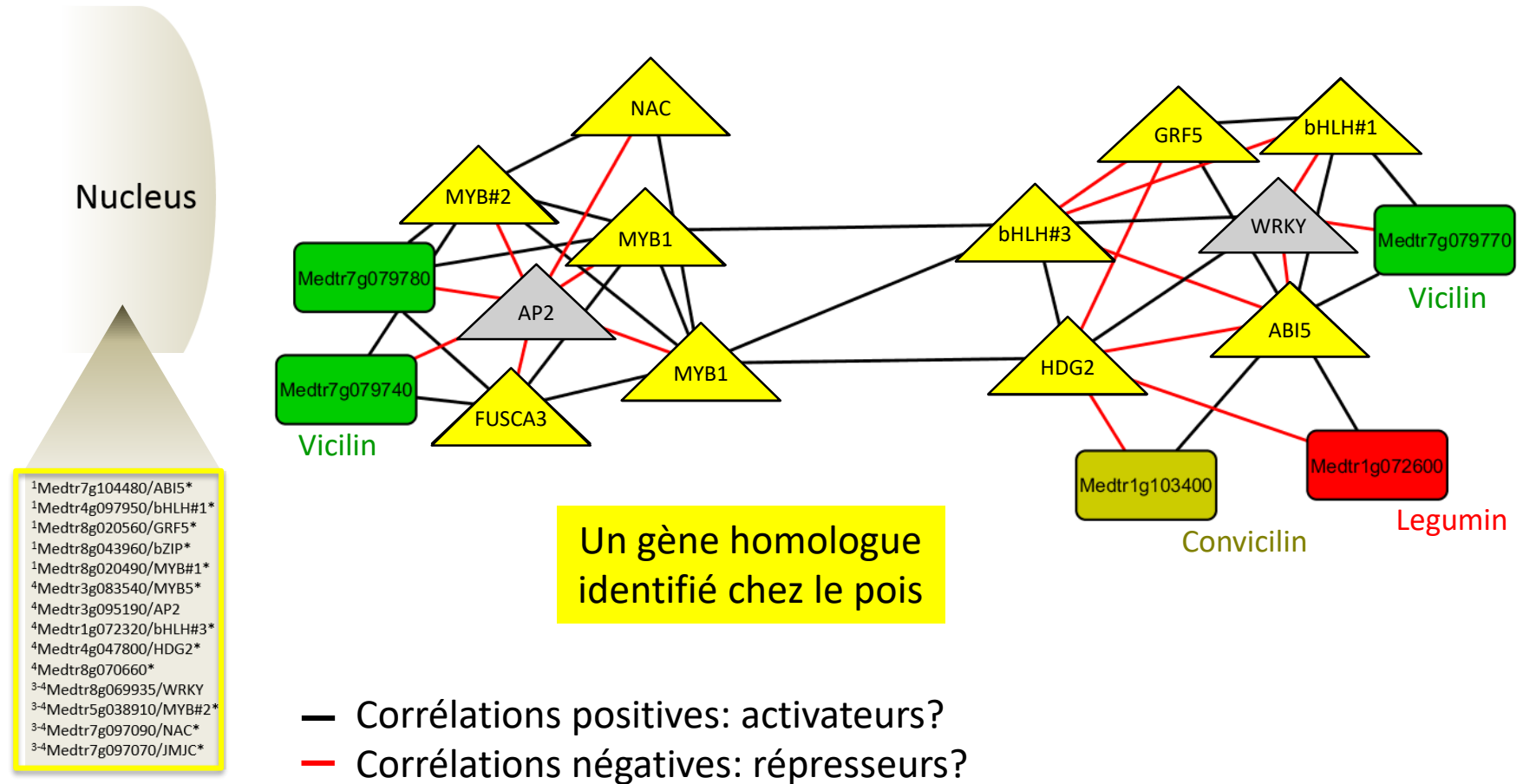
Réseau de co-expression entre les facteurs de transcription identifiés et les gènes codant les globulines



Réseau développé en collaboration avec J. Buitink (IRHS Angers)
données d'expression issues de Righetti et al. Plant Cell 2015



Réseau de co-expression entre les facteurs de transcription identifiés et les gènes codant les globulines



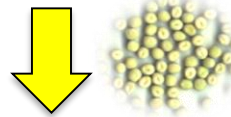
Réseau développé en collaboration avec J. Buitink (IRHS Angers)
 données d'expression issues de Righetti et al. Plant Cell 2015



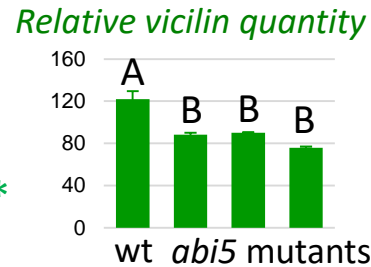
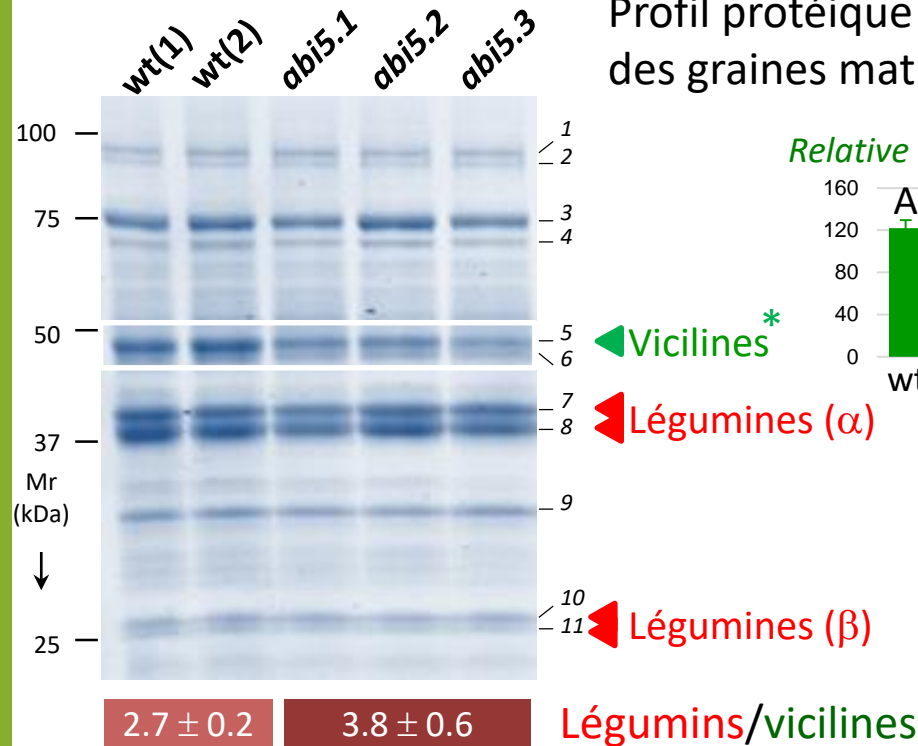
ABI5 controle l'accumulation des globulines chez le pois



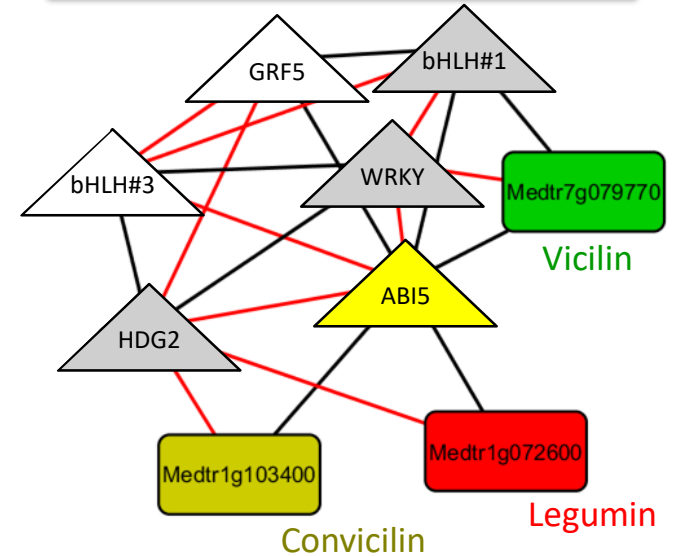
Trois mutants *abi5*
isolés et purifiés
Zinsmeister et al., Plant Cell. 2016



Profil protéique 1D
des graines matures



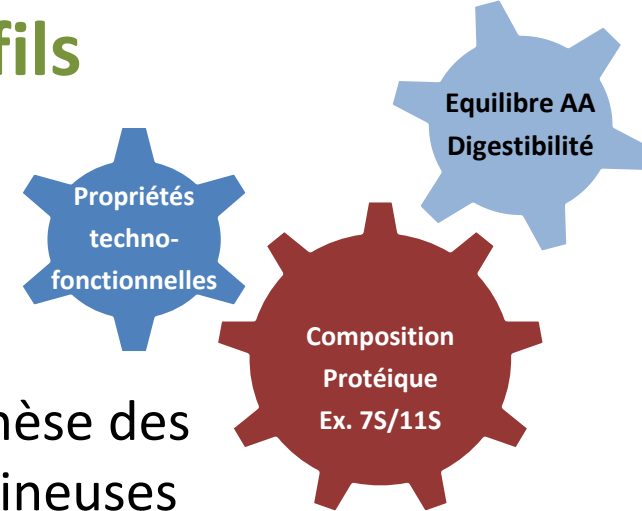
Un orthologue identifié
chez le pois pour ABI5



Même teneur en protéines
↗ rapport légumine/viciline



Vers l'identification de nouveaux profils protéiques à forte valeur ajoutée



- ➔ Premier répertoire de gènes contrôlant la synthèse des protéines de réserve dans les graines de légumineuses
 - ➔ Identification de variants alléliques chez le pois pour les gènes (écotypes, TILLING mutants)
 - ➔ Evaluer la valeur nutritionnelle et les propriétés techno-fonctionnelles des fractions protéiques modifiées.
- ➔ Recherche en cours des régulateurs de la plasticité du rendement et de la composition protéique des graines vis-à-vis de stress abiotiques

ANR-REGULEG (2016-19, coord. Julia Buitink)

H2020-EUCLEG (2018-21, coord. Bernadette Julier)

Remerciements

UMR Agroécologie, Dijon

FILEAS:

Christine Le Signor

Delphine Aimé

Myriam Sanchez

Charlotte Henriët

Kévin Cartelier

Brigitte Darchy

Vanessa Vernoud

Richard Thompson

ECP:

Judith Burstin

Gérard Duc

Jonathan Kreplak

Grégoire Aubert

University of Minnesota

Nevin D. Young

IRHS Angers

Julia Buitink

Olivier Leprince

LIPM Toulouse

Jerôme Gouzy

Plateformes de spectrométrie de masse

Valérie Labas

Maya Belghazi

UMR AGAP, Montpellier

Jean-Marie Prosperi

Joëlle Ronfort

