

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE,
DE LA SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N° 566

Thèse

présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
Spécialité Physiologie et Génétique Moléculaires

Soutenue le 15 décembre 2011

par

Véronique LESAGE

**Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur
contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen du grain de blé
par l'étude de lignées quasi-isogéniques**

Président :	Saïd MOUZEYAR	Professeur, Univ. Blaise Pascal, Clermont-Ferrand
Rapporteurs :	Françoise CORBINEAU	Professeur, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI
	Thierry AUSSÉNAC	Professeur, Institut Polytechnique LaSalle, Beauvais
Directeurs de thèse:	Gérard BRANLARD	Directeur de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand
	Didier MARION	Directeur de Recherche, INRA, Nantes

Unité Mixte de Recherche 1095 INRA-Université Blaise Pascal
Génétique, Diversité et Écophysiologie des Céréales
63100 Clermont-Ferrand

À Frédéric, Raphaël et Pauline,
les trois grands bonheurs de ma vie

« Dans vingt ans tu seras plus déçu par les choses que tu n'as pas faites que par celles que tu as faites, alors largue les amarres, va naviguer loin du port tranquille, prend les alizés dans tes voiles. Explore. Rêve. » **Mark Twain**

Remerciements

Arrivée à la fin de ce projet, j'ai beaucoup de gratitude à exprimer pour toute l'aide que j'ai reçue de la part de tant de personnes.

Je voudrais tout d'abord remercier Michel Beckert, directeur de l'UMR 'Amélioration et Santé des Plantes' au moment où j'ai commencé cette thèse, d'avoir cru en mon projet, d'avoir été mon premier directeur de thèse et de m'avoir permis de m'y consacrer en parallèle de mes activités au sein du laboratoire.

Je remercie Gilles Charmet, Directeur de l'UMR 'Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales' pour m'avoir laissé le temps d'approfondir mon sujet de recherche et l'Inra pour le financement de ma thèse.

J'ai aussi des remerciements tout particuliers à exprimer à Gérard Branlard, mon directeur de thèse actuel, pour son soutien dès le début de mon projet, sa disponibilité sans faille et son sens des relations humaines.

Tous mes sincères remerciements vont également à Didier Marion, co-directeur de ma thèse, pour les discussions fructueuses et le partage de son savoir.

Un grand merci à Catherine Feuillet, responsable de l'équipe 'Génome', pour la pertinence de ses conseils, en particulier dans le cadre de mon comité de thèse, et son enthousiasme communicatif.

J'ai aussi plaisir à exprimer ma reconnaissance à Patricia Drevet, à qui je dois d'avoir osé me lancer dans cette aventure, pour m'avoir simplement dit « bien sûr que tu peux le faire ! » et pour son amicale présence.

Je voudrais que tous mes collègues de l'UMR 'Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales', même si je ne peux pas tous les nommer, trouvent ici l'expression de toute ma gratitude pour leur aide au cours de toutes ces années, en premier lieu Marie-Claire Debote, pour son soutien et son implication dans mon travail de recherche, mais aussi toute l'équipe 'Génome' qui m'entoure au quotidien et m'apporte son aide et ses compétences, ainsi que les équipes des serres et du domaine. Je remercie aussi particulièrement Marielle Merlino, pour m'avoir initiée au monde des protéines et pour sa disponibilité et ses précieux conseils. Merci à tous les membres de l'équipe 'Protéomique' pour leurs conseils avisés, les discussions et le travail dans la bonne humeur. Mention spéciale à Clément pour ses blagues et ses tours de magie, qu'il a partagés avec moi en même temps que ses compétences en analyse d'images...

Merci à Christine Girusse et Brigitte Gaillard-Martinie pour leurs conseils qui ont accompagné mes premiers pas en microscopie à transmission.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Brigitte Bouchet pour son implication dans mon travail en microscopie électronique, ainsi qu'à Sandra et Philippe, pour leur accueil à Nantes.

Merci à Nicolas Guilhot pour ses conseils en informatique et mise en forme des images, et à Jacques Bordes pour l'utilisation de l'ACP.

Des remerciements affectueux vont à mes parents, Bernard et Louïsette, à Serge, Corinne et Christine, mes frère et sœurs, pour leur soutien indéfectible pendant ces années de thèse, qui ont aussi été le témoin de bouleversements personnels.

Et enfin, merci à Eric, Solange, Jacqueline et Didier, Jacques M, Henri, Jacques LB, Bertrand et Nadine, Pierre, Etienne et Christine, Marie-Christine, Jean-Sylvain et les Beddouza's friends qui m'ont entourée de leur amitié si précieuse.

Résumé

Contribution à la validation fonctionnelle du gène majeur contrôlant la dureté/tendreté de l'albumen du grain de blé par l'étude de lignées quasi-isogéniques.

La dureté du grain de blé est un des paramètres fondamentaux de la texture de l'albumen. Ce caractère, essentiel pour la valeur d'utilisation des farines, est fortement lié à l'absence ou à la modification des puroindolines. Afin de mieux comprendre la fonction biologique de ces protéines dans le grain de blé (*Triticum aestivum* L.), nous avons étudié à quatre stades de développement du grain la localisation subcellulaire des puroindolines par immunocytochimie et les protéomes dans deux lignées de blé quasi-isogéniques pour la dureté. Dès la fin de la cellularisation de l'albumen, les puroindolines sont localisées sur la face interne des membranes vésiculaires et dans les corps protéiques en formation, structures dans lesquelles s'accumulent les protéines de réserve du grain. L'analyse par AFFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation) des deux lignées Hard et Soft, qui diffèrent essentiellement par l'absence du gène *Pina* dans la lignée Hard, a montré une corrélation entre la dureté et la taille des polymères de protéines de réserve. L'analyse protéomique des fractions albumines/globulines et amphiphiles des grains en développement a révélé une augmentation des protéines de la machinerie de repliement et de réponse au stress dans la lignée Hard, par rapport à la lignée Soft. Les deux approches méthodologiques utilisées semblent également mettre en évidence une cinétique de développement du grain raccourcie dans la lignée Hard. Ces observations suggèrent que les puroindolines interagissent avec les protéines de réserve du grain et suivent le même routage cellulaire. Elles pourraient être impliquées dans les mécanismes de repliement et d'assemblage des prolamines.

Mots-clés : Albumen, Blé, Développement du grain, Dureté, Protéines de réserve, Puroindolines, UPR, stress oxydant

Contribution to functional validation of the major gene controlling hardness/softness trait in bread wheat endosperm of near-isogenic lines.

Wheat grain hardness, a major trait for endosperm texture and flour end-use properties, is strongly associated to absence or modification of puroindolines. To gain insight into biological function of those proteins in bread wheat kernel (*Triticum aestivum* L.), puroindolines' subcellular localization was sought by immunocytochemistry and proteomes were analyzed at four stages of developing kernels in two near-isogenic lines for hardness, differing mainly in the absence of *Pina* in the Hard line. As early as the end of endosperm cellularisation, puroindolines were localized onto vesicular membranes and into protein bodies, where storage proteins accumulate. Using AFFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation), we observed a correlation between hardness and storage protein polymer size. Proteomic analyses of the albumin/globulin and amphiphilic fractions revealed an increase in folding and stress-related proteins in the Hard line, as compared to the Soft one. Both ultrastructural and proteomic studies suggested also that the Hard/Soft genotype affects the kinetics of kernel development. These lines of evidence imply that puroindolines interact with storage proteins and display the same routage. Puroindolines could therefore be involved in prolamines folding and assembly mechanisms.

Keywords: Endosperm, Hardness, Kernel development, Oxidative stress, Puroindolines, Storage proteins, Unfolded Protein Response, Wheat

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	5
Sommaire	8
Table des illustrations.....	12
Abréviations.....	12
Problématique	14
Bibliographie	16
1 Le blé.....	17
1.1 Classification botanique	17
1.2 Phylogénie.....	17
2 Structure, développement et composition du grain	18
2.1 Structure histologique.....	18
2.2 Développement	18
2.2.1 Formation des granules d'amidon	19
2.2.2 Formation des corps protéiques	19
2.3 Composition biochimique	20
2.3.1 L'amidon	20
2.3.2 Les protéines de réserve	21
3 La qualité du grain de blé.....	23
4 La dureté du grain	24
4.1 Différences de structure entre blés Hard et Soft.....	24
4.2 Facteurs génétiques.....	25
4.3 Facteurs biochimiques	26
4.3.1 Friabiline/puroindolines	26
4.3.2 Autres facteurs intervenant sur la dureté	26
4.4 Facteurs génomiques.....	27
5 Les puroindolines	29
5.1 Structure biochimique	29
5.2 Expression dans le grain en développement.....	30
5.3 Localisation tissulaire.....	30
5.4 Propriétés.....	31
5.4.1 Liaison aux lipides et propriétés moussantes.....	31
5.4.2 Propriétés antimicrobiennes	32
5.4.3 Interactions Pina-Pinb	33

5.5	Fonctions supposées.....	34
Matériel et méthodes	40
	Matériel végétal.....	41
1	Matériel génétique.....	41
2	Production du matériel végétal.....	41
	Méthodes	43
3	Caractérisation phénotypique.....	43
3.1	Dureté	43
3.2	Taille des granules d'amidon.....	43
3.3	Taille des polymères de protéines de réserve.....	43
3.4	Spectrocolorimétrie des farines	44
4	Caractérisation biochimique	44
4.1	Protéines totales.....	44
4.2	Amidon.....	44
5	Caractérisation génomique des lignées quasi-isogéniques	45
5.1	Caractérisation génomique par marqueurs DArT.....	45
5.2	Caractérisation génomique du locus <i>Ha</i> par marqueurs ISBP.....	45
5.3	Caractérisation génomique du locus <i>Ha</i> par marqueurs géniques	46
6	Traitement des échantillons pour la microscopie électronique	46
7	Préparation des échantillons pour la protéomique	48
7.1	Prétraitement à l'acétone	48
7.2	Extraction des albumines-globulines	48
7.3	Extraction des amphiphiles	49
7.4	Dosage Bradford	50
8	Electrophorèse bidimensionnelle.....	50
8.1	Première dimension.....	50
8.2	Deuxième dimension	51
9	Analyse d'images.....	52
10	Prélèvement et préparation des spots protéiques.....	52
11	Identification des protéines par spectrométrie de masse	53
Résultats	55
	Caractérisation génomique des lignées quasi-isogéniques.....	56
1	Niveau d'isogénicité du génome	56
2	Niveau d'isogénicité du locus <i>Ha</i>	56

2.1	Marqueurs ISBP	56
2.2	Marqueurs géniques	56
	Caractérisation phénotypique des lignées quasi-isogéniques	57
1	Dureté	57
2	Poids de mille grains	57
3	Couleur des farines et des sons	58
4	Protéines	60
5	Amidon	61
6	Taille des granules d'amidon	61
	Localisation des puroindolines in situ	63
	Article 1 : New insight into puroindoline function	65
	Analyse protéomique du grain en développement	76
	Article 2 : Proteomes reveal amplification of a stress response in the Hard line	77
	Discussion - Perspectives	103
	Conclusion	112
	Annexes	114
	Annexe 1. Pina-D1 alleles in <i>T. aestivum</i> and <i>Ae. tauschii</i> (Bhave and Morris, 2008)	115
	Annexe 2. Pinb-D1 alleles in <i>T. aestivum</i> and <i>Ae. tauschii</i> (Bhave and Morris, 2008)	116
	Annexe 3. Pedigree du cultivar Falcon	118

Table des illustrations

Figure 1. Structure histologique du grain de blé à maturité.	18
Figure 2. Section transversale médiane du grain de blé à 7 JAA.	18
Tableau 1. Distribution histologique des principaux constituants du grain de blé.	20
Figure 3. Classification des prolamines du blé.	21
Figure 4. Structure des promoteurs des gènes de protéines de réserve des céréales.	22
Figure 5. Alvéogramme de Chopin pour les lignées quasi-isogéniques Falcon Hard et Soft.	23
Figure 6. Evolution de la dureté des blés cultivés français.	23
Figure 7. Valeur d'usage des farines de blé dans le monde selon la dureté et la teneur en protéines du grain.	24
Figure 8. Influence de la dureté du grain sur la taille des particules de farines et sur l'endommagement des granules d'amidon.	24
Figure 9. Albumens Falcon Soft (haut) et Falcon Hard (bas).	25
Figure 10. Représentation schématique du locus Ha sur les 3 chromosomes homéologues 5A, 5B et 5D du blé tendre <i>Triticum aestivum</i> .	28
Figure 11. Développement du grain de blé.	41
Figure 12. Représentation schématique de la séparation de macromolécules par AFFFF.	43
Figure 13. Répartition des marqueurs ISBP sur le locus Ha.	45
Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes et pseudo-gènes du locus Ha sur les lignées quasi-isogéniques Hard et Soft de Falcon.	46
Figure 14. Position des marqueurs utilisés pour déterminer la taille de la délétion sur Falcon Hard.	56
Figure 15. Dureté des LQI pour 3 années.	57
Figure 16. PMG (g) des LQI pour 3 années.	57
Figure 17. Analyse de variance des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* en fonction de la dureté du grain.	58
Figure 18. Analyse en composante principale (ACP) des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* pour les farines blanches de grains matures Falcon Hard (H) et Soft (S).	58
Figure 19. Analyse en composante principale (ACP) des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* pour les sons de grains matures Falcon Hard (H) et Soft (S).	59
Figure 20. Analyse de variance des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* en fonction des années.	59
Figure 21. Protéines (% MS)	60
Figure 22. Quantité de protéines (mg MS/grain)	60
Figure 23. Masse des polymères de prolamines	60
Figure 24. Quantité d'amidon (% MS)	61
Figure 25. Quantité d'amidon (mg MS/grain)	61
Figure 26. Pourcentage de volume occupé par les granules de type A.	61
Figure 27. Pourcentage de volume occupé par les granules de type B.	61
Figure 28. Pourcentage de volume occupé par les granules de type C.	61
Figure 29. Pourcentage de volume par classe de diamètre des granules d'amidon (récolte 2010)	62
Figure 30. Distribution du pourcentage de nombre de granules d'amidon par classe de taille.	62

Abréviations

AA	acide aminé
ACP	Analyse en Composante Principale
AFFFF	Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation
AG	albumines-globulines
AMP	amphiphiles
ASB14	amidosulfobetaine-14
BAC	chromosome artificiel bactérien
BC	back-cross
BiP	Binding Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CID	collision induced dissociation
CM	cysteine motif
°Cd	degree Celsius days
DArT	Diversity Arrays Technology
daa	days after anthesis
DTT	dithiothreitol
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
FPM	faible poids moléculaire
GH	grain hardness
GSP	Grain Softness Protein
Ha	locus Hardness
HMW	high molecular weight
HPM	haut poids moléculaire
IEF	isoélectrofocalisation
IPG	immobilized pH gradient
ISBP	Insertion Site-Based Polymorphism
JAA	jours après anthèse
L*, a*, b*	Espace des couleurs (luminance, axe vert-rouge, axe bleu-jaune)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
LMW	low molecular weight
LQI	Lignées quasi-isogéniques
LTP	Lipid Transfer Protein
MALS	Multi-Angular Light Scattering
MM	Masse moléculaire
Mn	masse moléculaire rapportée au nombre de polymères
MS	matière sèche
Mw	masse moléculaire des polymères
MWD	molecular weight distribution

Mw/Mn	indice de polydispersité
NA	non assigné
NILs	near-isogenic lines
NIRS	near-infrared reflectance spectrometry
ORF	cadre de lecture ouvert
PBS	tampon phosphate salin
PC	protein content
PCD	Programmed Cell Death
PDI	Protein Disulfide Isomerase
pl	Point isoélectrique
<i>Pina</i>	puroindoline-a gene
PINA	puroindoline-a protein
<i>Pinb</i>	puroindoline-b gene
PINB	puroindoline-b protein
PMG	poids de mille grains
PPDS	Plus petite différence significative
PSV	vacuoles de stockage des protéines
QTL	Quantitative Trait Loci
RE	reticulum endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SKCS	Single Kernel Characterization System
SPA	storage protein activator
TEM	Transmission Electron Microscopy
TRD	Tryptophan Rich Domain
UPR	Unfolded Protein Response
2-DE	two-dimensional electrophoresis

Problématique

Le blé constitue l'aliment de base de l'humanité depuis sa domestication dans le « croissant fertile » durant le néolithique. Depuis cette période, l'homme n'a cessé de sélectionner les espèces et variétés les plus productives et celles qui avaient des caractéristiques intéressantes, comme l'aptitude à la panification. Le blé est en effet la seule céréale donnant une farine panifiable grâce à la nature unique de ses protéines de réserve qui permettent la formation du réseau de gluten. Cette aptitude à la panification a également été associée à des variétés possédant des grains plus durs. La valeur d'utilisation des farines a donc été définie selon la nature plus ou moins tendre du grain de blé. Les travaux entrepris au cours des dernières décennies ont permis de montrer que la dureté du grain est largement corrélée à l'absence ou la modification de protéines particulières, les puroindolines. Leur importance technologique étant avérée, il restait à découvrir la fonction biologique de ces petites protéines spécifiquement exprimées dans le grain de certaines céréales.

Les travaux antérieurs menés sur des grains à maturité ont montré que les puroindolines étaient localisées sur les granules d'amidon, que la quantité de matériel adhérent aux granules était plus importante dans les génotypes Hard que Soft et que la cohésion matrice/amidon semblait plus étroite dans les génotypes Hard. En outre, les puroindolines présentaient des propriétés de liaison aux lipides. Sur la base de ces travaux, notre hypothèse initiale est que la fonctionnalité de ces protéines sur la texture de l'albumen est étroitement associée à la formation et aux réarrangements des structures lipidiques, comme les membranes endocellulaires, lors du développement du grain. Ces réarrangements peuvent induire des variations de la cohésion amidon-matrice protéique entre les grains Hard et les grains Soft. Cette cohésion détermine la dureté et après mouture la teneur en amidon endommagé des farines. L'amidon endommagé modifie la dynamique d'absorption d'eau dans les pâtes et oriente les farines soit vers l'industrie de la panification, soit vers celle de la biscuiterie. La stratégie pour valider cette hypothèse est d'étudier l'effet de l'absence d'une puroindoline à quatre stades de développement du grain : en fin de cellularisation de l'albumen, en phase d'accumulation rapide des réserves, en phase d'accumulation lente et à maturité avant dessiccation. Le matériel végétal choisi pour cette étude est une variété de blé pour laquelle nous disposons de deux lignées quasi-isogéniques différant essentiellement par leur dureté. Après une étude, en microscopie électronique à transmission, de l'ultrastructure de l'albumen aux quatre stades de développement des grains Hard et Soft visant à mettre en évidence d'éventuelles différences de structure au niveau cellulaire, nous étudierons la localisation cellulaire des puroindolines au cours du développement du grain par marquage immunocytochimique. En parallèle, sur ces mêmes lignées et stades de développement, nous comparerons les protéomes métaboliques et structuraux, afin de rechercher en quoi la physiologie du grain est modifiée en l'absence de la puroindoline-a. Le but de ce travail *in fine* est d'utiliser notre meilleure connaissance de la physiologie du grain pour améliorer la régularité de la qualité du grain de blé.

Bibliographie

1 Le blé

Le blé est la céréale la plus cultivée (200 million d'hectares en 2009, FAOSTAT 2009) et la deuxième plus consommée aujourd'hui dans le monde. Domesticqué au Proche-Orient à partir d'une graminée sauvage il y a environ 10.000 ans, il compte actuellement quelque 30.000 formes cultivées. La production mondiale, en progression constante, et les échanges qui se multiplient entre les régions du monde font de cette céréale l'un des principaux acteurs de l'économie mondiale et justifient les nombreux travaux qui lui sont consacrés. En France, le blé constitue la première culture avec 5 millions d'hectares et un rendement moyen de 71,3 q/ha, l'un des plus élevés au monde. Avec une production de 36 Mt/an la France est le cinquième producteur mondial (source <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>) et le second exportateur en 2010.

1.1 Classification botanique

Le blé est une monocotylédone, appartenant au genre *Triticum*, tribu des *Triticeae*, famille des *Poaceae*. Trois groupes de *Triticum* sont connus, répartis selon le nombre de leurs chromosomes:

- le groupe diploïde (2×7 chromosomes) comprend *Triticum monococcum* (en grain) et *T. spontaneum*, qui font partie des formes les plus anciennement cultivées, caractérisées par des épis grêles où les grains restent enveloppés par les glumelles ;
- le groupe tétraploïde (4×7 chromosomes) comprend *T. dicoccoides* (amidonnier sauvage), *T. dicoccum* (amidonnier), *T. turgidum* et *T. durum* (blé dur), à épis denses dont les grains riches en gluten servent à fabriquer les pâtes alimentaires ;
- le groupe hexaploïde (6×7 chromosomes), représenté par *T. vulgare*, ou *T. aestivum* (blé tendre) et *T. spelta* (épeautre), comprend la majorité des blés à épis assez larges et aux grains riches en amidon nécessaires à la fabrication du pain.

1.2 Phylogénie

Ces différentes espèces de blé ont été générées par des événements successifs de polyploïdisation intervenant après des croisements interspécifiques entre trois espèces ancestrales diploïdes. Le premier événement, impliquant *Triticum urartu* de génome AA et *Aegilops speltoides* de génome BB, a eu lieu il y a environ 500 000 ans et a conduit à l'apparition du blé dur tétraploïde AABB : *Triticum turgidum* (ou blé à pâtes). 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

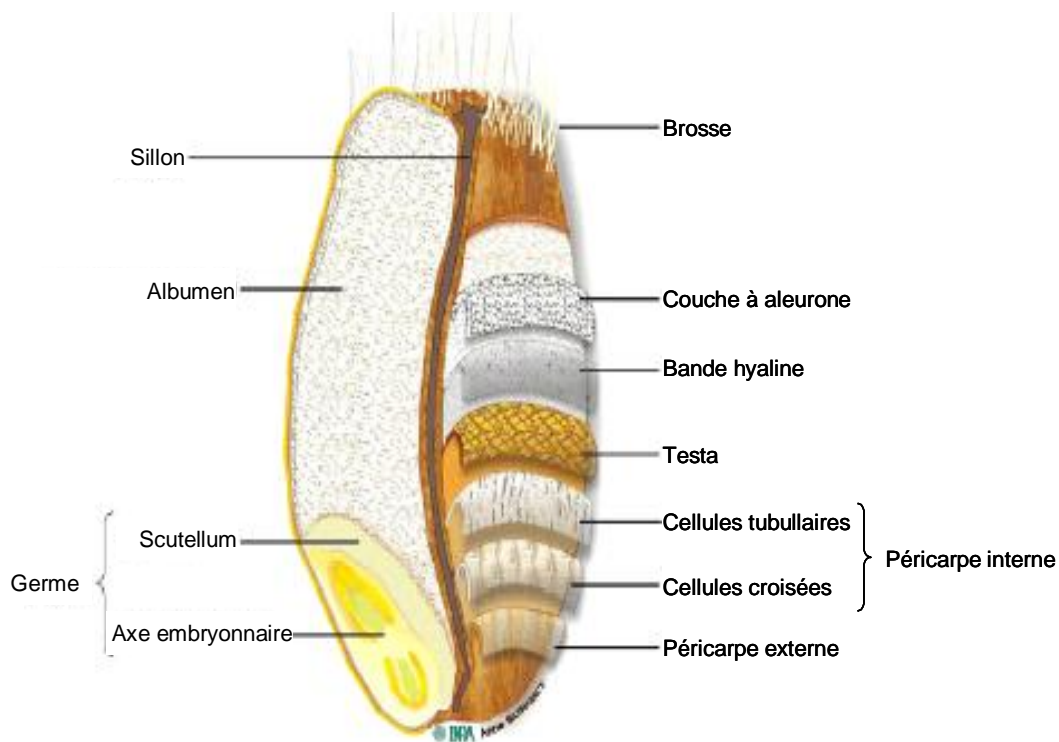


Figure 1. Structure histologique du grain de blé à maturité.
(Surget and Barron, 2005)

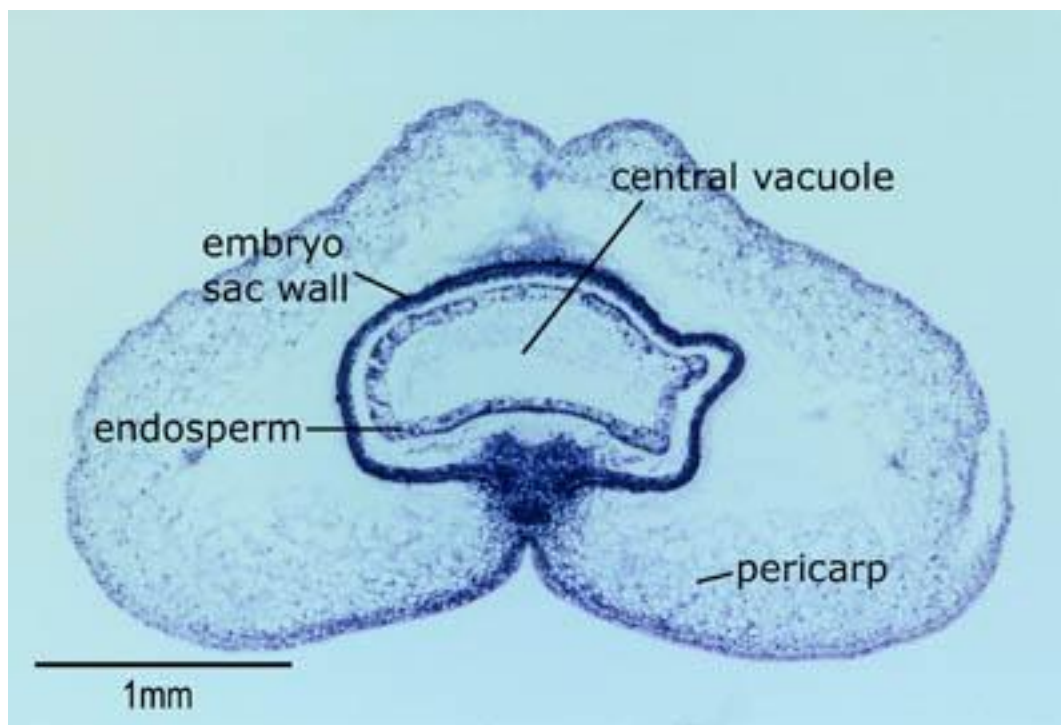


Figure 2. Section transversale médiane du grain de blé à 7 JAA.
Le premier anneau d'albumen syncitial est formé (endosperm). Le centre de l'albumen sera structuré de façon centripète. Source : <http://wheatbp.net>.

autre blé diploïde de génome DD (*Aegilops tauschii*) et a donné *Triticum aestivum*, le blé tendre panifiable actuel (ou blé à pain), possédant un génome hexaploïde AABBDD.

2 Structure, développement et composition du grain

2.1 Structure histologique

Le grain de blé à maturité est formé de trois compartiments (Figure 1):

- Les enveloppes, composées de cinq tissus différents : le péricarpe externe, le péricarpe interne formé par la couche de cellules tubulaires et la couche de cellules croisées, la testa ou tégument séminal et la bande hyaline ou épiderme du nucelle.
- L'albumen, constitué de la couche à aleurone et de l'albumen amylicé. La couche à aleurone est le seul tissu restant vivant lorsque le grain a atteint sa maturité. Lors du broyage, ce tissu reste accroché au péricarpe et ne se retrouve donc pas dans la farine. L'albumen amylicé est constitué de cellules riches en granules d'amidon, englobés dans une matrice protéique.
- Le germe, composé de l'embryon et du scutellum ou cotylédon.

2.2 Développement

Du fait du caractère cléistogame de la fleur, le blé est autogame : il se reproduit essentiellement par autofécondation. La double fécondation caractéristique des angiospermes a lieu dans l'ovaire : le grain de pollen contient deux noyaux, l'un féconde l'oosphère induisant la formation de l'embryon, l'autre fusionne avec les noyaux polaires du sac embryonnaire pour former l'albumen, tissu triploïde dans lequel s'accumulent les réserves nécessaires à l'embryon. Après fécondation, l'ovaire se développe rapidement, multipliant sa taille par trois dans les quatre premiers jours. Cette croissance est due à l'expansion des cellules, plutôt qu'à leur multiplication, dans les couches cellulaires qui contiennent le sac embryonnaire. Celui-ci est constitué d'une large vacuole entourée de tissu coenocytique, formé par la division synchrone des noyaux pendant les 3 à 4 premiers jours du développement. La durée de cette phase détermine le nombre final de cellules de l'albumen et à terme le poids final du grain (Brocklehurst, 1977). Entre 4 et 10 jours après anthèse (JAA), les noyaux continuent à se diviser rapidement, migrent vers le nucelle et les parois cellulaires commencent à apparaître. Le premier anneau complet d'albumen syncitial est formé 7 jours après anthèse (Figure 2) et l'albumen continue à se cellulariser de façon centripète (<http://www.wheatbp.net/>). La période de remplissage du grain s'étend de 11 à 30 jours après anthèse pendant lesquels il y a accumulation d'amidon et de protéines dans les cellules de l'albumen amylicé, puis le grain entre en phase de dessiccation. Au cours du développement du grain, le péricarpe maternel (paroi de l'ovaire) et le

tégument de la graine (paroi de l'ovule) se dessèchent et forment des enveloppes soudées entre elles. Le grain étant alors à la fois le fruit et la graine, il est appelé caryopse.

2.2.1 Formation des granules d'amidon

Des proplastes existent dans le cytoplasme de l'albumen coenocytique dès le deuxième jour après anthèse. Ils se différencient en amyloplastes, qui ne se développent que dans l'albumen amylicé, dans lesquels les granules d'amidon apparaissent dès le quatrième jour après anthèse (Bechtel et al., 1990). Ces granules initiés précocement grossissent rapidement jusqu' à atteindre un diamètre de 25- 50 μm . Ces premiers granules, de forme lenticulaire, sont appelés granules de type A. Leur nombre final est fixé 4 jours après l'initiation. Les enzymes ramifiantes de biosynthèse de l'amidon sont préférentiellement associées aux granules de type A, ce qui leur permet de grossir rapidement (Peng et al., 2000). Les granules de type B, plus petits et sphériques, sont initiés 10 à 12 jours après anthèse. Ils proviennent de protubérances des amyloplastes contenant les granules de type A (Langeveld et al., 2000). Ces granules de type B atteignent 10 μm à maturité. Leur nombre final dépend des conditions environnementales durant le développement du grain. Ils contiennent plus de lipides et ont une plus forte capacité d'absorption de l'eau qui serait due à la présence d'une plus importante zone amorphe accessible à l'eau. Un troisième groupe de granules de petite taille (type C) apparaît 21 jours après anthèse (Bechtel et al., 1990). A maturité, trois groupes de granules d'amidon sont présents : le type A dont le diamètre est supérieur à 15 μm , le type B dont le diamètre est compris entre 5 et 15 μm et le type C dont le diamètre est inférieur à 5 μm . Chaque type aurait une composition chimique et des propriétés fonctionnelles différentes (Lindeboom et al., 2004).

2.2.2 Formation des corps protéiques

A maturité, les grains d'amidon sont enchâssés dans une matrice protéique constituée par les protéines de réserve, gliadines et gluténines regroupées sous le terme de prolamines. Celles-ci sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et accumulées dans des petits corpuscules entourés d'une membrane (Bechtel et al., 1982a). Ces corps protéiques de quelques microns sont initiés 6 à 7 jours après anthèse et grossissent par fusion entre eux jusqu' à 35 JAA. Puis la membrane se rompt et libère les protéines qui constituent alors une matrice autour des grains d'amidon (Bechtel et al., 1982b; Dubreil et al., 1998a).

Le routage des protéines de réserve du blé n'est pas totalement clair. Certains auteurs pensent qu'il passe par l'appareil de Golgi, au moins dans les premières phases du développement du grain (Bechtel et al., 1982a; Kim et al., 1988). Loussert et al. (2008) mettent en évidence la présence de gliadines et de gluténines de haut et faible poids moléculaires dans des vésicules golgiennes, 11 jours

	% grain	% péricarpe	% aleurone	% albumen	% germe
Amidon	69	0	0	82	0
Protéines	13.7	10	30	12	31
Lipides	2.7	0	9	2	12
Sucres réducteurs	2.4	0	0	1.8	30
Pentosanes	7.4	43	46	1.6	7
Cellulose	2.8	40	3	0.1	2
Minéraux	1.9	7	12	0.5	6

**Tableau 1. Distribution histologique des principaux constituants du grain de blé.
(Feillet, 2000)**

après anthèse, par immunocytochimie et observation en microscopie électronique à transmission. A l'inverse, Levanony et al. (1992) observent peu de Golgi dans l'albumen du blé en développement. Un marquage immunocytochimique dirigé contre la protéine chaperone BiP (Binding Protein), résidente dans le RE, montre qu'on la retrouve dans les vacuoles et les corps protéiques. Le même routage a été mis en évidence avec les mêmes techniques pour la PDI (Protein Disulfide Isomerase), enzyme résidente dans le RE permettant la formation des ponts disulfures intra- et intermoléculaires lors de la formation des protéines de réserve (Shimoni et al., 1995). Pour ces auteurs, cela confirme que les corps protéiques sont formés dans le RE et transportés dans des vacuoles, et que le Golgi n'est pas impliqué dans leur transport. Chez d'autres espèces également, il semble qu'il existe une voie de routage directe entre le RE et la vacuole contenant le corps protéique. C'est le cas pour *Arabidopsis thaliana* (Oufattole et al., 2005), le riz (Takahashi et al., 2005) ou le potiron (Hara-Nishimura et al., 1998). Cette voie peut concerner à la fois les protéines de réserve (cas du riz et du potiron) et des protéines chaperones ou de membrane (*A. thaliana*). Le cas du riz est particulier car, à la différence des autres plantes qui accumulent une classe majeure de protéines de réserve, il synthétise en quantités équimolaires des prolamines (protéines de réserve typiques des céréales) et des glutélines (homologues des 11S globulines des légumineuses). Ces deux types de protéines sont accumulées dans des zones distinctes de RE et leur routage diffère : les prolamines sont transportées directement vers les vacuoles de stockage des protéines (PSV) par des vésicules bourgeonnant du RE, tandis que les glutélines passent par le Golgi avant d'être déposées dans des corps protéiques de forme irrégulière (Crofts et al., 2004).

2.3 Composition biochimique

Le grain de blé est principalement constitué d'amidon (environ 70% de la matière sèche (MS)), de protéines (10 à 18% MS selon les variétés et les conditions de culture) et de pentosanes (7 à 10% MS). Les autres constituants, pondéralement mineurs, sont les lipides, la cellulose, les sucres libres, les minéraux et vitamines (Feillet, 2000). Ces constituants se répartissent de manière inégale au sein des différentes fractions histologiques du grain. L'albumen amylicé contient la totalité de l'amidon. La couche à aleurone est particulièrement riche en protéines, en matières minérales et en pentosanes, qui sont les constituants dominants de ses parois cellulaires. Le péricarpe est essentiellement constitué de ces pentosanes et de cellulose. Le germe est riche en protéines, en lipides et en sucres libres (Tableau 1).

2.3.1 L'amidon

L'amidon est constitué d'amylose et d'amylopectine dans des proportions variables selon les céréales. Dans le grain de blé, l'amylose constitue 28% de l'amidon et est essentiellement présent

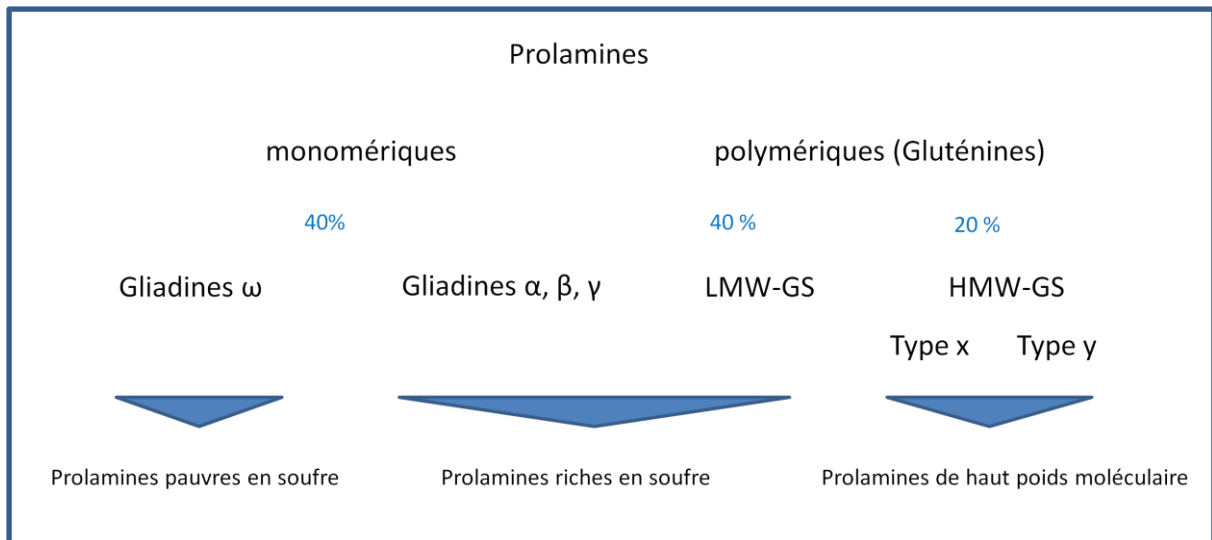


Figure 3. Classification des prolamines du blé.

LMW-GS : sous-unités gluténines de faible poids moléculaire, HMW-GS : sous-unités gluténines de haut poids moléculaire.

sous forme de chaînes linéaires d'unités de α -D-glucopyranosyl liées en 1-4. Mais il est établi aujourd'hui que certaines de ces molécules forment quelques branchements liés en 1-6 (Buléon et al., 1998). L'amylopectine représente 72% de l'amidon du blé. C'est un polysaccharide composé de nombreuses chaînes de 1-4 α -glucan reliées entre elles en 1-6 et formant l'une des plus grosses molécules ($M_w : 10^7 - 10^8$). L'amylopectine est synthétisée à partir de 3 types de chaînes : les chaînes courtes avec un degré de polymérisation (DP) moyen compris entre 14 et 18, les chaînes longues avec un DP moyen de 45-55 et quelques chaînes de DP supérieur à 60. Le granule d'amidon présente un aspect semi-cristallin dû à la conformation moléculaire de l'amylopectine.

2.3.2 Les protéines de réserve

Les protéines de réserve du grain de blé, appelées prolamines en raison de leur richesse en résidus proline et glutamine, sont à la base de la formation d'un réseau viscoélastique (gluten) lors du pétrissage de la pâte et donc de l'aptitude à la panification du blé.

Les prolamines ne sont présentes que chez les céréales, alors que les principales protéines de réserve des autres plantes à fleurs sont les 2S albumines et les globulines. Les prolamines représentent 80 % des protéines de la farine du blé. Elles sont constituées de protéines monomériques, les gliadines (40% des prolamines), et de protéines polymériques, les gluténines, elles-mêmes formant 2 sous-groupes : les sous-unités de faible poids moléculaire (FPM ou LMW : 40% des prolamines) et celles de haut poids moléculaire (HPM ou HMW : 20% des prolamines). Les prolamines sont aussi classées en trois groupes selon leur séquence en acides aminés (AA) : les prolamines pauvres en soufre, les prolamines riches en soufre et les prolamines de haut poids moléculaire (Figure 3).

Les gliadines sont de quatre types, α , β , γ , ω , ainsi dénommées d'après leur mobilité électrophorétique (Woychik et al., 1961). Elles diffèrent par le nombre de motifs Cystéine (CM) de leur structure primaire. Les gliadines α et β ont, pour la plupart, un domaine C-terminal non répété contenant 6 CM et un domaine N-terminal répété (Köhler et al., 1993; Shewry and Tatham, 1997). En général, les cystéines de la partie C-terminale sont en liaisons intramoléculaires, donnant sa conformation à la protéine. Les gliadines γ ont un domaine C-terminal non répété contenant 8 CM avec dans certains cas une cystéine de plus ou de moins (7 ou 9 CM). Les gliadines ω ne possèdent pas de motif cystéine. Les gliadines, du fait de leurs interactions essentiellement non-covalentes, sont impliquées dans la viscosité du gluten.

Les gluténines de faible poids moléculaire sont constituées de plusieurs sous-groupes basés sur leur mobilité électrophorétique après réduction. Les plus nombreuses ont une composition en AA proche des gliadines à 6 CM, riches en soufre. Ces protéines sont présentes sous forme de polymères et peuvent contenir 1 ou 2 cystéines supplémentaires impliquées dans des liaisons intermoléculaires.

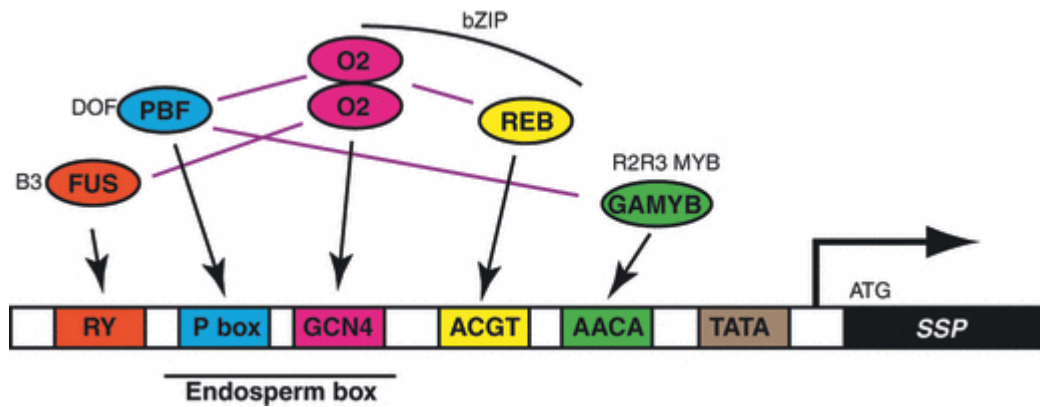


Figure 4. Structure des promoteurs des gènes de protéines de réserve des céréales. (Kawakatsu and Takaiwa, 2010). Cis-séquences régulatrices : RY, P box (motif E), GCN4 (motif N), ACGT, AACA, TATA. FUS, PBF, O2, REB, GAMYB sont des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes de protéines de réserve du grain (SSP).

On trouve aussi parmi les gluténines FPM des 'gliadins-like glutenins' présentant généralement un nombre impair de cystéines.

Les gluténines de haut poids moléculaire sont formées de 6 sous-unités, assemblées en polymères, correspondant aux produits des loci Glu-A1 α et γ , Glu-B1 α et γ , Glu-D1 α et γ . La structure de base de la sous-unité comprend 3 domaines : le domaine N-terminal, non répété, constitué de 81 à 104 AA, le domaine central répété constitué de 481 à 681 résidus et le domaine C-terminal constitué de 42 AA. Les sous-unités HPM α contiennent 4 cystéines conservées (3 en partie N-terminale et 1 en partie C-terminale) et une cystéine variable dans la partie N-terminale du domaine conservé. Les sous-unités HPM γ contiennent 6 cystéines en liaison intramoléculaire (5 en partie N-terminale et 1 en partie C-terminale) et deux cystéines variables supplémentaires dans le domaine central pouvant être engagées dans les liaisons intermoléculaires. Les gluténines de haut poids moléculaire, dont le niveau d'expression est bien supérieur à ceux des autres prolamines, ont un rôle prépondérant dans l'élasticité du gluten. Les propriétés viscoélastiques du réseau sont très liées, d'une part, à la nature des différents allèles des protéines de réserve (Wrigley et al., 2006), et d'autre part, à leur polymérisation (Lemelin et al., 2005). Dès 7 JAA, les gluténines apparaissent dans l'albumen et leur polymérisation commence mais la modification de la distribution de la taille des polymères (estimée par le critère d'extractibilité au SDS) n'intervient qu'à la fin du développement du grain (Gupta et al., 1996). Carceller et Aussenac (1999) ont montré que la taille moyenne des polymères de protéines augmentait entre 30 et 45 JAA dans les conditions naturelles, mais que si on appliquait une dessiccation précoce (pendant la phase d'accumulation), on observait simultanément la formation de polymères insolubles au SDS. La diminution rapide et concomitante de la masse des polymères solubles au SDS et des monomères (gliadines) mettait, de plus, en évidence l'existence probable d'un mécanisme d'agrégation dans la formation des polymères. Un stress hydrique après anthèse provoque de même une insolubilisation précoce des polymères (Daniel and Triboï, 2002) confirmant que la polymérisation/agrégation des protéines de réserve est liée à la déshydratation du grain. Le degré de polymérisation serait également lié au statut redox de l'albumen par l'intermédiaire du statut redox du glutathion (Rhazi et al., 2003).

Les gènes codant pour les prolamines appartiennent à des familles multigéniques portés par les groupes d'homéologie 1 et 6. Ils ont la particularité de ne contenir aucun intron.

Les promoteurs des gènes de protéines de réserve des céréales contiennent plusieurs *cis*-séquences régulatrices (Figure 4). L'"endosperm box" contient deux éléments indépendants très conservés, la 'Prolamine box' (ou motif E pour endosperm) et le motif N (GCN4), nécessaires pour l'expression spécifique dans la graine. Le motif N est impliqué dans la régulation de l'expression génique selon la disponibilité en azote. D'autres motifs (TATA, AACA, ACGT, RY) ont été identifiés par alignement des séquences de promoteurs mais leur ordre n'est pas toujours conservé selon les céréales. Des

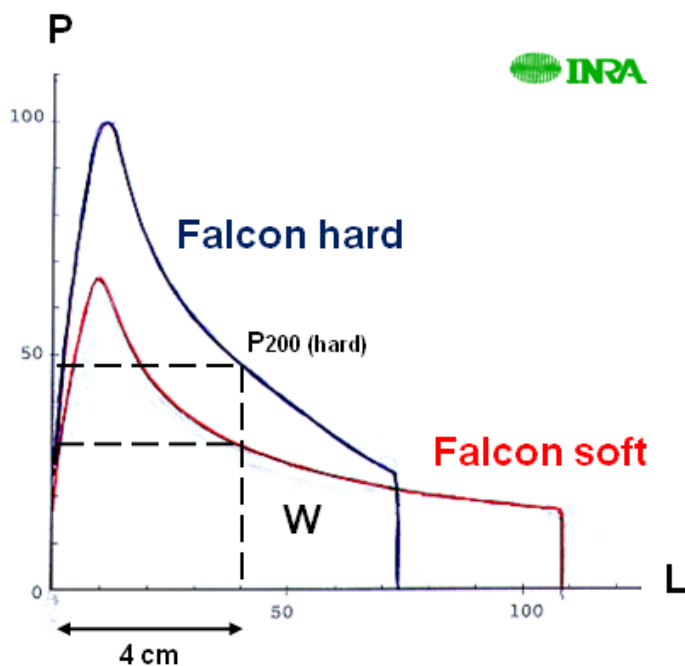


Figure 5. Alvéogramme de Chopin pour les lignées quasi-isogéniques Falcon Hard et Soft. W : force boulangère (surface délimitée par la courbe de l'alvéogramme), P : ténacité, L : extensibilité. L'indice d'élasticité est calculé par le rapport $(P200/P) \times 100$, où P200 est la pression à 4 cm du début de la courbe. Source : G. Branlard, communication personnelle.

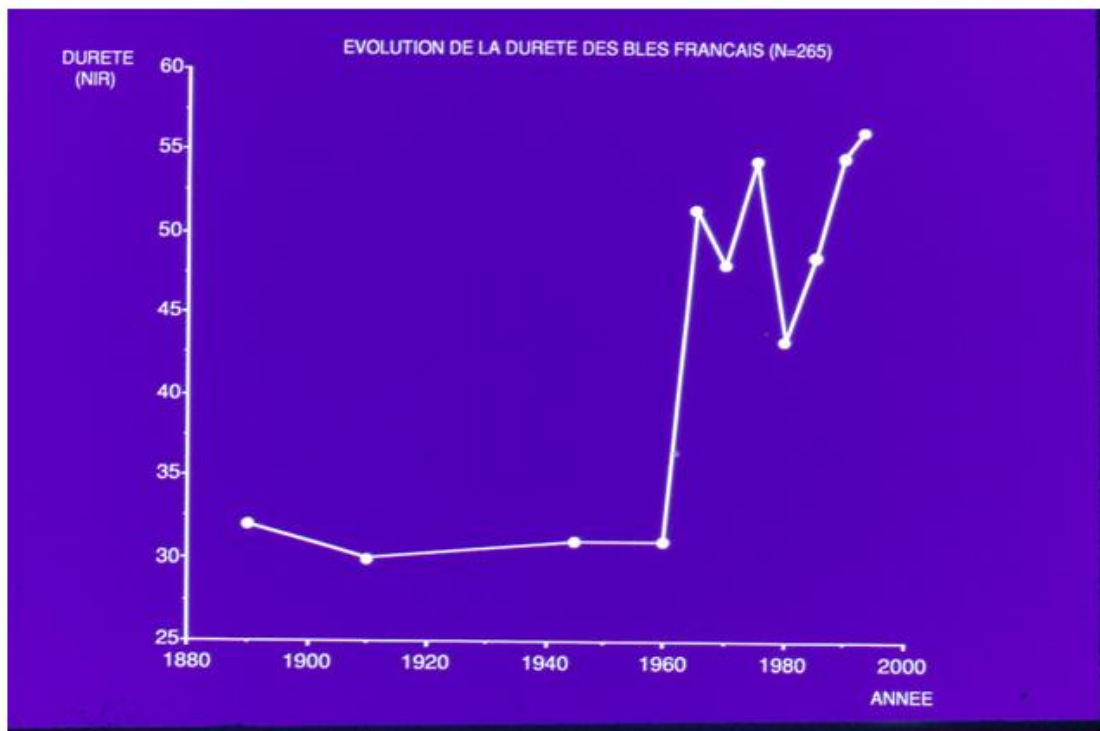


Figure 6. Evolution de la dureté des blés cultivés français. (Branlard et al., 1997)

éléments *trans* (facteurs de transcription FUS, PBF, O2, REB, GAMYB), en venant se fixer à ces différents motifs et en interagissant entre eux, régulent l'expression des gènes de prolamines (Kawakatsu and Takaiwa, 2010). La transcription commence à 6 JAA pour les gènes de gliadines et de gluténines de faible poids moléculaire et à 7 JAA pour les gluténines de haut poids moléculaire (Shewry et al., 2009).

3 La qualité du grain de blé

La qualité du grain de blé recouvre un grand nombre de critères, qui, de plus, varient selon les pays en fonction de l'attente des marchés (Gatel et al., 1999). La classification française repose sur les critères suivants :

- Le premier critère, en amont même de la qualité, est la disponibilité du produit. La France a connu une progression très forte des rendements depuis l'après-guerre, passant de 1 à 7 t/ha.
- Les critères physiques : le poids spécifique (poids d'un hectolitre de grains) et la teneur en eau qui doit être inférieure à 16%.
- Les critères technologiques : le plus important de ces critères est la teneur en protéines, qui est corrélée à l'aptitude à la panification. Cette aptitude est évaluée par des tests rhéologiques comme l'alvéographe de Chopin, qui donne une valeur de la force boulangère du blé (W) liée à l'élasticité fournie par les gluténines (Figure 5). L'indice de Hagberg détermine l'activité amylasique, qui est élevée en présence de grains germés et préjudiciable à la panification. La teneur en arabinoxylanes (pentosanes) hydrosolubles est approchée par un test de viscosimétrie. Cette viscosité est évaluée pour déterminer l'aptitude à l'utilisation pour l'alimentation des volailles. Dans la production française, la dureté du grain est un critère pris en compte dans l'appréciation de la qualité technologique des blés hexaploïdes. Les sélectionneurs cherchent en effet à ce que la production se situe pour l'essentiel dans la gamme des blés medium-hard, généralement bien adaptée à la qualité boulangère des farines depuis les années 1960 (Figure 6).
- La qualité sanitaire : il est important d'avoir des blés exempts de résidus de pesticides et de contaminations par des mycotoxines ou des métaux lourds.

Les Etats-Unis et le Canada ont une classification basée sur 3 critères : la dureté, la couleur du grain et le type de blé, printemps ou hiver. La Grande-Bretagne et l'Allemagne ont basé leur classification sur le critère variétal, rassemblant les variétés dans 4 ou 5 groupes selon leurs aptitudes technologiques. L'Australie, quant à elle, a adopté une segmentation en 7 classes selon la dureté et la teneur en protéines. A la suite de Moss (1973), les Anglo-saxons ont défini que la dureté, la teneur et

Grain protein and hardness requirements for major end-uses of wheat (WQOG, 1995)

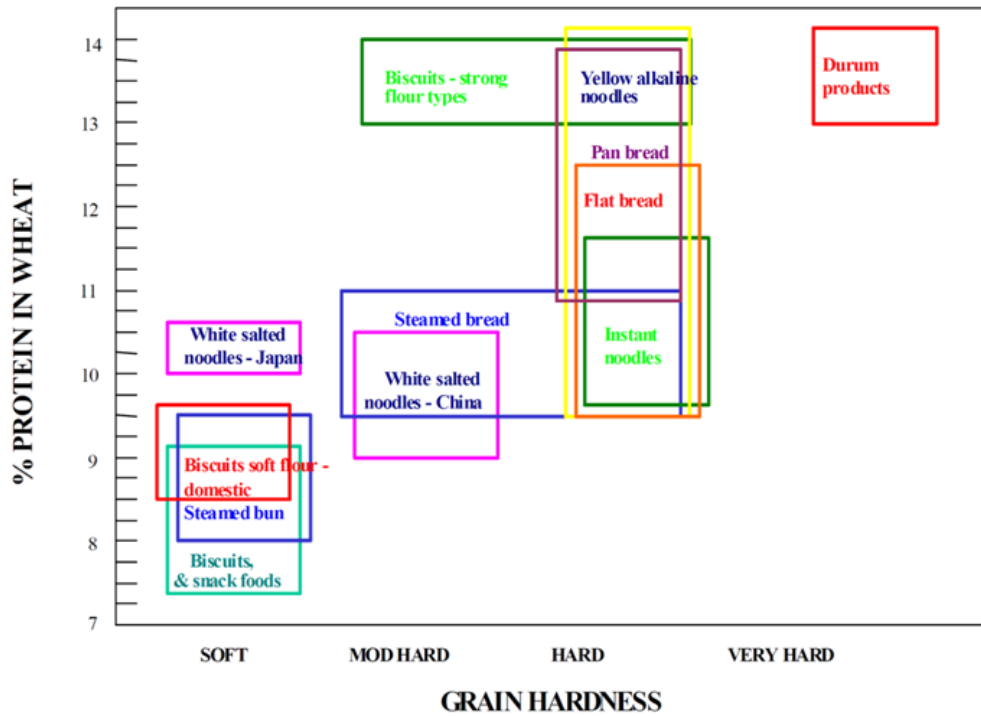


Figure 7. Valeur d'usage des farines de blé dans le monde selon la dureté et la teneur en protéines du grain.

Source : http://aciarc.gov.au/system/files/node/3875/Session%20VII-Wheat_Quality.pdf

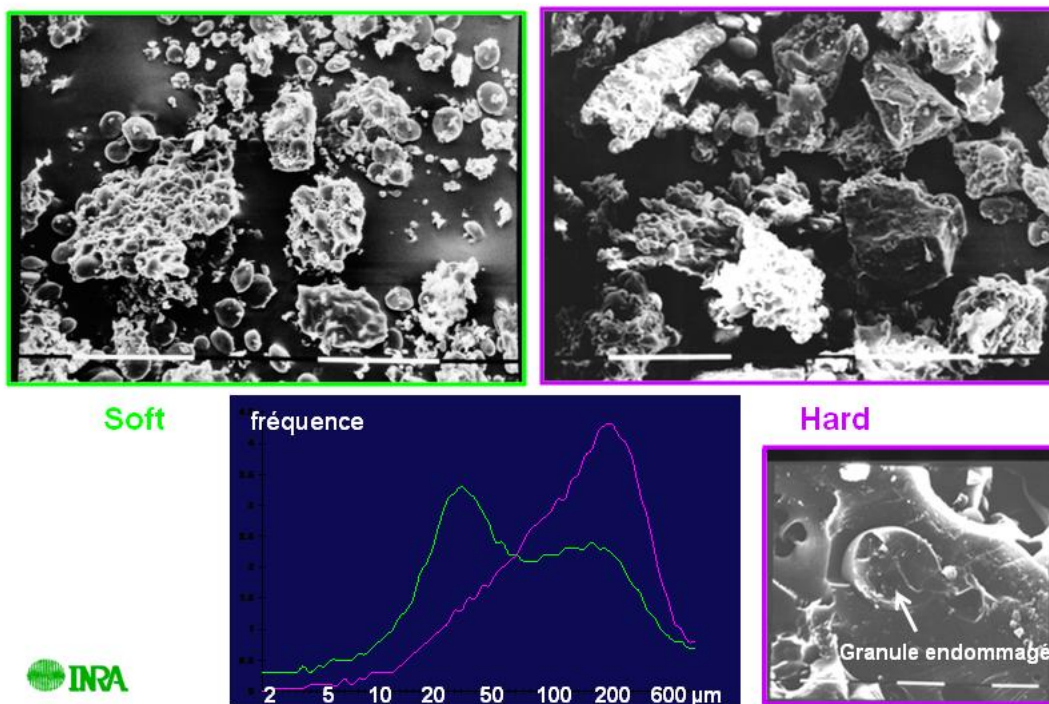


Figure 8. Influence de la dureté du grain sur la taille des particules de farines et sur l'endommagement des granules d'amidon.

Source : G. Branlard, communication personnelle

la qualité des protéines du grain étaient les critères essentiels gouvernant les usages de la farine de blé dans les différentes parties du monde (Figure 7).

4 La dureté du grain

Nous considérons ici la dureté variable du grain de blé tendre hexaploïde, *Triticum aestivum*, sans référence au grain de l'espèce de blé dur tétraploïde, *Triticum durum*. Pour éviter toute ambiguïté, nous utiliserons les termes anglais Hard et Soft pour exprimer cette dureté variable du grain de blé tendre.

La dureté est une caractéristique du grain définie comme sa résistance à la déformation. Elle peut être mesurée par de nombreuses méthodes et notamment le broyage d'un seul grain (SKCS : Single Kernel Characterization System) ou la NIRS (Near Infra-Red Spectroscopy) sur une mouture. Les différentes classes de dureté s'expriment par un indice sur une échelle continue graduée de 0 à 100. Conventionnellement, l'indice 25 correspond à la valeur moyenne des blés de type Soft et 75 à celle des blés de type Hard. La dureté est un caractère quantitatif, essentiellement d'origine variétale, mais pouvant également varier en fonction des conditions de culture. Son importance dans la valeur d'usage de la farine tient au fait que, d'une part, la distribution des tailles des particules de farine n'est pas la même entre un blé Hard et un blé Soft (Figure 8) ce qui modifie la rhéologie de la pâte et que, d'autre part, les granules d'amidon d'un grain Hard sont plus endommagés que ceux du grain Soft lors de la mouture, ce qui modifie la dynamique d'absorption de l'eau dans les pâtes et facilite la fermentation. Les farines issues de blés Hard ont, en partie pour cela, une meilleure aptitude à la panification, tandis que les blés Soft sont mieux adaptés à la biscuiterie.

4.1 Différences de structure entre blés Hard et Soft

Macroscopiquement, la couleur des grains Hard et Soft à maturité est légèrement différente, les grains Hard ayant un aspect un peu plus translucide que les Soft. Après mouture, la farine des grains Soft est plus collante. Pour un même poids de grains, elle occupe un plus grand volume ce qui indique une probable répulsion électrostatique entre les particules de farine.

Des coupes des deux types de grain observées en microscopie optique ne révèlent pas de différences de structure. En revanche, en microscopie électronique à balayage, la cohésion amidon-matrice protéique semble différente (Turnbull and Rahman, 2002). Des albumens de grains Hard et Soft ont été examinés en microscopie électronique environnementale (B. Martinie, G. Branlard, communication personnelle). Les granules d'amidon semblent enchâssés plus fermement dans la matrice protéique de l'échantillon Hard que dans l'échantillon Soft (Figure 9). Cependant, des travaux

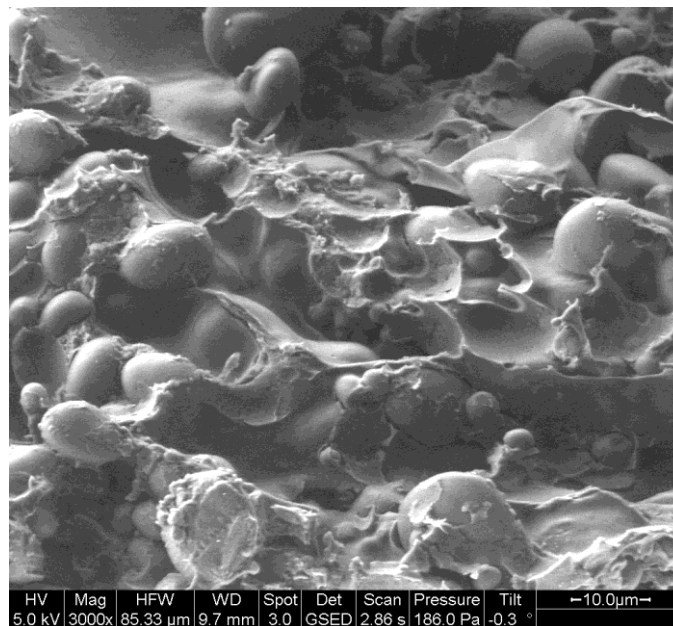
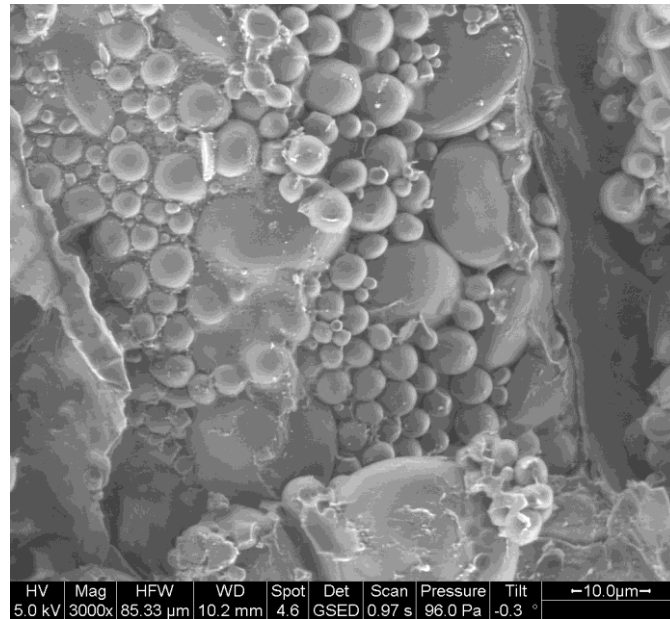


Figure 9. Albumens Falcon Soft (haut) et Falcon Hard (bas).
La matrice protéique Hard semble adhérer plus fermement aux granules d'amidon que la matrice Soft. (Photos INRA, Brigitte Martinie)

réalisés sur des grains en développement de lignées quasi-isogéniques pour la dureté ont montré que les différences Hard-Soft étaient visibles dès 5 jours après anthèse (Turnbull et al., 2003), alors qu'à ces stades précoces la matrice protéique n'existe pas, les protéines de réserve commençant tout juste à être synthétisées. Les différences n'étaient visibles que lorsque les grains étaient séchés à l'air et non lyophilisés, ce qui montre que d'autres facteurs que la cohésion amidon-matrice interviennent.

D'autres travaux ont essayé de mettre en relation la texture de l'albumen et la taille des granules d'amidon à maturité. Les méthodes utilisant la microscopie optique, bien que peu sensibles, mettaient en évidence une distribution bimodale (Glenn et al., 1992) ou trimodale (Bechtel et al., 1993) de la taille des granules d'amidon et plus de petits granules dans les albumens Hard que dans les Soft. Gaines et al. (2000) ont montré sur 12 variétés Soft que plus la texture est Soft, plus les granules sont gros. Mais la taille des granules et la dureté dépendent également des conditions environnementales (Panozzo and Eagles, 1998). En effet, des températures élevées appliquées dans les premiers 14 jours après anthèse induisent une plus grande proportion de gros granules de type A, tandis que la dureté est renforcée quand ces températures élevées sont appliquées après 14 JAA. Cet effet est plus marqué sur les cultivars Soft que sur les Hard.

4.2 Facteurs génétiques

Symes (1965) a montré que la dureté était un caractère héritable simple et il a produit à la suite de cette observation des lignées quasi-isogéniques Hard et Soft à partir des cultivars Falcon et Heron. Law et al. ont découvert, dès 1978, grâce à des lignées de substitution chromosomique, que ce caractère était codé par le bras court du chromosome 5D (Law et al., 1978). Ce locus a été appelé *Ha* pour hardness, la tendreté étant le caractère dominant. Ce locus est localisé à l'extrémité distale du chromosome 5DS et explique 63 % de la variabilité phénotypique, mais d'autres loci mineurs ont été mis en évidence sur les groupes d'homéologie 2, 5, 6 et 7 (Sourdille et al., 1996). Une étude d'Osborne et al. (2001) montre une association significative de la dureté avec le groupe 4 pour deux populations de cartographie sur les quatre étudiées.

Récemment, il a été montré par génétique d'association une corrélation entre le polymorphisme des gènes du facteur de transcription *Spa* (localisé sur le groupe d'homéologie 1) et la viscoélasticité de la pâte, association expliquée par la dureté (Ravel et al., 2009).

Les facteurs génétiques sont développés plus en détail dans le chapitre consacré aux facteurs génomiques (cf § 4.4)

4.3 Facteurs biochimiques

4.3.1 Friabiline/puroindolines

Barlow et al. (1973) ont montré par des observations microscopiques que la quantité de matériel adhérent aux granules d'amidon, préparés par sédimentation sur solvant, était plus importante dans les grains Hard que dans les grains Soft, ce qui a commencé à faire émerger l'idée de l'existence putative d'une protéine modifiant l'adhésion matrice-granule. Ils ont également montré que les protéines hydrosolubles abondantes à la surface de l'amidon constituaient un groupe électrophorétique complexe. A la suite de cette observation, Greenwell et Schofield (1986) ont révélé, par SDS-PAGE, la présence d'une bande protéique de 15 kDa spécifique des cultivars Soft. Cette bande étant complètement absente dans l'échantillon de blé dur (ne contenant pas le génome D), ils attribuent la protéine au gène majeur contrôlant la texture du grain localisé par Law et al. (1978) sur le bras court du chromosome 5D. En 1988, Spencer nomme cette protéine « friabilin » (Spencer, 1988) en raison du caractère friable du grain Soft, dans lequel cette protéine est abondante. Ce marqueur de la texture de l'albumen a été étudié par Jolly et al. (1993) à partir de farines et non de granules. Ils montrent que cette bande contient plusieurs polypeptides dont ils séquencent l'extrémité N-terminale. A la différence de ce qui avait été montré précédemment à partir des protéines extraites de granules, ils mettent en évidence la présence de ces protéines à la fois dans les farines Hard et Soft et une corrélation positive entre la quantité de protéines et la tendreté du grain. Cet article est le premier à supposer que les friabilines sont majoritairement associées au gluten et qu'elles sont le produit du locus *Ha*, qui doit contenir plusieurs gènes. La même année, à la recherche de protéines à activités antimicrobiennes, Blochet et al. (1993) publient la séquence d'une protéine extraite d'albumen de blé par une méthode permettant d'isoler des protéines liées aux lipides membranaires. Cette protéine est nommée puroindoline en raison de sa présence dans le blé (puros en grec) et de son domaine riche en tryptophane, acide aminé à noyau indole. Dès 1994, le même groupe fait la relation entre puroindoline et friabiline (Gautier et al., 1994) et caractérise deux puroindolines (cf § 5).

4.3.2 Autres facteurs intervenant sur la dureté

- Les pentosanes : ce sont des polymères de xylose et d'arabinose, entrant dans la composition des parois cellulaires du grain de blé. Ils ont la capacité d'absorber 6 à 10 fois leur poids en eau, ce qui leur confère un intérêt rhéologique dans la pâte. En général, la dureté du blé est corrélée avec une teneur élevée en pentosanes (Hong et al., 1989). Mais les auteurs suggèrent que la nature des pentosanes a plus d'influence sur la dureté que la quantité. Dans l'étude de Bettge et Morris (2000), la quantité de pentosanes semble avoir plus d'effet sur la variation de dureté à

l'intérieur du groupe d'échantillons Soft que sur le groupe Hard. Selon Barron et al. (2005), il est possible de distinguer les variétés Hard des Soft par la signature des polysaccharides des couches périphériques du grain, mais non du grain entier. Les variétés Soft sont caractérisées par une plus grande quantité d'arabinoxylanes solubles dans ces couches périphériques.

- La teneur en lipides : les lipides sont des composants de toutes les membranes cellulaires. Certains sont également présents à la surface et à l'intérieur des granules d'amidon. La relation entre lipides libres et dureté semble exister mais elle n'est pas claire. Morrison et al. (1989) montrent une corrélation négative entre dureté et quantité de lipides polaires libres, tandis que Panozzo et al. (1993) trouvent que les cultivars Hard ont des teneurs plus élevées en lipides libres que les Soft. Plus précisément, Konopka et al. (2005) mettent en évidence une corrélation positive entre dureté et quantité de glycolipides libres, et une corrélation négative entre dureté et quantité de lipides de surface de l'amidon, en particulier avec leur fraction non polaire. Finnie et al. (2010) ont montré sur des lignées quasi-isogéniques que la dureté a une influence significative sur la composition en lipides polaires présents à la surface des granules d'amidon. De plus, leur quantité est fortement diminuée dans les lignées quasi-isogéniques avec *Pinb* muté et *Pina* sauvage.
- L'environnement : pour un même génotype, la dureté varie en fonction des conditions environnementales (Gibson et al., 1998). Elle augmente si des températures élevées sont appliquées au cours du remplissage du grain.

4.4 Facteurs génomiques

Si les bases biochimiques de la texture de l'albumen commençaient à être comprises au milieu des années 1990, cela n'était pas du tout le cas des bases moléculaires. Le locus *Ha* avait été localisé sur le chromosome 5DS du blé hexaploïde (cf § 4.2), mais le nombre de gènes présents à ce locus était inconnu, de même que l'origine des différences de dureté entre les blés diploïdes, tétraploïdes et hexaploïdes. Gautier et al. (1994) ont isolé et caractérisé deux clones cDNA de *Triticum aestivum* codant pour deux puroindolines, nommées a et b, présentant 55% de similarité. La longueur des séquences nucléotidiques des clones étaient de l'ordre de 600 pb avec un cadre de lecture ouvert (ORF) de 444 pb, codant pour 2 pré-protéines de 148 et 149 acides aminés. Rahman et al. (1994) montrent que le groupe des friabilines (qu'ils nomment GSP pour Grain Softness Protein) est constitué d'une séquence majeure et de 2 séquences mineures. Le composant majeur est identifié à la puroindoline-a par son extrémité N-terminale. L'une des séquences mineures ne varie pas entre Hard et Soft, c'est probablement celle qui est restée nommée Gsp-1. L'ordre des gènes impliqués dans la texture a été analysé par Tranquilli et al. (1999) sur le génome de *Triticum monococcum* (A) qui présente plus de polymorphisme que le génome D, à l'aide de deux populations de cartographie.

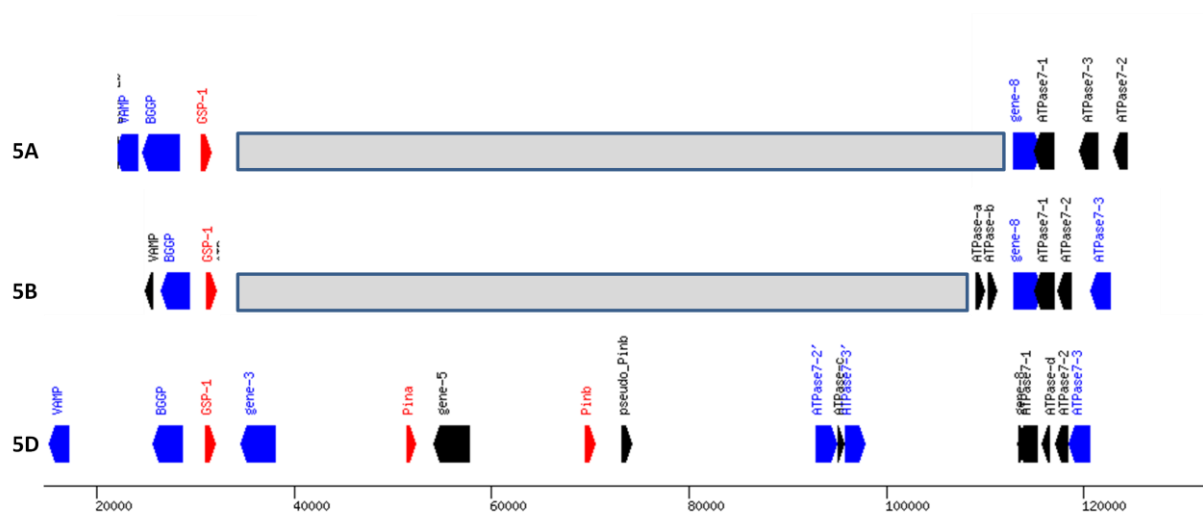


Figure 10. Représentation schématique du locus Ha sur les 3 chromosomes homéologues 5A, 5B et 5D du blé tendre *Triticum aestivum*.

Script Frédéric Choulet (Inra Clermont-Fd) d'après les accessions CT009586, CT009585, CT009735. Les zones grisées représentent les délétions survenues indépendamment sur les chromosomes 5A et 5B. Echelle en pb

Des 3 gènes impliqués dans la texture, *Gsp-A^m1* est le plus distal. *Pina-A^m1* se trouve entre celui-ci et *Pinb-A^m1*.

Par une approche PCR avec des amorces gène-spécifiques, Gautier et al. (2000) ont montré que les gènes codant pour les puroindolines a et b (*Pina* et *Pinb*) étaient conservés chez les blés diploïdes ancêtres du blé tendre (A, B et D), mais pas chez le blé tétraploïde AB (*Triticum durum*). Le tableau s'est considérablement éclairci avec l'article de Chantret et al. (2005) qui comparait la séquence du locus *Ha* entre plusieurs espèces de blé de ploïdies différentes. Les auteurs ont montré qu'une grande délétion était à l'origine de la perte des gènes *Pina* et *Pinb* sur les génomes homéologues A et B du blé hexaploïde *Triticum aestivum* (Figure 10). Cette délétion se serait produite indépendamment dans les génomes A et B de ce polyploïde. La texture Soft du grain de blé hexaploïde a été réintroduite lors de l'hybridation entre le blé dur tétraploïde et le diploïde *Aegilops tauschii* de génome D qui portait le locus *Ha*. La différence de texture entre les espèces de ploïdies différentes était ainsi associée à l'absence de ce locus. Les variations de dureté du grain à l'intérieur de l'espèce hexaploïde *Triticum aestivum* restaient en revanche obscures. A partir de la mise en évidence par Giroux et Morris (1997) d'un lien entre une mutation ponctuelle dans *Pinb* et la dureté de 2 variétés, puis de l'absence de transcrite de *Pina* dans des variétés Hard (Giroux and Morris, 1998), les composants génomiques de la dureté se sont éclaircis, la tendreté résultant de la présence des 2 gènes dans leur forme allélique *Pina-D1a* et *Pinb-D1a*. De nombreux travaux ultérieurs sont venus confirmer l'existence d'un grand nombre de mutations ponctuelles dans le gène *Pinb*, puis dans le gène *Pina*, ayant un impact sur la dureté par la substitution d'acides aminés ou la genèse de codon stop (Chang et al., 2006; Corona et al., 2001; Lillemo and Morris, 2000; Morris, 2002; Morris et al., 2001; Turnbull et al., 2000; Xia et al., 2005) ou encore le décalage du cadre de lecture (Ikeda et al., 2005; Ram et al., 2005). Des polymorphismes de séquence ont également été mis en évidence sur le gène *Pina* dans des accessions synthétiques hexaploïdes, dont l'un donne un phénotype plus Soft que celui produit par l'allèle *Pina-D1a* (Gedye et al., 2004). Certains cultivars présentent des mutations double-nuls *pina* et *pinb* (Chang et al., 2006; Ikeda et al., 2005). Une synthèse de tous les polymorphismes alléliques connus sur les gènes de puroindolines et *Gsp* a été faite par Morris et Bhave (2008) et Bhave et Morris (2008). Dix-sept allèles de *Pina* et 25 allèles de *Pinb* ont été répertoriés à cette date. Deux délétions de tailles différentes provoquant une mutation *pina*-nul ont depuis été détectées dans des cultivars asiatiques (Ikeda et al., 2010). Les variations alléliques de *Pina* et *Pinb* sont rapportées en Annexes 1 et 2.

Différents auteurs ont voulu valider l'implication des gènes de puroindolines dans la texture du grain et ils ont pour cela utilisé la transgénèse. Krishnamurty et Giroux (2001) ont ainsi transformé du riz, céréale ne possédant pas de puroindolines, avec *Pina* et *Pinb* sous le contrôle du promoteur Ubiquitine de maïs, et montré que la dureté des grains issus de plantes transformées était diminuée.

D'autres travaux ont restauré un phénotype Soft à partir de blés Hard soit par complémentation de l'allèle muté *Pinb-D1b* par l'allèle *Pinb-D1a* (Beecher et al., 2002), soit par complémentation d'un cultivar Hard *pina-nul* par un transgène *Pina-D1a* (Martin et al., 2006).

5 Les puroindolines

5.1 Structure biochimique

Les puroindolines sont des protéines spécifiquement exprimées dans le grain (Gautier et al., 1994). Elles sont présentes dans les tribus *Triticeae* et *Avenae* et absentes dans les autres céréales (Douliez et al., 2000). Ce sont des protéines basiques (point isoélectrique calculé 11) et de faible poids moléculaire (12,8 kDa)(Blochet et al., 1993). Elles sont synthétisées sous forme de pré-proprotéines, présentant (1) un peptide signal de 19 AA probablement impliqué dans le routage intracellulaire de ces protéines et (2) des propeptides N- et C-terminaux clivés lors de la maturation des puroindolines. Le propeptide N-terminal est constitué de 9 AA pour la puroindoline-a (PINA) et de 10 AA pour la puroindoline-b (PINB). Le propeptide C-terminal est constitué de 3 AA (Douliez et al., 2000). La puroindoline-a mature est composée de 118 acides aminés, tandis que la puroindoline-b contient 117 AA. Ces deux protéines possèdent 10 résidus cystéine, en positions conservées, permettant la formation de ponts disulfures à la base de la structure secondaire de ces molécules (Gautier et al., 1994). La disposition des résidus cystéine a permis de rapprocher les puroindolines de la superfamille des albumines 2S de grains (Rahman et al., 1994). Ce domaine riche en cystéine a des similarités avec ceux existant dans d'autres protéines du grain, comme les thionines, les inhibiteurs d' α -amylase et les LTP (Lipid Transfer Protein) dont les 4 ponts disulfures sont dans la même position que dans les puroindolines (Dubreil et al., 1998a). Mais les LTP présentent une cavité hydrophobe, dédiée au transfert de lipides, qui n'existe pas dans la structure des puroindolines.

La caractéristique la plus particulière de la structure primaire de ces protéines est la présence d'un domaine riche en tryptophane et en résidus basiques. Ce domaine n'est pas exactement conservé entre les deux puroindolines. Celui de PINA est constitué de 5 tryptophanes et 3 résidus basiques (Trp-Arg-Trp-Trp-Lys-Trp-Trp-Lys), tandis que celui de PINB est composé de 3 tryptophanes et 2 résidus basiques (Trp-Pro-Thr-Lys-Trp-Trp-Lys).

Leur structure secondaire a été étudiée par spectroscopie Raman et infrarouge (Le Bihan et al., 1996). Les deux puroindolines ont une structure secondaire similaire, composée de 30% d'hélices- α , 30% de feuillets β et de 40% de structure non ordonnée à pH7, et leur conformation est significativement dépendante du pH. La structure tridimensionnelle des puroindolines n'a pas pu

être obtenue du fait de leurs propriétés d'agrégation à forte concentration interdisant leur cristallisation.

5.2 Expression dans le grain en développement

Gautier et al. (1994) ont montré sur la variété Soft « Capitole » que les ARNm de puroindolines a et b commencent à s'accumuler entre 8 et 12 JAA. Leur quantité augmente entre 15 et 18 JAA pour atteindre un pic entre 26 et 33 JAA, puis diminue rapidement. Les transcrits ne sont plus détectés 40 jours après anthèse. Les deux puroindolines ont le même profil d'expression, mais les transcrits de *Pinb* sont présents en plus faible quantité que ceux de *Pina*. Au niveau protéique, PINA et PINB ont été quantifiées par ELISA dans des grains en développement de 2 lignées quasi-isogéniques pour la dureté, Heron Hard et Heron Soft (Turnbull et al., 2003). PINA est détectée dans l'albumen Soft dès 10 JAA, augmente rapidement jusqu'à 15 JAA puis lentement jusqu'à 32 JAA pour atteindre une quantité finale de 0,617 mg/g de farine. Dans l'albumen Hard (*pina nul*), une très faible quantité de puroindoline-a est détectée. La cause de ce « bruit de fond » déjà observé n'a pas été identifiée, mais est probablement liée à des réactions croisées des anticorps du fait de la proximité structurale de PINA et PINB. La puroindoline-b apparaît 15 jours après anthèse dans le génotype Soft. Sa quantité augmente régulièrement jusqu'à atteindre 0,268 mg/g à 32 JAA. Dans le génotype Hard, son profil d'accumulation est le même, mais la quantité finale est deux fois moindre. L'électrophorèse bidimensionnelle (IPG x SDS-PAGE) des protéines de types puroindolines a révélé l'existence de plusieurs spots dans les grains matures Hard et Soft (Branlard et al., 2003).

5.3 Localisation tissulaire

Par localisation immunocytochimique avec des anticorps polyclonaux anti-PINA, Dubreil et al. (1998a) ont mis en évidence un marquage à la fois dans l'albumen amylicé et dans la couche à aleurone du grain mature Soft. Un marquage est également visible autour des granules d'amidon.

Avec un anticorps monoclonal anti-PINA, seul l'albumen amylicé est marqué et plus spécifiquement la matrice protéique. La dilution employée pour les anticorps polyclonaux anti-PINA (1/100) induit une réaction croisée avec PINB, ce qui n'est pas le cas avec l'anticorps monoclonal. Ils déduisent donc de leurs observations que PINA serait localisée dans l'albumen amylicé tandis que PINB serait présente à la fois dans la couche à aleurone et dans l'albumen. L'immunolocalisation par fluorescence (microscopie optique) avec des anticorps dilués au 1/200 a permis à Capparelli et al. (2005) de visualiser PINA et PINB à la surface des granules d'amidon, de la membrane plasmique et dans l'espace intercellulaire de la couche à aleurone et de l'albumen du grain mature Soft. Elles sont

moins fréquentes dans la matrice protéique. Dans le cultivar PINA-nul « Sibilla », la puroindoline-b est plus abondante dans la couche à aleurone que dans l'albumen. Dans le cultivar PINB-non fonctionnel « Canadian Red » (mutation ponctuelle *Pinb-D1e* : Trp39 → codon stop), la puroindoline-a est de même détectée plus fortement dans la couche à aleurone que dans l'albumen. Digeon et al. (1999), après clonage du promoteur de *Pinb* et transformation du riz, observent une activité GUS uniquement dans les grains (T1) conformément à ce qui est observé dans le blé, mais à la fois dans l'albumen, la couche à aleurone et les cellules du péricarpe. Wiley et al. (2007), quant à eux, ont étudié l'expression de transgènes fusionnant les régions promotrices de *Pina* et *Pinb* avec le gène rapporteur GUS, dans un contexte génomique de blé dur et de blé tendre. Dans leurs analyses histochimiques sur les grains T3, ils n'observent aucune coloration dans les cellules à aleurone, quel que soit le stade de développement du grain, entre 9 et 35 JAA. En revanche, l'expression est forte dans l'albumen amylicé. Selon les auteurs, la différence de résultats entre l'expérimentation de transgénèse de Digeon et la leur est vraisemblablement due à la différence de plante utilisée pour la transformation, le riz induisant probablement une perte de spécificité du promoteur.

5.4 Propriétés

5.4.1 Liaison aux lipides et propriétés moussantes

Cette propriété de liaison aux lipides est à la base de la découverte des puroindolines, puisqu'elles ont été purifiées par une méthode utilisant le Triton X-114 qui permet l'extraction des protéines membranaires lipophiles. L'étude de l'interaction entre puroindolines et un analogue de phospholipide a montré qu'une molécule de puroindoline se lie à 5 molécules de lysopalmitoylphosphatidylcholine, qui forme des micelles en solution (Wilde et al., 1993). Ultérieurement, Le Guernevé et al. (1998) ont confirmé cette interaction sur toute une gamme de phospholipides et montré que l'affinité dépend fortement de la nature de la tête polaire et de la longueur des chaînes acyl. Une expérience d'injection de PINa en solution sous une monocouche de lipide polaire le plus abondant du blé (monogalactosyldiglycerol MGDG) a montré, par mesure de la pression de surface, que la puroindoline s'insère dans le film lipidique (Kooijman et al., 1998). Le même effet est obtenu avec un peptide reproduisant le domaine riche en tryptophane, fortement hydrophobe. Schiffer et al. (1992) ont montré que les résidus tryptophanes forment des liaisons hydrogènes avec les têtes lipidiques et que leur noyau indole est immergé dans la partie lipidique de la bicouche. Pour ces auteurs, ces résidus sont probablement impliqués dans la translocation des protéines à travers la membrane. Par des expérimentations de mutagenèse dirigée sur le domaine tryptophane des deux puroindolines, Evrard et al. (2008) ont mis en évidence que leurs interactions avec les membranes plasmiques de levure n'étaient pas médiées par les mêmes résidus : les

tryptophanes W41 et W44 sont essentiels pour l'interaction de PINA, tandis que ce sont deux résidus Lysine (K42 et K45) qui régissent l'interaction de PINB avec la membrane.

Les puroindolines ont la capacité de s'insérer plus ou moins profondément dans les agrégats lipidiques comme les micelles ou les bicouches lipidiques vésiculaires (Douliez et al., 2000). En présence de lipides membranaires, les puroindolines forment des agrégats protéiques, ce qui peut expliquer qu'on les observe associées aux lipides polaires des granules d'amidon (Greenblatt et al., 1995). Les lipides polaires de l'albumen de blé sont constitués de phospholipides et de glycolipides dans des proportions de 25 et 75 % respectivement. La forte liaison entre puroindolines et lipides polaires du blé, spécialement les phospholipides chargés négativement, a été montrée par Dubreil et al. (1997). De plus, PINA et PINB interagissent différemment, probablement du fait de la modification du domaine riche en tryptophane. En effet, PINB interagit plus fortement avec les lipides anioniques que PINA. Comme PINB présente également une charge positive nette supérieure à celle de PINA, il est probable que des forces électrostatiques contribuent à l'interaction entre les puroindolines et les lipides polaires (Douliez et al., 2000). Rappelons également que la dureté est significativement corrélée à la composition en lipides polaires présents à la surface des granules d'amidon (Finnie et al., 2010). De plus, leur quantité est grandement diminuée dans les lignées quasi-isogéniques avec *Pinb* muté et *Pina* sauvage.

Du fait de cette liaison avec les lipides, des recherches ont été menées sur l'influence des puroindolines sur les propriétés rhéologiques de la pâte à pain. Il a été montré qu'elles ont un rôle important dans la stabilisation de l'interface lipidique entre les bulles d'air et la pâte (Dubreil et al., 1998b). Le même effet de stabilisation des mousses par les puroindolines a été obtenu dans la bière (Clark et al., 1994).

5.4.2 Propriétés antimicrobiennes

Du fait de leur proximité structurale avec les thionines, qui sont également de petites protéines du grain, basiques et riches en cystéine, il a été suggéré que les puroindolines pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes (Blochet et al., 1993). Elles ont effectivement des propriétés antibactériennes (Capparelli et al., 2005) et antifongiques *in vitro* (Dubreil et al., 1998a), et augmentent, après transgénèse, la résistance du riz à *Magnaporthe grisea* (Krishnamurthy et al., 2001) et du blé dur tétraploïde à *Puccinia triticina*, agent de la rouille noire du blé (Luo et al., 2008). Cette propriété a également été mise à profit pour augmenter la résistance à un agent pathogène dans un modèle très éloigné des céréales. En effet, la transformation par *Pinb* s'est révélée efficace pour réduire la sensibilité de pommiers à *Venturia inaequalis*, agent de la

tavelure (Faize et al., 2004). Evrard et al. (2007) ont observé que le promoteur de *Pina* était induit, dans un riz transgénique, par une blessure ou par une attaque fongique, mais pas celui de *Pinb*.

Les propriétés antimicrobiennes sont probablement liées aux capacités de perméabilisation des membranes cellulaires par les puroindolines. En effet, Charnet et al. (2003) ont montré qu'elles induisaient la formation de canaux ioniques dans les membranes biologiques. La même année, une étude de Jing et al. (2003) met en évidence que le domaine bactéricide de la puroindoline-a est un peptide de 13 résidus, nommé *puroA*, contenant le domaine riche en tryptophane. Ce fragment est actif contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, de même que l'indolicidine, peptide de même structure riche en tryptophane issu de neutrophiles bovins, qui agit par disruption des membranes. Les auteurs montrent également que *puroA* se lie fortement aux phospholipides vésiculaires chargés négativement, entraînant une fuite des colorants contenus dans les vésicules vers le milieu extérieur. L'interaction est beaucoup plus faible avec des vésicules électriquement neutres, suggérant de nouveau l'importance d'interactions électrostatiques entre ce peptide de 13 résidus, contenant le domaine riche en tryptophane, et les membranes.

La toxicité des puroindolines ne se limite pas aux microbes. Du fait de leurs interactions avec les membranes, elles présentent aussi une toxicité envers les cellules des vertébrés. Llanos et al. (2004) ont montré l'existence d'altérations neuronales et musculaires, résultant probablement de la dissipation des gradients de concentration ioniques essentiels au maintien de l'homéostasie cellulaire.

5.4.3 Interactions *Pina*-*Pinb*

Des mutations dans l'un des gènes *Pin* ont des effets significatifs sur l'expression et /ou la stabilité de l'autre gène/protéine. Turnbull et al. (2003) ont montré, sur des lignées quasi-isogéniques pour la dureté, que la quantité de PINB diminuait en l'absence de PINA. En outre, quand des copies de *Pina* ou de *Pinb* sont ajoutées à une lignée Soft, l'effet sur la tendreté n'est pas le même selon la nature du gène additionnel (Swan et al., 2006). L'addition de *Pinb* augmente la quantité de PINA et de PINB liées aux granules d'un facteur 2,6 à 4,8, tandis que seule la quantité de PINA est augmentée en présence d'un gène *Pina* supplémentaire. Selon les auteurs, les résultats indiquent que la puroindoline-b est le facteur limitant de la liaison de la puroindoline-a aux granules d'amidon et de la tendreté. Pour essayer de mieux comprendre la nature de l'interaction entre ces deux protéines, Ziemann et al. (2008) ont testé l'interaction physique entre elles par le système double-hybride en levure. Ils montrent que les deux puroindolines interagissent bien entre elles *in vivo*. PINB interagit avec elle-même et avec PINA, tandis que celle-ci interagit faiblement avec elle-même.

5.5 Fonctions supposées

Du fait de leur double et indépendante découverte, à la fois par les génomiciens et les biochimistes, la vision du rôle biologique des puroindolines est controversée. Les génomiciens considèrent qu'il est clairement établi que les puroindolines sont la cause du caractère de dureté/tendreté tandis que les biochimistes les voient plus comme des marqueurs dont le rôle dans la cellule n'est pas compris.

Leur première fonction supposée est un rôle de défense vis-à-vis des agents pathogènes, du fait de leur activité antimicrobienne, de leur propriété de liaison aux lipides et de leur proximité structurale avec les LTP. Mais, contrairement aux LTP qui sont ubiquitaires et excrétées, les puroindolines sont restreintes à certaines monocotylédones et restent intracellulaires. Elles remplissent donc probablement une fonction spécifique qui reste à découvrir.

Références

- Barlow, K.K., Buttrose, M.S., Simmonds, D.H., Vesk, M. (1973) The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry*, **50**, 443-454.
- Barron, C., Parker, M.L., Mills, E.N.C., Rouau, X., Wilson, R.H. (2005) Ftir Imaging of Wheat Endosperm Cell Walls in Situ Reveals Compositional and Architectural Heterogeneity Related to Grain Hardness. *Planta*, **220**(5), 667-677.
- Bechtel, D.B., Gaines, R.L., Pomeranz, Y. (1982a) Early stages in wheat endosperm formation and protein body initiation. *Annals of botany*, **50**, 507-518.
- Bechtel, D.B., Gaines, R.L., Pomeranz, Y. (1982b) Protein secretion in wheat endosperm-Formation of the matrix protein. *Cereal Chemistry*, **59**(5), 336-343.
- Bechtel, D.B., Zayas, I., Dempster, R., Wilson, J.D. (1993) Size-distribution of starch granules isolated from hard red winter and soft red winter wheats. *Cereal Chemistry*, **70**(2), 238-240.
- Bechtel, D.B., Zayas, I., Kaleikau, L., Pomeranz, Y. (1990) Size-distribution of wheat starch granules during endosperm development. *Cereal Chemistry*, **67**(1), 59-63.
- Beecher, B., Bettge, A., Smidansky, E., Giroux, M.J. (2002) Expression of Wild-Type Pinb Sequence in Transgenic Wheat Complements a Hard Phenotype. *Theoretical and Applied Genetics*, **105**(6-7), 870-877.
- Bettge, A.D. and Morris, C.F. (2000) Relationship among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry*, **77**, 241-247.
- Bhave, M. and Morris, C. (2008) Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology*, **66**(3), 205-219.
- Blochet, J.-E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.-F., Joudrier, P., Pérolet, M., 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 Letters*, **329**(3), 336-340.
- Branlard, G., Felix, I., Leblanc, A., Koenig, J., Bodet, C., Marion, D., Mahaut, B. (1997) La dureté des blés sélectionnés en France: évolution et conséquences. *Industries des céréales*, **101**, 5-10.
- Branlard, G., Amiour, N., Igrejas, G., Gaborit, T., Herbette, S., Dardevet, M., Marion, D. (2003) Diversity of puroindolines as revealed by two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **3**, 168-174.
- Brocklehurst, P.A. (1977) Factors controlling grain weight in wheat. **266**(5600), 348-349.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, **23**(2), 85-112.

- Capparelli, R., Amoroso, M.G., Palumbo, D., Iannaccone, M., Faleri, C., Cresti, M. (2005) Two Plant Puroindolines Colocalize in Wheat Seed and in Vitro Synergistically Fight Against Pathogens. *Plant Molecular Biology*, **58**(6), 857-867.
- Carceller, J.L. and Aussenac, T. (1999) Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats: role of the desiccation phase. *Functional Plant Biol.*, **26**(4), 301-310.
- Chang, C., Zhang, H., Xu, J., Li, W., Liu, G., You, M., Li, B. (2006) Identification of allelic variations of puroindoline genes controlling grain hardness in wheat using a modified denaturing PAGE. *Euphytica*, **152**(2), 225-234.
- Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M.-F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., Chalhou, B. (2005) Molecular Basis of Evolutionary Events That Shaped the Hardness Locus in Diploid and Polyploid Wheat Species (*Triticum* and *Aegilops*). *Plant Cell*, **17**(4), 1033-1045.
- Charnet, P., Molle, G., Marion, D., Rousset, M., Lullien-Pellerin, V. (2003) Puroindolines Form Ion Channels in Biological Membranes. *Biophysical Journal*, **84**(4), 2416-2426.
- Clark, D.C., Wilde, P.J., Marion, D. (1994) The protection of beer foam against lipid-induced destabilization. *Journal of the Institute of Brewing*, **100**(1), 23-25.
- Corona, V., Gazza, L., Zanier, R., Pogna, N.E. (2001) A tryptophan-to-arginine change in the tryptophan-rich domain of puroindoline b in five French bread wheat cultivars. *Journal of Genetics and Breeding*, **55**, 187-189.
- Crofts, A.J., Washida, H., Okita, T.W., Ogawa, M., Kumamaru, T., Satoh, H. (2004) Targeting of Proteins to Endoplasmic Reticulum-Derived Compartments in Plants. The Importance of RNA Localization. *Plant Physiology*, **136**(3), 3414-3419.
- Daniel, C. and Triboï, E. (2002) Changes in wheat protein aggregation during grain development: effects of temperatures and water stress. *European Journal of Agronomy*, **16**(1), 1-12.
- Digeon, J.F., Guiderdoni, E., Alary, R., Michaux-Ferrière, N., Joudrier, P., Gautier, M.F. (1999) Cloning of a wheat puroindoline gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. *Plant Molecular Biology*, **39**(6), 1101-1112.
- Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D. (2000) Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels*1, *2. *Journal of Cereal Science*, **32**(1), 1-20.
- Dubreil, L., Compoint, J.P., Marion, D. (1997) Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 108-116.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D.J., Broekaert, W.F., Quillien, L., 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**(2), 121-135.
- Dubreil, L., Méliande, S., Chiron, H., Compoint, J.P., Quillien, L., Branlard, G., Marion, D. (1998b) Effect of Puroindolines on the Breading Properties of Wheat Flour. *Cereal Chemistry*, **75**(2), 222-229.
- Evrard, A., Lagarde, V., Joudrier, P., Gautier, M.-F. (2008) Puroindoline-a and puroindoline-b interact with the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane through different amino acids present in their tryptophan-rich domain. *Journal of Cereal Science*, **48**(2), 379-386.
- Evrard, A., Meynard, D., Guiderdoni, E., Joudrier, P., Gautier, M.-F. (2007) The promoter of the wheat puroindoline-a gene (PinA) exhibits a more complex pattern of activity than that of the PinB gene and is induced by wounding and pathogen attack in rice. *Planta*, **225**(2), 287-300.
- Faize, M., Sourice, S., Dupuis, F., Parisi, L., Gautier, M.F., Chevreau, E. (2004) Expression of Wheat Puroindoline-B Reduces Scab Susceptibility in Transgenic Apple (*Malus X Domestica* Borkh.). *Plant Science*, **167**(2), 347-354.

- Feillet, P. (2000). In Lipides du grain de blé, INRA éditions: pp 114-121.
- Finnie, S.M., Jeannotte, R., Morris, C.F., Faubion, J.M. (2010) Variation in Polar Lipid Composition Among Near-Isogenic Wheat Lines Possessing Different Puroindoline Haplotypes. *Journal of Cereal Science*, **51**(1), 66-72.
- Gaines, C.S., Raeker, M.O., Tilley, M., Finney, P.L., Wilson, J.D., Bechtel, D.B., Martin, R.J., Seib, P.A., Lookhart, G.L., Donelson, T. (2000) Associations of Starch Gel Hardness, Granule Size, Waxy Allelic Expression, Thermal Pasting, Milling Quality, and Kernel Texture of 12 Soft Wheat Cultivars. *Cereal Chemistry*, **77**(2), 163-168.
- Gatel, F., Martin, G., Hébrard, J.P. (1999) Qualité des blés. Les enjeux d'une nouvelle classification. *Perspectives Agricoles*, **250**, 1-16.
- Gautier, M.-F., Cosson, P., Guirao, A., Alary, R., Joudrier, P. (2000) Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species*1. *Plant Science*, **153**(1), 81-91.
- Gautier, M.F., Aleman, M.E., Guirao, A., Marion, D., 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.
- Gedye, K.R., Morris, C.F., Bettge, A.D. (2004) Determination and Evaluation of the Sequence and Textural Effects of the Puroindoline a and Puroindoline B Genes in a Population of Synthetic Hexaploid Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**(8), 1597-1603.
- Gibson, L.R., McCluskey, P.J., Tilley, K.A., Paulsen, G.M. (1998) Quality of hard red winter wheat grown under high temperature conditions during maturation and ripening. *Cereal Chemistry*, **75**(4), 421-427.
- Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1997) A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**, 857-864.
- Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1998) Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS*, **95**(11), 6262-6266.
- Glenn, G.M., Pitts, M.J., Irving, D.W. (1992) Block-surface staining for differentiation of starch and cell walls in wheat endosperm. *Biotechnic and histochemistry*, **67**(2), 88-97.
- Greenblatt, G.A., Bettge, A.D., Morris, C.F. (1995) Relationship between endosperm texture and the occurrence of friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chemistry*, **72**(2), 172-176.
- Greenwell, P. and Schofield, J.D. (1986) A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry*, **63**(4), 379-380.
- Gupta, R.B., Masci, S., Lafiandra, D., Bariana, H.S., MacRitchie, F. (1996) Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany*, **47**(9), 1377-1385.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., Nishimura, M. (1998) Transport of Storage Proteins to Protein Storage Vacuoles Is Mediated by Large Precursor-Accumulating Vesicles. *Plant Cell*, **10**(5), 825-836.
- Hong, B.H., Rubenthaler, G.L., Allan, R.E. (1989) Wheat pentosans I cultivar variation and relationship to kernel hardness. *Cereal Chemistry*, **66**, 369-373.
- Ikeda, T.M., Cong, H., Suzuki, T., Takata, K. (2010) Identification of new Pina null mutations among Asian common wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*, **51**(3), 235-237.
- Ikeda, T.M., Ohnishi, N., Nagamine, T., Oda, S., Hisatomi, T., Yano, H. (2005) Identification of New Puroindoline Genotypes and Their Relationship to Flour Texture Among Wheat Cultivars. *Journal of Cereal Science*, **41**(1), 1-6.
- Jing, W., Demcoe, A.R., Vogel, H.J. (2003) Conformation of a Bactericidal Domain of Puroindoline a: Structure and Mechanism of Action of a 13-Residue Antimicrobial Peptide. *Journal of Bacteriology*, **185**(16), 4938-4947.

- Jolly, C.J., Rahman, S., Kortt, A.A., Higgins, 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. *Theoretical and Applied Genetics*, **86**(5), 589-597.
- Kawakatsu, T. and Takaiwa, F. (2010) Cereal seed storage protein synthesis: fundamental processes for recombinant protein production in cereal grains. *Plant Biotechnology Journal*, **8**(9), 939-953.
- Kim, W.T., Franceschi, V.R., Krishnan, H.B., Okita, T.W. (1988) Formation of wheat protein bodies: Involvement of the Golgi apparatus in gliadin transport. *Planta*, **176**(2), 173-182.
- Konopka, W., Rotkiewicz, D., Tanska, M. (2005) Wheat Endosperm Hardness. Part II. Relationships to Content and Composition of Flour Lipids. *European Food Research and Technology*, **220**(1), 20-24.
- Kooijman, M., Orsel, R., Hamer, R.J., Bekkers, A. (1998) The Insertion Behaviour of Wheat Puroindoline-a Into Diacylgalactosylglycerol Films. *Journal of Cereal Science*, **28**(1), 43-51.
- Krishnamurthy, K., Balconi, C., Sherwood, J.E., Giroux, M.J. (2001) Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**(10), 1255-1260.
- Krishnamurthy, K. and Giroux, M.J. (2001) Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nature Biotechnology*, **19**, 162-166.
- Köhler, P., Belitz, H.D., Wieser, H. (1993) Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from g-gliadins. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **196**(3), 239-247.
- Langeveld, S.M.J., van Wijk, R., Stuurman, N., Kijne, J.W., de Pater, S. (2000) B-type granule containing protrusions and interconnections between amyloplasts in developing wheat endosperm revealed by transmission electron microscopy and GFP expression. *Journal of Experimental Botany*, **51**(349), 1357-1361.
- Law, C.N., Young, C.F., Brown, J.W.S., Snape, J.W., Worland, A.J. (1978) The Study of Grain Protein Control in Wheat Using Whole Chromosome Substitution Lines. In *Aneuploids in Wheat Protein Improvement. Proceedings of the Two Research Co-Ordination Meetings, Baden, 28 March - 1 April 1977 and Vienna, 26-30 September 1977*: pp 483-502.
- Le Bihan, T., Blochet, J.E., Desormeaux, A., Marion, D., Pézolet, M. (1996) Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and raman spectroscopy. *Biochemistry*, **35**(39), 12712-12722.
- Le Guerneve, C., Seigneuret, M., Marion, D. (1998) Interaction of the Wheat Endosperm Lipid-Binding Protein Puroindoline-a with Phospholipids*1. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **360**(2), 179-186.
- Lemelin, E., Branlard, G., Salvo, L., Lein, V., Aussenac, T., Daydq, J. (2005) Breadmaking stability of wheat flours: Relation between mixing properties and molecular weight distribution of polymeric glutenins. *Journal of Cereal Science*, **42**(3), 317-326.
- Levanony, H., Rubin, R., Altschuler, Y., Galili, G. (1992) Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *Journal of Cell Biology*, **119**(5), 1117-1128.
- Lillemo, M. and Morris, C.F. (2000) A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**(7), 1100-1107.
- Lindeboom, N., Chang, P.R., Tyler, R.T. (2004) Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, With Emphasis on Small Granule Starches: a Review. *Starch-Starke*, **56**(3-4), 89-99.
- Llanos, P., Henriquez, M., Minic, J., Elmorjani, K., Marion, D., Riquelme, G., Molgo, J., Benoit, E. (2004) Neuronal and Muscular Alterations Caused by Two Wheat Endosperm Proteins, Puroindoline-a and Alpha1-Purothionin, Are Due to Ion Pore Formation. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*, **33**(3), 283-284.

- Loussert, C., Popineau, Y., Mangavel, C. (2008) Protein bodies ontogeny and localization of prolamin components in the developing endosperm of wheat caryopses. *Journal of Cereal Science*, **47**(3), 445-456.
- Luo, L., Zhang, J.R., Yang, G.X., Li, Y., Li, K.X., He, G.Y. (2008) Expression of Puroindoline a Enhances Leaf Rust Resistance in Transgenic Tetraploid Wheat. *Molecular Biology Reports*, **35**(2), 195-200.
- Martin, J.M., Meyer, F.D., Smidansky, E.D., Wanjugi, H., Blechl, A.E., Giroux, M.J. (2006) Complementation of the pina (null) allele with the wild type Pina sequence restores a soft phenotype in transgenic wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **113**(8), 1563-1570.
- Morris, C.F. (2002) Puroindolines: the Molecular Genetic Basis of Wheat Grain Hardness. *Plant Molecular Biology*, **48**(5), 633-647.
- Morris, C.F. and Bhavé, M. (2008) Reconciliation of D-genome puroindoline allele designations with current DNA sequence data. *Journal of Cereal Science*, **48**(2), 277-287.
- Morris, C.F., King, G.E., Allan, R.E., Simeone, M.C. (2001) Identification and Characterization of Near-Isogenic Hard and Soft Hexaploid Wheats. *Crop Science*, **41**(1), 211-217.
- Morrison, W.R., Law, C.N., Wylie, L.J., Coventry, A.M., Seekings, J. (1989) The effect of group 5 chromosomes on the free polar lipids and breadmaking quality of wheat. *Journal of Cereal Science*, **9**, 41-51.
- Moss, H.J. (1973) Quality standards for wheat varieties. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, **39**(2), 109-115.
- Osborne, B.G., Turnbull, K.M., Anderssen, R.S., Rahman, S., Sharp, P.J., Appels, R. (2001) The Hardness Locus in Australian Wheat Lines. *Australian Journal of Agricultural Research*, **52**(11-12), 1275-1286.
- Oufattole, M., Park, J.H., Poxleitner, M., Jiang, L., Rogers, J.C. (2005) Selective Membrane Protein Internalization Accompanies Movement from the Endoplasmic Reticulum to the Protein Storage Vacuole Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**(11), 3066-3080.
- Panozzo, J.F. and Eagles, H.A. (1998) Cultivar and environmental effects on quality characters in wheat. I. Starch. *Australian Journal of Agricultural Research*, **49**(5), 757-766.
- Panozzo, J.F., Hannah, M.C., O'Brien, L., Bekes, F. (1993) The Relationship of Free Lipids and Flour Protein to Breadmaking Quality. *Journal of Cereal Science*, **17**(1), 47-62.
- Peng, M., Gao, M., Baga, M., Hucl, P., Chibbar, R.N. (2000) Starch-Branching Enzymes Preferentially Associated with A-Type Starch Granules in Wheat Endosperm. *Plant Physiology*, **124**(1), 265-272.
- Rahman, S., Jolly, C.J., Skerritt, J.H., Walloscheck, A. (1994) Cloning of a wheat 15-kDa grain softness protein (GSP). GSP is a mixture of puroindoline-like polypeptides. *European Journal of Biochemistry*, **223**, 917-925.
- Ram, S., Jain, N., Shoran, J., Singh, R. (2005) New frame shift mutation in puroindoline B in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, **14**, 45-48.
- Ravel, C., Martre, P., Romeuf, I., Dardevet, M., El-Malki, R., Bordes, J., Duchateau, N., Brunel, D., Balfourier, F., Charmet, G. (2009) Nucleotide Polymorphism in the Wheat Transcriptional Activator Spa Influences Its Pattern of Expression and Has Pleiotropic Effects on Grain Protein Composition, Dough Viscoelasticity, and Grain Hardness. *Plant Physiol.*, **151**(4), 2133-2144.
- Rhazi, L., Cazalis, R., Lemelin, E., Aussenac, T. (2003) Changes in the glutathione thiol-disulfide status during wheat grain development. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**(10), 895-902.
- Schiffer, M., Chang, C.H., Stevens, F.J. (1992) The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Engineering*, **5**(3), 213-214.
- Shewry, P.R. and Tatham, A.S. (1997) Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*, **25**(3), 207-227.
- Shewry, P.R., Underwood, C., Wan, Y., Lovegrove, A., Bhandari, D., Toole, G., Mills, E.N.C., Denyer, K., Mitchell, R.A.C. (2009) Storage product synthesis and accumulation in developing grains of wheat. *Journal of Cereal Science*, **50**(1), 106-112.

- Shimoni, Y., Zhu, X., Levanony, H., Segal, G., Galili, G. (1995) Purification, Characterization, and Intracellular Localization of Glycosylated Protein Disulfide Isomerase from Wheat Grains. *Plant Physiology*, **108**(1), 327-335.
- Sourdille, P., Perretant, M.R., Charmet, G., Leroy, P., Gautier, M.F., Joudrier, P., Nelson, J.C., Sorrells, M.E., Bernard, M. (1996) Linkage Between Rflp Markers and Genes Affecting Kernel Hardness in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**(4), 580-586.
- Spencer, B. (1988) Soft wheat - View from Great-Britain (Abstr. 40). *Cereal Foods World*, **33**(8), 666.
- Surget, A. and Barron, C. (2005) Histologie du grain de blé, Association pour le progrès des industries céréalières, Paris: pp 3-7.
- Swan, C.G., Meyer, F.D., Hogg, A.C., Martin, J.M., Giroux, M.J. (2006) Puroindoline B Limits Binding of Puroindoline A to Starch and Grain Softness. *Crop Science*, **46**(4), 1656-1665.
- Symes, K.J. (1965) The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle-size index. *Australian Journal of Agricultural Research*, **16**(2), 113-123.
- Takahashi, H., Saito, Y., Kitagawa, T., Morita, S., Masumura, T., Tanaka, K. (2005) A Novel Vesicle Derived Directly from Endoplasmic Reticulum is Involved in the Transport of Vacuolar Storage Proteins in Rice Endosperm. *Plant Cell Physiology*, **46**(1), 245-249.
- Tranquilli, G., Lijavetzky, D., Muzzi, G., Dubcovsky, J. (1999) Genetic and Physical Characterization of Grain Texture-Related Loci in Diploid Wheat. *Molecular and General Genetics*, **262**(4-5), 846-850.
- Turnbull, K.M., Gaborit, T., Marion, D., Rahman, S. (2000) Variation in puroindoline polypeptides in Australian wheat cultivars in relation to grain hardness. *Australian Journal of Plant Physiology*, **27**, 153-158.
- Turnbull, K.M., Marion, D., Gaborit, T., Appels, R., Rahman, S. (2003) Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta*, **216**(4), 699-706.
- Turnbull, K.M. and Rahman, S. (2002) Endosperm Texture in Wheat. *Journal of Cereal Science*, **36**(3), 327-337.
- Wilde, P.J., Clark, D.C., Marion, D. (1993) Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**(10), 1570-1576.
- Wiley, P., Tosi, P., Evrard, A., Lovegrove, A., Jones, H., Shewry, P. (2007) Promoter analysis and immunolocalisation show that puroindoline genes are exclusively expressed in starchy endosperm cells of wheat grain. *Plant Molecular Biology*, **64**(1), 125-136.
- Woychik, J.H., Boundy, J.A., Dimler, R.J. (1961) Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**(3), 477-482.
- Wrigley, C.W., Bekes, F., Bushuk, W. (2006) Gluten: a balance of gliadin and glutenin. In *Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality* (C. Wrigley, F. Bekes & W. Bushuk, eds): pp 3-32.
- Xia, L.Q., Chen, F., He, Z.H., Chen, X.M., Morris, C.F. (2005) Occurrence of Puroindoline Alleles in Chinese Winter Wheats. *Cereal Chemistry*, **82**(1), 38-43.
- Ziemann, M., Ramalingam, A., Bhave, M. (2008) Evidence of physical interactions of puroindoline proteins using the yeast two-hybrid system. *Plant Science*, **175**(3), 307-311.

Matériel et méthodes

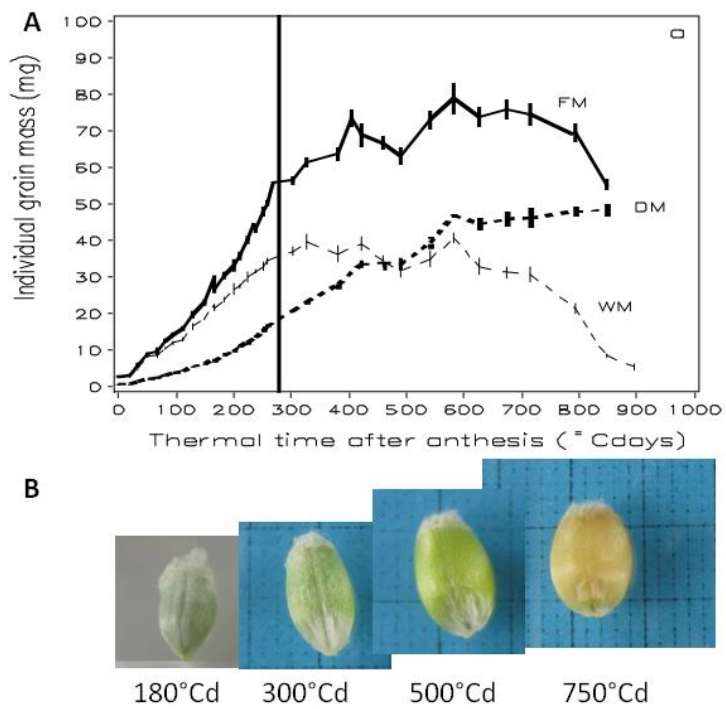


Figure 11. Développement du grain de blé.

A : masse du grain en développement (cv Récital) en fonction de la somme des températures (°Cd) depuis l'anthèse. FM : masse fraîche, DM : masse sèche, WM: masse d'eau, ligne verticale (275°Cd) : début du plateau de l'accumulation d'eau dans le grain. Source :(Nadaud et al., 2010). **B** : Photos de grains de Falcon Soft aux quatre stades de développement échantillonnés.

Matériel végétal

1 Matériel génétique

La variété australienne Falcon Hard résulte du croisement entre 2 variétés Hard (Dundee et Gular) et une variété Soft (Bencubbin) selon le pedigree suivant : Dundee/ Gular // Bencubbin /3/ Gular (cf Annexe 3).

Nos travaux ont été réalisés sur deux lignées quasi-isogéniques pour la dureté (Symes, 1969). Elles résultent du croisement de Falcon (Hard) avec la variété Heron (Soft), suivi de 6 back-cross (BC) de l'hétérozygote avec le parent Hard Falcon (Heron/7*Falcon). La sélection de l'hétérozygote pour la dureté a été faite sur l'index de taille des particules de farine.

Les lignées sont considérées comme quasi-isogéniques car la contribution du parent donneur (Heron) après 6 BC est de 0,78%. Les lignées seraient donc fixées à 99,22%.

Nous avons vérifié le niveau d'isogénicité global sur le génome par l'utilisation de marqueurs DArTs et celui du locus Ha par des marqueurs ISBP et géniques. Ces techniques sont développées dans le chapitre Méthodes. Falcon Soft possède les allèles *Pina-D1a* et *Pinb-D1a* ('sauvages'), tandis que Falcon Hard ne possède que le gène *Pinb-D1a*, *Pina* étant délété (= *Pina-D1b*) (Giroux and Morris, 1998; Ikeda et al., 2005).

La dureté de chaque lignée quasi-isogénique (récolte 2008) a été évaluée par NIRS. La valeur obtenue pour Falcon Hard est de 98, celle des grains Falcon Soft est de 42.

2 Production du matériel végétal

Les grains des lignées quasi-isogéniques ont été semés en pots et mis à vernaliser au stade 2 feuilles pendant 2 semaines à 6°C. Les plants vernalisés ont été déposés en serre pendant 4 semaines au mois de janvier puis repiqués sous tunnel au mois de février 2008 et cultivés en conditions irriguées. La floraison a débuté à la mi-avril et chaque épi arrivant à l'anthèse a été étiqueté. La température a été enregistrée toutes les 30 min en quatre points du tunnel à hauteur d'épis. Les températures quotidiennes moyennes ont été calculées et additionnées pour déterminer le nombre de degrés-jours (°Cj) accumulés par les épis en développement. Les grains ont été récoltés dans la partie médiane de l'épi, aux stades 180°Cj, 300°Cj, 500°Cj et 750°Cj, correspondant pour notre année de culture à 11, 19, 32 et 44 JAA (Figure 11). Ces quatre stades sont respectivement représentatifs de la fin de la phase de cellularisation, l'accumulation rapide d'amidon, l'accumulation lente d'amidon et la maturité avant dessiccation. Les échantillons ont été collectés dans la glace, puis directement fixés

selon le type d'analyse à mener. Pour les études en microscopie électronique, un grain a été prélevé au milieu de l'épi, à chaque stade de développement, sur une plante Hard et une plante Soft. Il a été immédiatement disséqué et fixé. Pour les études en protéomique, 3 prélèvements de 12 grains (2 grains sur 6 plantes différentes) ont été effectués à chaque stade constituant 24 échantillons (2 géotypes x 4 stades x 3 répétitions biologiques). Les prélèvements ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -20°C.

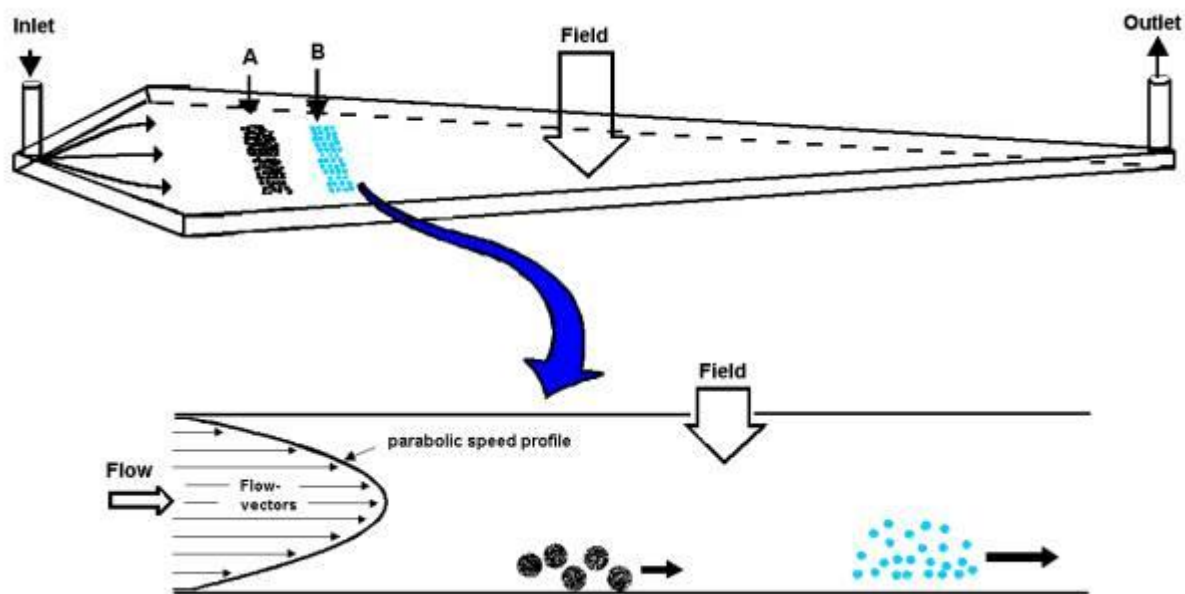


Figure 12. Représentation schématique de la séparation de macromolécules par AFFFF.
 Source : <http://www.consenxus.com/AFFF-method.htm>

Méthodes

3 Caractérisation phénotypique

3.1 Dureté

La dureté a été évaluée par NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIR Systems Inc., MD, USA) sur des moutures complètes obtenues au moulin Cyclotec 14920 (Hilleröd, Denmark), muni d'une grille de 0,75 mm, selon des équations de calibration établies pour l'année de culture. La moyenne et l'intervalle de confiance sont basés sur 2 répétitions.

3.2 Taille des granules d'amidon

Les granules d'amidon sont extraits à partir de 10 grains selon la méthode de Bancel et al (2010). La distribution de la taille des granules d'amidon a été observée par diffraction laser à l'aide du Malvern Mastersizer 2000^E (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Trois répétitions de cinquante mesures par échantillon ont été réalisées pour déterminer la distribution. Celle-ci est exprimée en pourcentage du volume qu'occupent les granules en fonction de leur taille.

3.3 Taille des polymères de protéines de réserve

Les protéines de réserve ont été extraites de moutures de grains entiers Hard et Soft Falcon suivant le protocole décrit par Lemelin et al (2005a) avec les modifications suivantes : 30 mg de farine sont dispersés dans 1 ml de tampon 0,1M de phosphate de sodium (pH 6,9) contenant 2% (w/v) de SDS et incubés à 60°C pendant 15 min. Les extraits contenant les polymères de protéines de réserve solubles et insolubles sont soumis aux ultra-sons pendant 15 s puis fractionnés par AFFFF (Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation) dans un appareil Eclipse3 F System (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) qui permet une séparation de macromolécules de taille variant du nanomètre au micron (Figure 12). La détection des différentes macromolécules est réalisée par des systèmes de détection multiples. Le système Eclipse est connecté en série à un détecteur UV, un détecteur MALS (Multi-Angular Light Scattering : diffusion de lumière multi-angle) et à un réfractomètre. Ce couplage permet l'obtention des masses molaires, des tailles, de la structure ou de la conformation des objets étudiés sans nécessité de calibration avec des standards.

Différents paramètres ont été analysés sur les polymères de protéines de réserve présents dans les moutures de grains entiers Hard et Soft en utilisant ce type de fractionnement. La masse (Mw) et le nombre de polymères (Mn) sont évalués et permettent de déterminer l'indice de polydispersité

(Mw/Mn) qui caractérise la distribution des masses moléculaires (MWD). Ces mesures ont été obtenues à l'Institut Polytechnique LaSalle à Beauvais.

3.4 Spectrocolorimétrie des farines

Des mesures de spectrocolorimétrie ont été réalisées sur les farines blanches et les sons de grains matures des lignées quasi-isogéniques, provenant de trois années de récolte : 1997, 2008 et 2010. Les farines blanches et les sons ont été produits à partir de 10 g de grains, avec le moulin Brabender Junior (Duisburg, Allemagne) équipé d'un tamis de 75 µm pour la séparation des fractions. Les mesures de spectrocolorimétrie ont été réalisées avec l'appareil Konica Minolta CM2500D (Minolta Corp., Ramsey, NY, USA). La couleur des échantillons est décomposée dans l'espace à 3 dimensions L*, a* et b*. L'indice L* mesure la luminance et varie de 0 (noir) à 100 (blanc), l'indice a* mesure la couleur sur l'axe vert (-60) – rouge (+60) et l'indice b* mesure la couleur sur l'axe bleu (-60) – jaune (+60). Pour chaque échantillon, les moyennes de chaque indice ont été calculées sur trois réplicats de trois mesures. L'intervalle de confiance à 95% est basé sur la plus petite différence significative (PPDS).

4 Caractérisation biochimique

4.1 Protéines totales

La teneur en protéines totales (N x 5,7) des grains Hard et Soft a été estimée par la méthode Dumas (1831). L'azote total (N) est dosé par combustion dans 200 mg d'échantillon (mouture totale) sur un appareil Leco FP-428 (LECO Corporation, St-Joseph, MI, USA), étalonné avec de l'EDTA. La teneur en protéines est rapportée à la matière sèche.

4.2 Amidon

L'amidon total a été dosé sur 100 mg de mouture complète avec le kit Total Starch (AA/AMG) (N° catalogue : K-TSTA, Megazyme, Irlande), basé sur la méthode standard AACC 76-13. La teneur en amidon, calculée sur la base de deux répétitions, est rapportée à la matière sèche. Ces dosages ont été réalisés à l'Institut Polytechnique LaSalle à Beauvais.

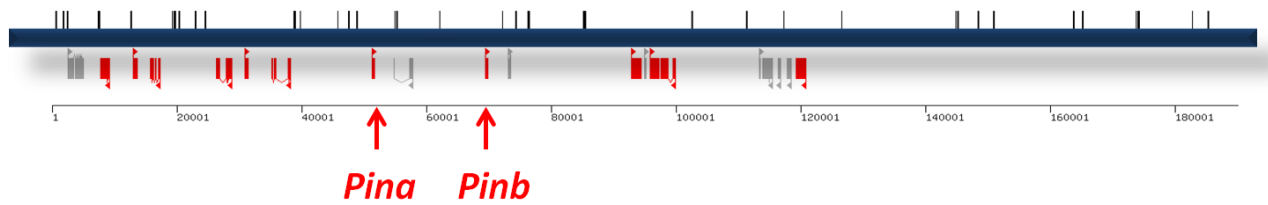


Figure 13. Répartition des marqueurs ISBP sur le locus *Ha*.

Locus *Ha* : barre bleue ; au-dessus : marqueurs ISBP ; en-dessous : gènes (rouge) et pseudo-gènes (gris). Les gènes *Pina* et *Pinb* sont indiqués par des flèches. Script Frédéric Choulet (Inra Clermont-Ferrand), d'après l'accèsion CT009735. Echelle en pb.

5 Caractérisation génomique des lignées quasi-isogéniques

5.1 Caractérisation génomique par marqueurs DArT

Le polymorphisme du génome des lignées quasi-isogéniques (LQI) Falcon Hard et Soft a été évalué par DArT (Diversity Arrays Technology) sur la plateforme australienne Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DArT P/L) (<http://www.diversityarrays.com/index.html>). Le principe de la technique repose sur l'hybridation de l'ADN à tester sur des fragments représentatifs du polymorphisme de l'espèce fixés sur lame. En pratique, la complexité de l'ADN de référence est réduite, afin d'obtenir une représentation du génome, par la restriction avec une combinaison d'enzymes, la ligation d'adaptateurs et l'amplification de certains fragments. Ces fragments sont marqués par une fluorescence bleue et fixés sur lame microarray. La complexité de l'ADN à tester est réduite de la même façon, puis les fragments obtenus sont marqués par une fluorescence verte et hybridés sur la lame microarray. L'intensité relative d'hybridation sur chaque marqueur est mesurée par détection du signal fluorescent vert/bleu. Les résultats sont donnés sous forme de présence/absence pour chaque marqueur.

Les lames microarrays pour le blé contiennent 2236 marqueurs répartis sur tous les chromosomes.

5.2 Caractérisation génomique du locus *Ha* par marqueurs ISBP

Les marqueurs ISBP (Insertion Site-Based Polymorphism) ont été développés récemment par l'équipe 'Génome' de l'UMR GDEC de l'Inra de Clermont. Ils reconnaissent des sites uniques de jonction entre un élément transposable et une séquence présente en faible nombre de copies. Ils ont été utilisés pour vérifier l'isogénicité du locus *Ha* dans les 2 lignées quasi-isogéniques Hard/Soft de Falcon. Quarante-huit couples d'amorces ont été définis avec le programme *IsbpFinder* (Paux et al., 2010) selon une répartition homogène sur le BAC séquencé CT009735 (187 kb) contenant le locus *Ha* (Figure 13), donnant des amplicons inférieurs à 300 pb.

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 10 µl contenant 25 ng d'ADN, tampon 1X, betaine 1M, 0,4 mM dNTP, 0,5 µM amorces, 0,25 U Taq polymérase, 0,16X Sybr Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Le programme PCR est composé d'une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, puis 7 cycles de 95°C 30 s, 62°C (-1°C/cycle) 30 s, 72°C 30 s, 31 cycles de 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 11 cycles de 95°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s et une extension finale de 5 min à 72°C.

La détection des amplicons a été réalisée par analyse des courbes de dissociation sur ABIPRISM® 7900HT (Applied Biosystems), en utilisant le paramètre par défaut 'dissociation step' pour mesurer l'intensité de fluorescence du produit PCR dans une gamme linéaire de températures de

Gène	Amorces	Séquences 5'-3'	Taille amplicon (pb)	Progr. PCR
VAMP	VAMPg2	TCCTTGATCCTCTCCAGGAA	623	TD 68
	VAMPd2	CGACGACCATGATCTACGC		
BGGP	BGGPg1	AAGGTCAAATGGTGCTACGG	549	TD 68
	BGGPd1	CTCTTCCTCCTCGTCCTCCT		
Gsp	Gspg1	TGGCCTCATCTCATCTTTCA	738	TD 65
	Gspd1	GCACTTCCACACATTCCTTT		
Hypothétique 3	HaHyp3g1	GTCGTCGTACCACCAGTGA	946	TD 70
	HaHyp3d1	GATACCAATTGTGACGACCG		
Amont Pina	Pina-538g	CCATGTGACTTTCTTGGTACGTACA	503	TD 65
	Pina-35d	AGATGAGATGAGGCCACACC		
Pina	puroag2	GCAGTGGCTAGAAAGATGACGAT	829	TD 65
	puroad2	CACCAGTAATAGCCAATAGTGCC		
Pseudogène 5	Hagene5g1	TTAAAGCGGGTTGATAATGTCA	718	TD 70
	Hagene5d1	AAAGACTGAGATGACGTACGTAGAC		
Pinb	purobg2	CAAGGCCAGTTCACAAAAGCT	730	TD 65
	purobd2	TCACCAGTAATAGCCACTAGGGAC		
ATPase7-2'	ATPase7-2'g1	TCAAGAACAACACCGAGCTG	611	TD 65
	ATPase7-2'd1	CTTGGCCTCTTCTCCTCCT		

Tableau 2. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes et pseudo-gènes du locus Ha sur les lignées quasi-isogéniques Hard et Soft de Falcon.

dénaturation allant de 60°C à 95°C. Les courbes de dissociation ont été analysées avec le logiciel SDS 2.2.1 (Applied Biosystems).

5.3 Caractérisation génomique du locus *Ha* par marqueurs géniques

Des amorces ont été définies sur 9 gènes et pseudo-gènes connus sur la séquence de *T. aestivum* cv Renan au locus *Ha*, afin de vérifier leur présence sur les lignées quasi-isogéniques Hard et Soft de Falcon (Tableau 2). Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant 25 ng d'ADN, tampon 1X, betaïne 1M, 0,4 mM dNTP, 0,5 µM amorces, 0,25 U Taq polymérase. Le programme PCR (TD 65) utilisé pour amplifier *Gsp*, *Pina*, *Pinb* et *ATPase* est composé d'une dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min, puis 10 cycles de 94°C 1 min, 65°C (-1°C/cycle) 30 s, 72°C 45 s, 30 cycles de 94°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 45 s et une extension finale de 5 min à 72°C. Pour amplifier les gènes VAMP et BGGP, la température d'hybridation initiale a été portée à 68°C (TD 68) et la température d'hybridation des 30 cycles était de 58°C. Pour les gènes hypothétiques 3 et 5, l'amplification a été réalisée avec une température d'hybridation initiale de 70°C (TD 70) et une température d'hybridation pour les 30 cycles de 60°C. La présence des amplicons a été détectée sur gel d'agarose à 2% colorés au bromure d'ethydidium.

6 Traitement des échantillons pour la microscopie électronique

Deux procédures de fixation ont été utilisées pour les grains aux quatre stades, l'une au glutaraldehyde pour les observations ultrastructurales, l'autre au paraformaldehyde et glutaraldehyde pour l'immunocytochimie. Le glutaraldehyde est utilisé pour obtenir une bonne fixation des tissus grâce aux liaisons qu'il forme avec les groupements NH₂. Mais ces liaisons dénaturent les épitopes, qui doivent être préservés pour l'immunolocalisation. C'est la raison pour laquelle on diminue la quantité de ce produit et qu'on le remplace en partie par du paraformaldehyde qui fixe les tissus, de façon moins optimale, par sa polymérisation.

Pour les observations ultrastructurales, des échantillons de 1 mm³ ont été découpés à la lame de rasoir dans l'albumen, à partir d'une tranche coupée transversalement au centre du grain. Ils ont été immédiatement fixés dans une solution de glutaraldehyde à 3% dans du tampon phosphate (0,1 M pH7,4) pendant 4 h à 4°C. Après 3 rinçages de 10 min dans du tampon phosphate et 7 rinçages de 10 min dans de l'eau ultra-pure, les échantillons ont été post-fixés dans une solution aqueuse de tétroxyde d'osmium à 1% pendant 1 h à température ambiante, puis rincés 6 fois 5 min dans de l'eau ultra-pure.

Pour les observations en immunocytochimie, les mêmes échantillons ont été fixés dans une solution de paraformaldehyde à 4% et de glutaraldehyde à 0,5% dans du tampon phosphate salin (PBS 0,1 M

pH7,4) pendant 4 h à 4°C, puis rincés 3 fois 10 min dans du tampon phosphate et 7 fois 10 min dans de l'eau ultra-pure.

Ensuite, les deux types d'échantillons ont été traités de la même façon pour la déshydratation et l'imprégnation dans la résine. L'étape de déshydratation est nécessaire car la résine n'est pas miscible à l'eau présente dans les échantillons. Ceux-ci ont donc d'abord été transférés dans de l'éthanol 30% (v/v) pendant 30 min à température ambiante. Puis ils ont été progressivement déshydratés par passage dans des solutions de concentrations croissantes en éthanol : 50% pendant 30 min, 70%, 85%, 95% pendant 1 h chacune et enfin 100% pendant 1 h, puis 100% pendant une nuit. Les échantillons ont ensuite été infiltrés par de la résine LR White Hard Grade (Agar Scientific, UK), diluée dans l'éthanol en concentration décroissante. L'incubation dans les solutions (éthanol : résine) a été faite selon les étapes suivantes : solution 4 : 1 (v/v) pendant 45 min, puis 3 : 2 pendant 60 min, 2 : 3 pendant 90 min, 1 : 4 pendant 2 h et enfin résine pure 3 fois pendant 1 h chacune. Les échantillons ont ensuite été incubés une nuit dans la résine pure. L'inclusion des échantillons a été réalisée en capsules de gélatine, remplies de résine et fermées pour permettre la polymérisation de la résine à l'abri de l'air. La polymérisation a eu lieu à 55°C pendant 4 jours.

Pour la microscopie électronique, des coupes de 80 nm sont réalisées à l'ultramicrotome (microm MT-7000, Oklahoma City, USA).

Pour les observations ultrastructurales, les coupes ont été collectées sur des grilles de cuivre 200-mesh recouvertes d'un film de carbone. Elles ont été contrastées à l'acétate d'uranyle (2% w/v dans de l'eau ultra-pure, filtré sur un filtre de 0,45 µm) par flottaison sur des gouttes de 50 µl en chambre humide et à l'obscurité. Enfin, elles ont été rincées 6 fois 5 min dans l'eau ultra-pure, séchées à l'air et stockées.

Pour l'immunocytochimie, nous avons utilisé les anticorps polyclonaux produits au laboratoire de Didier Marion (Inra Nantes). Les coupes ont été collectées sur des grilles de nickel 200-mesh, recouvertes d'un film de carbone. Toutes les étapes du marquage ont été réalisées par flottaison des grilles sur 50 µl de chacune des solutions déposées sur du parafilm. Les grilles ont d'abord été déposées sur une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) 3% (w/v) dans le tampon phosphate salin (PBS 0,1M pH7,4) pendant 30 min à température ambiante en chambre humide, afin de bloquer les sites non-spécifiques. Puis les coupes ont été incubées 1 h à température ambiante avec les antisérums de lapin polyclonaux α -PINa et α -PINb dilués respectivement aux 1/200^{ème} et 1/100^{ème} dans du tampon PBS contenant 1% de BSA et 0,05% de Tween20. Les coupes témoins ont été incubées dans un antisérum α -légumine de pois dilué au 1/100^{ème} dans le même tampon. Après 6 rinçages de 5 min dans ce même tampon, les coupes ont été incubées 1 h avec un anticorps de chèvre anti-lapin dilué au 1/20^{ème} conjugué à des particules d'or colloïdal 'Nanogold' de 1 nm (Aurion, Biovalley). Trois rinçages de 5 min dans le tampon PBS, 1% BSA, 0,05% Tween20 puis 3

rinçages de 5 min dans du PBS seul ont été effectués. Puis les échantillons ont été post-fixés dans du tampon PBS contenant 2,5% de glutaraldehyde pendant 10 min à température ambiante et rincés 3 fois dans du tampon PBS et 3 fois dans de l'eau ultra-pure. Les particules d'or ont été amplifiées par dépôt de particules d'argent selon les instructions du kit d'Aurion (www.aurion.nl). Les coupes ont ensuite été contrastées à l'acétate d'uranyle filtré, 2% dans l'eau, pendant 15 min à l'obscurité, rincées 6 fois 5 min dans l'eau ultra-pure, séchées à l'air et stockées à l'abri de la poussière. Les observations ultrastructurales ont porté sur 8 échantillons : 2 géotypes x 4 stades, tandis que celles en immunocytochimie ont concerné 24 échantillons : 2 géotypes x 4 stades x 3 anticorps. Elles ont été réalisées sur un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1230, à 80 keV.

7 Préparation des échantillons pour la protéomique

Les études protéomiques des grains en développement ont porté sur les fractions albumines-globulines (protéines du métabolisme) et amphiphiles (protéines essentiellement liées aux structures cellulaires) des protéines du grain entier. Chacune des deux analyses a été conduite sur 48 échantillons : 2 géotypes x 4 stades x 3 répétitions biologiques x 2 répétitions techniques.

Au moment de l'extraction, les échantillons ont été pesés, broyés manuellement dans un mortier refroidi à l'azote liquide et séparés en deux fractions : 250 mg ont été prélevés pour l'extraction séquentielle des albumines-globulines (AG) et des amphiphiles (AMP), le reste de broyat a été congelé à -20°C.

7.1 Prétraitement à l'acétone

Un prétraitement à l'acétone a été effectué sur le broyat afin de supprimer les pigments chlorophylliens, présents en grande quantité dans les stades jeunes. Cinq cents µl d'une solution d'acétone glacial contenant 0,07% de β-mercaptoéthanol et 17 µl d'inhibiteur de protéases sont ajoutés aux 250 mg d'échantillon et vortexés. Après précipitation à -20°C pendant 24 h, les échantillons sont centrifugés à 15000 tr/min pendant 30 min à 0°C. Après plusieurs lavages avec la même solution et centrifugations, le culot est séché par évaporation pendant 2 h.

7.2 Extraction des albumines-globulines

Les albumines-globulines sont des protéines hydrosolubles, extraites avec 2,5 ml de tampon phosphate salin (Phosphate 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7,8) contenant 4 µl/ml d'inhibiteur de protéases, par agitation pendant 2 h, à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est prélevé pour précipitation des AG, tandis que le culot est gardé pour l'extraction des amphiphiles (cf ci-dessous). Les AG sont précipitées à l'acétone à -20°C pendant 2 h. Le culot est lavé 3 fois à l'acétone puis séché.

Pour l'analyse en électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont solubilisées dans 400 µl d'une solution contenant CHAPS 4%, Urée 7M, Thiourée 2M, IPG buffer 3-11 1%, DTT 70 mM. Le CHAPS est un surfactant zwitterionique, détergent non dénaturant assurant la solubilisation par rupture des interactions hydrophobes. L'urée est un agent chaotrope qui rompt les liaisons hydrogènes et dont l'action de solubilisation est améliorée par le thiourée, autre agent chaotrope. Leur action provoque un dépliement des protéines. Le DTT (Dithiothréitol) est un agent réducteur capable de rompre les ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Les échantillons sont agités pendant 2 h, soniqués 20'' à 20 W et centrifugés. Un dosage au réactif de Bradford (cf ci-dessous) est réalisé sur 2 réplicats de 5 µl de solution protéique. Des aliquots sont préparés à 150 µg/100µl.

7.3 Extraction des amphiphiles

Ces protéines liées aux structures cellulaires membranaires ont une affinité pour les lipides et sont donc extraites grâce à leurs propriétés d'hydrophobicité. Elles ont une grande affinité pour les détergents hydrophobes non-ioniques, comme le Triton X-114. Ce détergent, qui forme initialement de petites micelles hydrophobes, a la propriété de former une partition de phase qui correspond à l'agrégation en micelles géantes distinctes de la phase aqueuse, à une température peu élevée (22°C) qui permet aux protéines de conserver leur structure native. Cette caractéristique permet de séparer les protéines hydrophobes des protéines hydrophiles.

Le culot résultant de l'extraction des AG est repris dans 7,5 ml de tampon contenant Tris-HCl 0,1M pH 7,8, NaCl 0,25M, EDTA 5 mM, Triton X-114 2% et 8,33 µl d'inhibiteurs de protéases. Il est placé en agitation pendant 1 h à 4°C. Après centrifugation, le surnageant est placé à 37°C pendant 30 min. Après une nouvelle centrifugation à 5000g, 22°C pendant 10 min, la phase inférieure riche en protéines amphiphiles est gardée et mise en contact avec 5 volumes d'une solution d'éther : éthanol (1:3). Le mélange est placé à -20°C pendant 1 nuit pour permettre la précipitation des protéines. Après centrifugation, le culot est lavé 3 fois avec la solution éther : éthanol puis une fois à l'éther pur avant d'être mis à sécher. Pour l'analyse en électrophorèse bidimensionnelle, les protéines sont solubilisées dans 200 µl d'une solution contenant CHAPS 4%, Urée 7M, Thiourée 2M, IPG buffer 3-11 1%, DTT 70 mM.

Les protéines amphiphiles étant principalement des protéines membranaires hydrophobes, elles sont difficiles à solubiliser, en particulier au stade 180°Cj quand elles sont proportionnellement plus abondantes. Pour améliorer la solubilisation des protéines amphiphiles des échantillons de ce stade, deux détergents (ASB14 et Triton X100) sont ajoutés à la solution de solubilisation (2.5% CHAPS, 1.5% ASB14, 0.5% Triton X100, 7M urea, 2M thiourea, 1% IPG buffer pH 3-11, 70 mM DTT) sans autre modification dans les étapes suivantes du protocole.

Les échantillons sont agités pendant 2 h, soniqués 20 s à 20 W et centrifugés 5 min à 10000 tr/min.

Un dosage au réactif de Bradford est réalisé sur 2 réplicats de 5 μl de la solution protéique. Des aliquots sont préparés à 150 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ pour tous les échantillons sauf ceux du stade 180°Cj pour lesquels les aliquots ont été préparés à 120 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$.

7.4 Dosage Bradford

Pour pouvoir comparer précisément le niveau d'expression des protéines dans les différentes conditions, il est primordial de déposer la même quantité de protéines sur tous les gels soumis à l'électrophorèse bidimensionnelle. Le réactif de Bradford contient du bleu de Coomassie qui forme un complexe avec les protéines. La formation de ce complexe induit un changement de l'absorbance du colorant à 595 nm, proportionnel à la quantité de protéines contenues dans la solution, dans une gamme allant de 0,1 à 1,4 mg/ml de protéines.

Cinq microlitres de solution protéique sont mélangés à 45 μl d'eau ultra-pure. On ajoute à cet échantillon 1500 μl de réactif de Bradford. Une gamme étalon est réalisée avec de la BSA à 2 mg/ml permettant d'obtenir une gamme de 0 à 75 μg de protéines. Après homogénéisation de la gamme et des échantillons, on laisse incuber 25 min à température ambiante, puis on procède au dosage au spectrophotomètre.

8 Electrophorèse bidimensionnelle

Utilisant deux paramètres physico-chimiques des protéines indépendants l'un de l'autre (le point isoélectrique $p\text{I}$ et la masse moléculaire MM), l'électrophorèse bidimensionnelle permet une séparation optimale des protéines, et plusieurs centaines de protéines peuvent être séparées en une seule expérience.

8.1 Première dimension

Une première séparation des protéines est réalisée par isoélectrofocalisation (IEF) selon le $p\text{I}$ des protéines, sur de fines bandes de gels à gradients de pH 3-11 immobilisés ou IPG (Immobiline™ DryStrip, GE Healthcare) de 24 cm. Les IPG sont formés par la copolymérisation de groupes de dérivés d'acrylamide tampon et titrant dans un gel de polyacrylamide, qui sont immobilisés chimiquement et ne peuvent migrer dans le champ électrique. L'immobilisation permet une meilleure reproductibilité des profils protéiques et une charge plus importante en protéines. Mais la résolution des protéines hydrophobes est faible (Molloy, 2000). Nous avons choisi de déposer les échantillons protéiques en cupules, afin de mieux visualiser les protéines basiques. En effet, cela permet d'utiliser du DeStreak™ reagent dans la solution de réhydratation (R) des gels, en

remplacement du DTT. Ce DeStreak™ est un agent réducteur non chargé, qui empêche l'oxydation aspécifique des groupements thiols.

Douze gels IPG sont réhydratés pendant 24 h dans 460 µl d'une solution R contenant CHAPS 4%, Urée 7M, Thiourée 2M, IPG buffer 3-11 1%, DeStreak™ reagent 12 µl/ml et quelques grains de Bleu de bromophénol. Cent cinquante microgrammes de protéines (120 µg pour le stade 180°Cj) solubilisés dans 100 µl de la solution TUC décrite précédemment sont déposés dans une cupule placée du côté acide du gel IPG, côté anode de l'appareil IPGphor. Des mèches humidifiées avec 150 µl d'eau ultra-pure dégazée et 150 µl de solution R sans bleu de bromophénol sont déposées aux extrémités acide et basique, respectivement, du gel, sur lesquelles viennent s'appliquer les électrodes. Les focalisations réalisées pour les albumines-globulines et les amphiphiles sont respectivement de 90 kVh et de 70 kVh .

Après la focalisation, les protéines sont réduites par immersion des gels dans une solution contenant Urée 6M, Tris-HCl pH 8,8 10%, Glycérol 30%, SDS 2%, DTT 1% pendant 15 min puis alkylées dans une solution contenant Urée 6M, Tris-HCl pH 8,8 10%, Glycérol 30%, SDS 2%, Iodoacétamide 2,5% pendant 15 min. L'iodoacétamide alkyle les groupements thiols des protéines, évitant ainsi leur réoxydation pendant l'électrophorèse.

8.2 Deuxième dimension

Les échantillons protéiques ayant subi une première séparation selon le point isoélectrique sont soumis à une deuxième séparation, selon leur masse moléculaire, par électrophorèse en gel d'acrylamide SDS-PAGE T=14%, C=2,1%. Le SDS est un détergent anionique, qui dénature les protéines par disruption de la plupart des liaisons non-covalentes (liaison H, liaisons ioniques, interactions hydrophobes, forces de Van der Waals). Il forme des complexes chargés négativement de façon homogène et proportionnelle à la masse protéique, ce qui permet la migration 2D selon le PM uniquement.

Les bandes de gels issues de l'IEF sont déposées horizontalement au contact du gel de polyacrylamide. L'électrophorèse est réalisée sur 12 plaques simultanément, dans les conditions suivantes : 60W pendant 30 min (5 W par gel) puis 120 W pendant 6 h (10 W par gel). Après la migration, les gels sont fixés sous agitation dans une solution contenant éthanol 30%, acide phosphorique 2% pendant 1 h, puis rincés dans une solution d'acide phosphorique 2% pendant 20 min et équilibrés dans une solution d'acide phosphorique 2%, éthanol 20%, sulfate d'ammonium 15% pendant 30 min. Les gels sont ensuite colorés en ajoutant 1% de bleu de Coomassie G250 à la solution d'équilibration (v/v) et en laissant incuber pendant une nuit. L'avantage de la coloration au bleu de Coomassie réside dans la linéarité entre la quantité de protéines et l'intensité de la coloration. L'inconvénient est sa limite de détection des protéines (100 ng).

Après 3 rinçages d'une heure dans de l'eau osmosée, les gels sont scannés à 300 dpi pour l'analyse d'images, puis stockés dans une solution d'acide acétique 5% en sacs plastiques thermoscellés et conservés à 4°C.

9 Analyse d'images

Les comparaisons des protéomes 2D d'albumines-globulines et de protéines amphiphiles entre les lignées quasi-isogéniques Hard et Soft de Falcon ont été réalisées à l'aide du logiciel Progenesis SameSpots v 4.1 (Nonlinear Dynamics, UK). Pour chaque lignée, chaque stade est représenté par 6 gels, issus de 2 répétitions techniques pour chacune des 3 répétitions biologiques. Notre intérêt étant focalisé sur les différences entre Hard et Soft à chaque stade, nous avons réalisé nos analyses entre les 2 groupes de 6 gels pour chaque stade de développement. Un gel de référence est choisi, sur lequel les autres gels sont alignés en positionnant manuellement quelques dizaines de vecteurs, puis en faisant un alignement automatique. Une analyse de variance ANOVA est réalisée ($p < 0,05$) pour déterminer quels sont les spots significativement différents en termes de quantité. L'écart quantitatif existant pour un même spot dans les deux conditions (Hard et Soft) est indiqué par la valeur du 'fold', dont le seuil de significativité a été fixé à 45%, et qui est calculé sur la base des volumes normalisés entre groupes. La normalisation permet de corriger les variations expérimentales principalement d'intensité de coloration ou des variations quantitatives de l'échantillon. Pour normaliser les volumes, le logiciel calcule le volume total des spots sur chaque gel. Le gel le moins différent de tous les autres dans chaque analyse (stade de développement) est choisi comme gel de référence. Le logiciel détermine ensuite quel est le facteur de gain à utiliser pour ramener la moyenne de chaque gel à la moyenne de gel de référence. Ce facteur est ensuite appliqué à tous les spots de l'image, ce qui permet de calculer les variations quantitatives d'un même spot entre les conditions comparées (Hard vs Soft).

En fin d'analyse, une vérification visuelle des spots significativement différents est réalisée.

10 Prélèvement et préparation des spots protéiques

Le prélèvement des spots protéiques sur les gels 2D est réalisé sous hotte à flux laminaire horizontal afin d'éviter toute contamination, notamment de kératine. Les gels sont rincés à l'eau ultra-pure, puis les spots sont excisés à l'aide d'embouts de cônes de pipettes dont la pointe est découpée à la taille approximative du spot. Un même spot peut être prélevé sur plusieurs gels pour avoir une quantité de matériel suffisante pour l'analyse spectrométrique. Chaque échantillon est placé dans un tube Eppendorf « low-binding ». Le bleu de Coomassie est éliminé par des bains successifs dans du

tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM, acétonitrile 5% pendant 30 min puis 2 fois dans bicarbonate d'ammonium 25 mM, acétonitrile 50% pendant 30 min chacun. Les spots sont ensuite déshydratés par 10 min d'incubation dans de l'acétonitrile 100%, séchés et stockés à -20°C.

11 Identification des protéines par spectrométrie de masse

L'identification d'une protéine par spectrométrie de masse est obtenue grâce à une ou des empreintes de peptides la composant. En effet, la protéine doit être hydrolysée avant l'analyse dans le spectromètre de masse. Cette hydrolyse est réalisée grâce à une enzyme protéolytique séquence-spécifique. Nous avons déposé sur les spots 2D, 150 ng de trypsine porcine dans une solution de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3 , 25 mM), qui coupe la liaison amide C-terminale du résidu lysine (K) ou arginine (R), sauf s'il est suivi d'une proline(P) (encombrement stérique inhibiteur).

Après incubation une nuit à 37°C, les peptides sont extraits par ajout de 10 μl d'acétonitrile et passage aux ultra-sons pendant 10 min. Nos spots ont été identifiés en LC-MS/MS sur la composante protéomique de la plateforme d'exploration du métabolisme (PFEM) du centre INRA de de Clermont-Theix. Cette technique d'identification par analyse en spectrométrie de masse LC-MS/MS a été choisie car elle permet d'avoir une empreinte très spécifique des peptides. C'est particulièrement important lorsque l'on travaille sur des organismes dont le génome n'est que partiellement séquencé. Cela permet, le cas échéant, d'obtenir une identification de peptides par homologie de séquence avec d'autres génomes proches de celui qui nous intéresse.

L'hydrolysats de peptides obtenu après action de la trypsine sur chaque spot est séparé par nanoHPLC avant identification par spectrométrie de masse. La séparation est réalisée sur une nanoHPLC Dionex (Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Voisins le Bretonneux, France)) en utilisant une colonne capillaire C18 de diamètre interne 75 μm et de longueur 15 cm (Acclaim Pepmap, Dionex). C'est un gradient d'acétonitrile qui permet l'élution des peptides de la colonne (4 à 50% en 30 min) dans 0,5% d'acide formique à un débit de 300 nl/min.

Les peptides élués de la colonne sont ionisés par électrospray (nano ElectroSpray Ionisation (nanoESI)) et rentrent, via un tube de transfert, sous forme d'ions gazeux dans l'analyseur de type trappe linéaire du spectromètre de masse Velos LTQ (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Ce dernier est configuré pour travailler en deux "événements". En premier lieu, il détecte tous les ions de masse m/z sur la fenêtre de masse choisie (400-1400). Puis, il réalise une fragmentation par collision (CID : collision induced dissociation) des 10 ions les plus représentés dans l'étape présente. Il permet d'avoir une empreinte spécifique de chacun des 10 ions détectés à l'instant t du temps de rétention sur la colonne chromatographique. Cette empreinte de fragmentation est alors utilisée via le moteur de recherche MascotTM (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), pour

identifier l'ion et donc le peptide fragmenté à cet instant. Les fichiers de sortie sont traités en utilisant la version 1.2 de Thermo Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). L'analyse des peptides est faite sur la base des paramètres suivants : les modifications variables permises sont l'oxydation (M) et la carbamidomethylation (C), la tolérance de variation de masse peptidique est de 1,5 Da, la tolérance de variation de masse de fragment est de 0,8 Da, le nombre de clivages manqués permis est de 2. Les protéines sont identifiées par comparaison des différents peptides avec la base de données Viridiplantae de protéines non redondantes du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), combinée avec les séquences de contaminants de kératines humaines. L'identification des protéines a été validée lorsqu'elle était basée sur au moins 2 peptides avec un score d'identification Mascot™ significatif ($p < 0,01$). Lorsque les protéines ont été identifiées sur la base de seulement deux peptides, les spectres ont été vérifiés visuellement afin d'évaluer leur validité. Lorsque plusieurs protéines ont été identifiées dans le même spot, nous avons choisi celle qui présentait le meilleur score et le plus grand nombre de peptides.

Références

- Bancel, E., Rogniaux, H., Debiton, C., Chambon, C., Branlard, G. (2010) Extraction and Proteome Analysis of Starch Granule-Associated Proteins in Mature Wheat Kernel (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Proteome Research*, - **9**(- 6), 3299-3310.
- Dumas, J.B.A. (1831) Procédés de l'analyse organique. *Annal. Chem. Phys.*, **47**, 198-213.
- Giroux, M.J. and Morris, C.F. (1998) Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS*, **95**(11), 6262-6266.
- Ikeda, T.M., Ohnishi, N., Nagamine, T., Oda, S., Hisatomi, T., Yano, H. (2005) Identification of New Puroindoline Genotypes and Their Relationship to Flour Texture Among Wheat Cultivars. *Journal of Cereal Science*, **41**(1), 1-6.
- Lemelin, E., Aussenac, T., Violeau, F., Salvo, L., Lein, V. (2005) Impact of cultivar and environment on size characteristics of wheat proteins using asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Cereal Chemistry*, **82**(1), 28-33.
- Molloy, M.P. (2000) Two-Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins Using Immobilized pH Gradients. *Analytical Biochemistry*, **280**(1), 1-10.
- Nadaud, I., Girousse, C., Debiton, C., Chambon, C., Bouzidi, M.F., Martre, P., Branlard, G. (2010) Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *PROTEOMICS*, **10**(16), 2901-2910.
- Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J.-P., Sourdille, P., Balfourier, F., Le Paslier, M.-C., Chauveau, A., Cakir, M., Gandon, B., Feuillet, C. (2010) Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, **8**(2), 196-210.
- Symes, K.J. (1969) Influence of a gene causing hardness on the milling and baking quality of two wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, **20**(6), 971-979.

Résultats

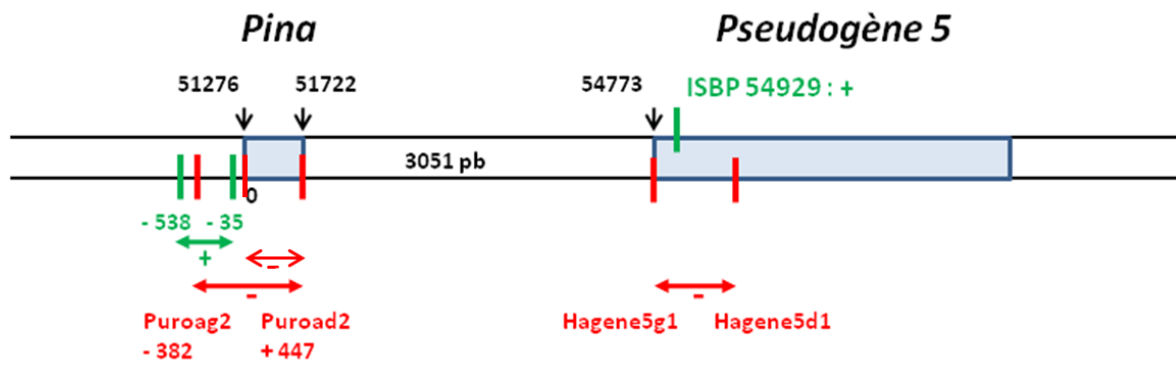


Figure 14. Position des marqueurs utilisés pour déterminer la taille de la délétion sur Falcon Hard. En vert : présence de l'amplicon, en rouge : absence de l'amplicon.

Caractérisation génomique des lignées quasi-isogéniques

1 Niveau d'isogénicité du génome

Les lignées quasi-isogéniques Hard et Soft de Falcon ont été génotypées afin de vérifier leur niveau d'isogénicité, à l'aide de 2236 marqueurs DArT répartis sur tout le génome. Huit marqueurs, parmi lesquels 7 assignés aux chromosomes 2B, 4D, 4D/7A, 5B/7B, 7A, 7A, 7D et 1 non assigné (NA), ne se sont pas hybridés sur le génome Falcon Soft, tandis que six autres marqueurs, assignés aux chromosomes 3B, 3B/7A, 4A, 6A, NA, NA, étaient absents sur le génome Falcon Hard. Au total, l'hybridation s'est révélée différentielle pour 14 marqueurs, soit 0,62%. Le niveau d'isogénicité entre les deux lignées est donc de 99,38%, valeur supérieure au niveau théorique attendu après 6 BC (99,22%).

2 Niveau d'isogénicité du locus *Ha*

Le locus *Ha* a été séquencé sur plusieurs espèces de blé et notamment sur la variété hexaploïde Renan, séquence qui nous a servi de base pour rechercher des marqueurs ISBP (Insertion Site-Based Polymorphism) et géniques.

2.1 Marqueurs ISBP

Sur les 48 couples d'amorces définis, 7 n'ont pas donné d'amplification et 41 ont donné une amplification monomorphe sur les lignées quasi-isogéniques, indiquant une identité de séquence. Aucun marqueur ne se trouvait au niveau du gène *Pina* absent dans la lignée Falcon Hard.

2.2 Marqueurs géniques

Les couples d'amorces définis sur 9 gènes connus ou hypothétiques du locus *Ha* ont tous donné des amplifications sur Falcon Soft. Sur Falcon Hard, 7 couples d'amorces sur 9 ont donné des amplicons, mais aucune amplification n'a pu être obtenue pour le gène *Pina* et le pseudo-gène 5. Ceci indique que la taille de la délétion est au moins de 3051 pb (Figure 14) puisque c'est la distance entre l'extrémité 3' de *Pina* (position *Pina* : 51276-51722) et l'extrémité 5' du pseudo-gène 5 (position 54773). En revanche, les amplifications obtenues en amont du gène *Pina* (amorces *Pina*-538g/*Pina*-35d) et en aval avec le marqueur ISBP 54929 indiquent que la délétion est inférieure à 3688 pb.

Caractérisation phénotypique des lignées quasi-isogéniques

Les données phénotypiques et biochimiques caractérisant les lignées quasi-isogéniques (LQI) Falcon Hard/Soft, pour trois années de récolte, sont regroupées ci-dessous.

1 Dureté

Ce caractère, à la base de la sélection des LQI, montre une variation annuelle (Figure 15) qui pourrait être expliquée par le mode de culture. Les échantillons de 1997 ont été cultivés au champ tandis que ceux de 2008 et 2010 ont été obtenus sous tunnel et les épis ont été ensachés, ce qui peut avoir un effet sur la température subie par l'épi et représenter un stress qui vient s'ajouter au stress subi par le grain Hard.

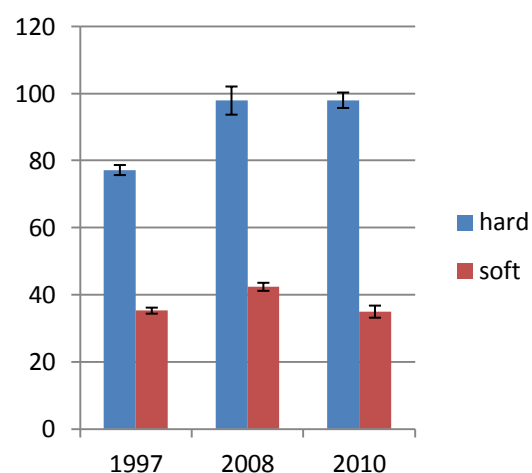


Figure 15. Dureté des LQI pour 3 années.

2 Poids de mille grains

Le poids de mille grains (PMG) est très significativement différent ($p < 0,001$) entre les LQI pour les 3 années (Figure 16). La baisse importante du poids des grains en 2010 est vraisemblablement due à l'effet des fortes températures intervenues en fin de remplissage du grain. En effet, la température maximale quotidienne a été supérieure à 35°C pendant 19 jours entre le 26 juin et le 16 juillet 2010. En moyenne, on observe sur ces trois années une diminution de 4,4 % du PMG Hard par rapport à la moyenne du PMG Soft.

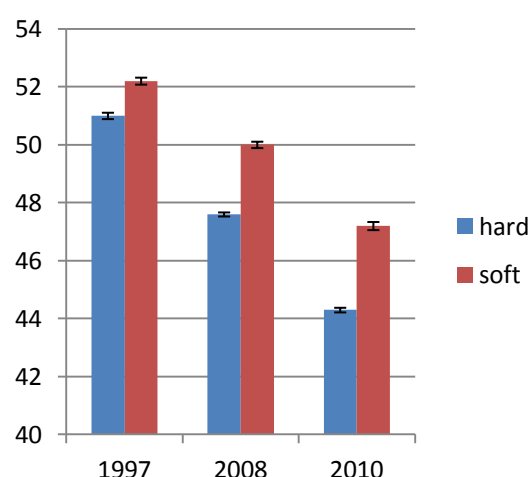


Figure 16. PMG (g) des LQI pour 3 années.

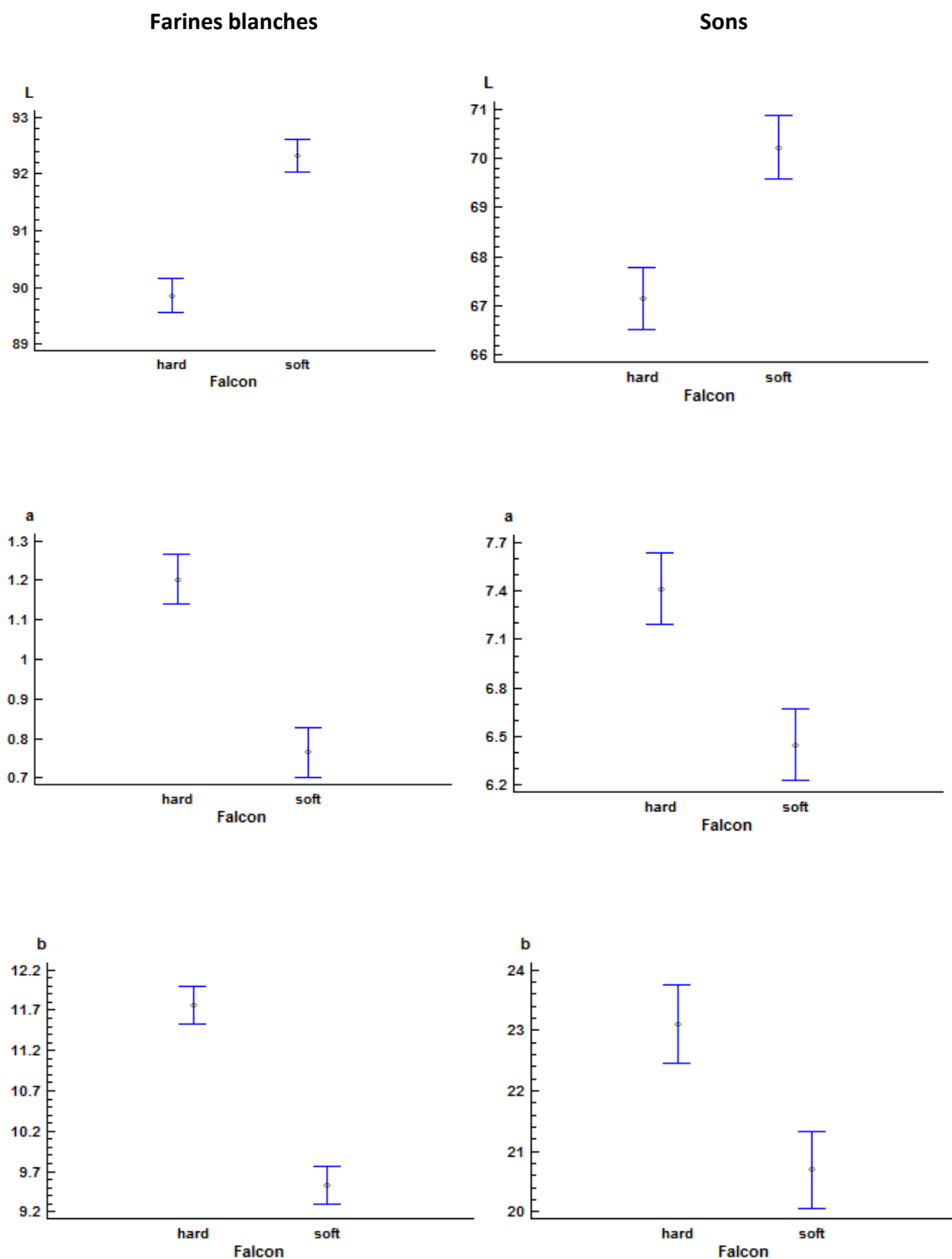


Figure 17. Analyse de variance des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* en fonction de la dureté du grain.

Indices mesurés sur les farines blanches (colonne de gauche) et les sons (colonne de droite) de grains matures de Falcon Hard et Soft. La barre verticale représente la PPDS.

3 Couleur des farines et des sons

La mesure de la couleur des farines blanches et des sons, basée sur 3 coordonnées L^* , a^* et b^* , a été obtenue par spectrorimétrie. Les valeurs de ces 3 indices sont très significativement différentes entre les grains Hard et Soft (Figure 17) sur les deux types d'échantillons. L'indice L^* qui mesure la couleur blanche est plus élevé pour les farines que pour les sons et plus fort pour les grains Soft. L'indice a^* , mesurant la couleur rouge, est en revanche plus élevé pour les grains Hard et six fois plus fort dans les sons par rapport à la farine blanche. L'indice b^* , indicateur de la couleur jaune, est également plus élevé pour les grains Hard et deux fois plus important dans les sons que dans la farine blanche. Les indices a^* et b^* sont positivement corrélés entre eux tandis que L^* est négativement corrélé avec a^* et b^* . L'analyse en composante principale (ACP) pour les farines blanches montre que le facteur 1, qui se confond avec la variable L^* , explique 92,6 % de la couleur de la farine et discrimine fortement les grains Hard et Soft (Figure 18).

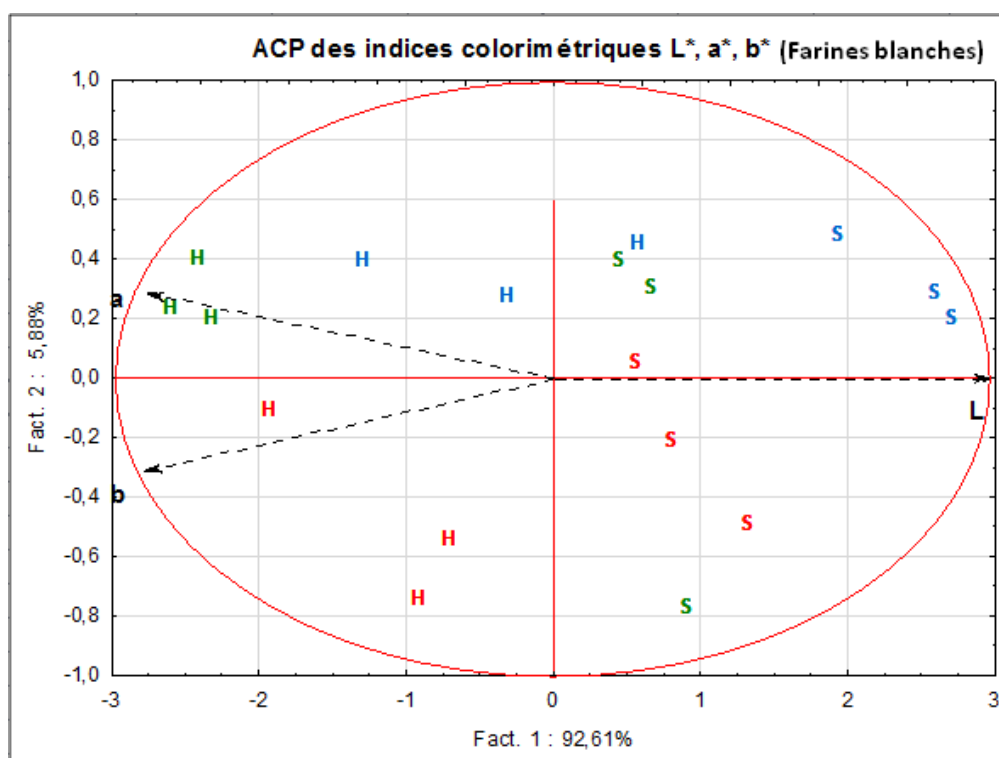


Figure 18. Analyse en composante principale (ACP) des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* pour les farines blanches de grains matures Falcon Hard (H) et Soft (S). Les années sont représentées par des couleurs différentes. Bleu : 1997, rouge : 2008, vert : 2010.

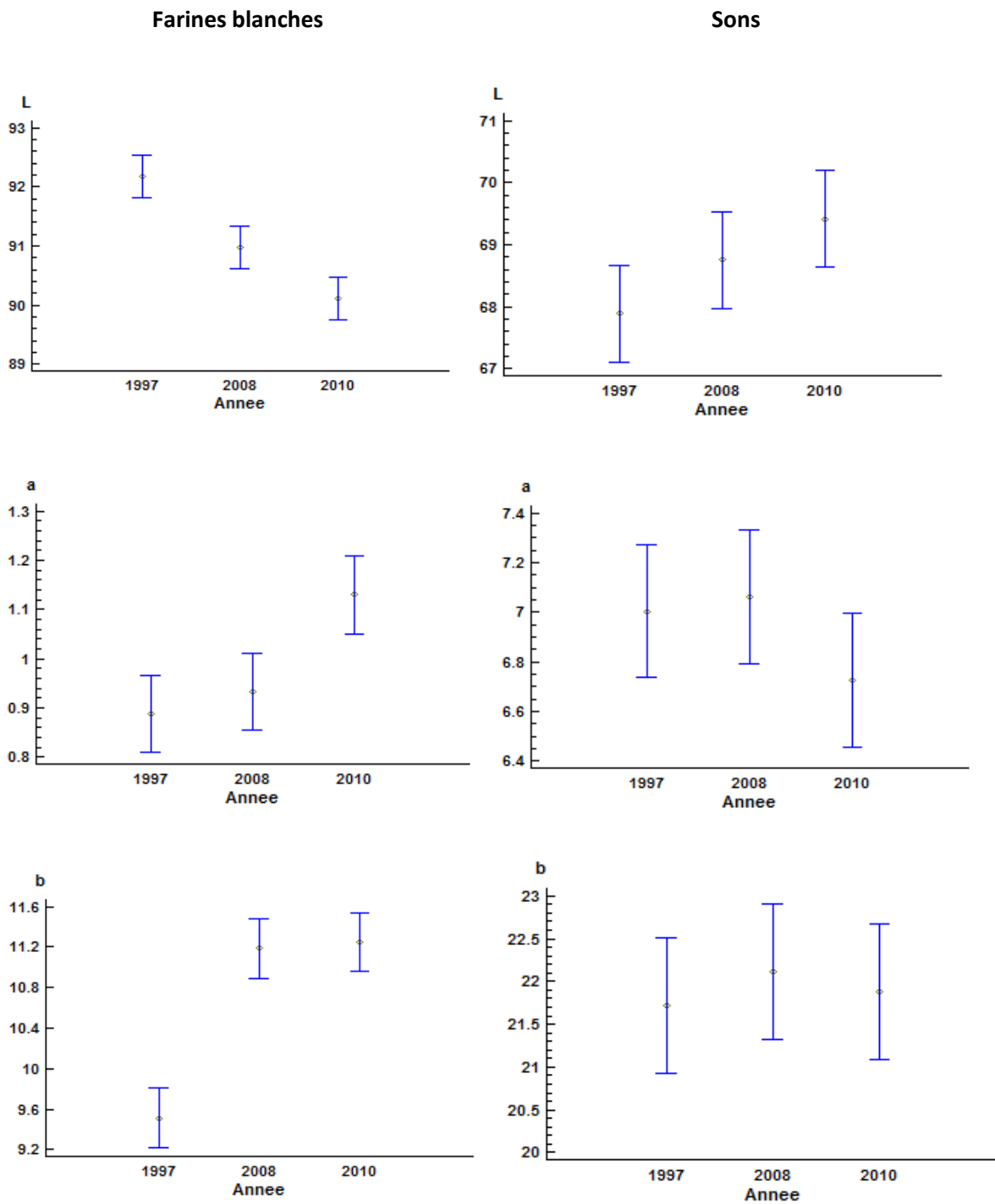


Figure 20. Analyse de variance des indices colorimétriques L^* , a^* et b^* en fonction des années. Indices mesurés sur les farines blanches (colonne de gauche) et les sons (colonne de droite) de grains matures Falcon Hard et Soft. La barre verticale représente la PPDS.

Sur l'ACP des indices colorimétriques des sons (Figure 19), le facteur 1 explique 89,2 % de la couleur des échantillons et le facteur 2 est plus important que pour la farine blanche (8,7 % contre 5,9 %).

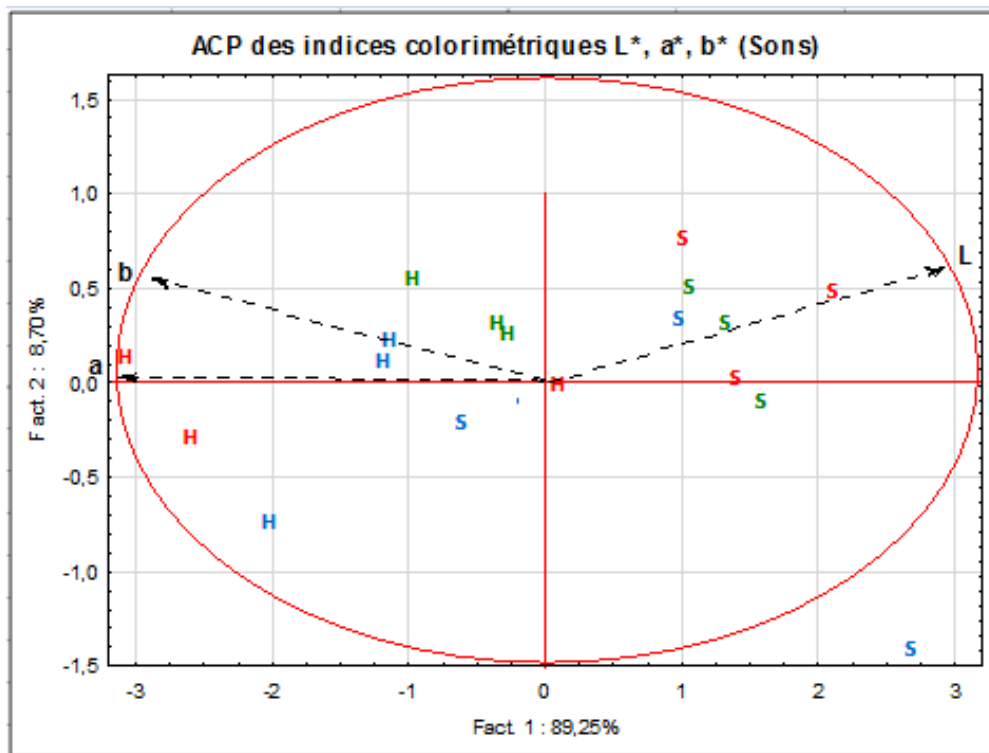


Figure 19. Analyse en composante principale (ACP) des indices colorimétriques L*, a* et b* pour les sons de grains matures Falcon Hard (H) et Soft (S). Les années sont représentées par des couleurs différentes. Bleu : 1997, rouge : 2008, vert : 2010.

Les conditions agro-climatiques induisent également un effet sur la couleur dans les échantillons de farine blanche (Figure 20, colonne de gauche), fortement significatif pour L* et b* ($p < 0.001$) et faiblement significatif pour a* ($p < 0.05$). En revanche, la couleur des sons n'est pas du tout affectée par les variations agro-climatiques (Figure 20, colonne de droite).

4 Protéines

La quantité de protéines en pourcentage de la matière sèche (MS) est significativement différente entre les lignées Hard et Soft pour les années 1997 ($p < 0,001$) et 2008 ($p < 0,01$) mais ne l'est pas pour 2010 (Figure 21). Si l'on rapporte la quantité de protéines au poids moyen des grains Hard et Soft, les différences entre les LQI ne sont plus significatives (Figure 22).

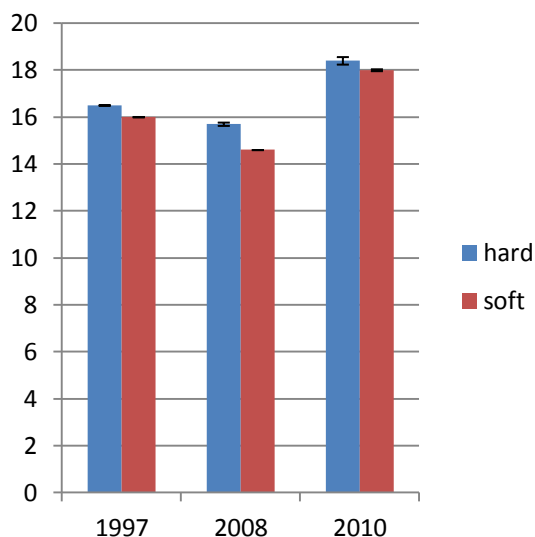


Figure 21. Protéines (% MS)

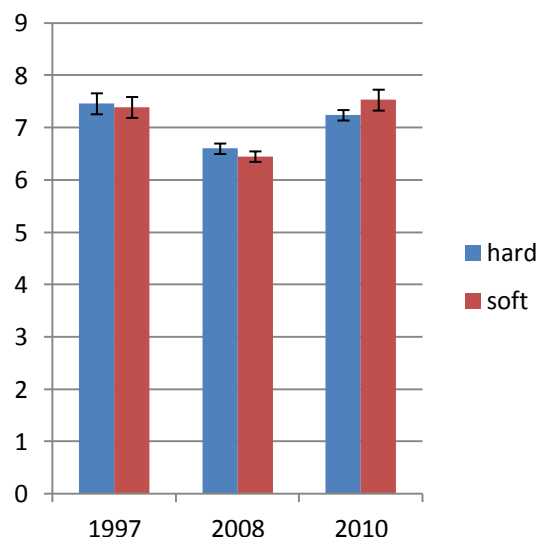


Figure 22. Quantité de protéines (mg MS/grain)

En revanche, comme nous l'avons vu dans la Table 2 de l'article 1, la masse des polymères de prolamines (Figure 23) est significativement plus élevée dans la lignée Hard que dans la lignée Soft ($p < 0,001$ pour 1997 et 2010, $p < 0,05$ pour 2008).

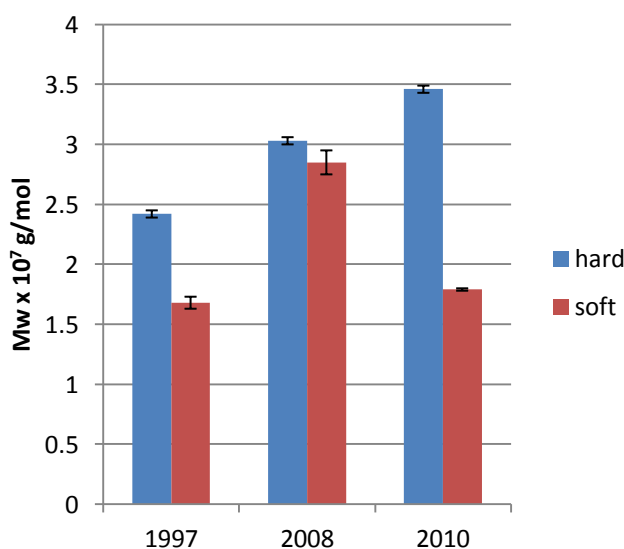


Figure 23. Masse moléculaire des prolamines

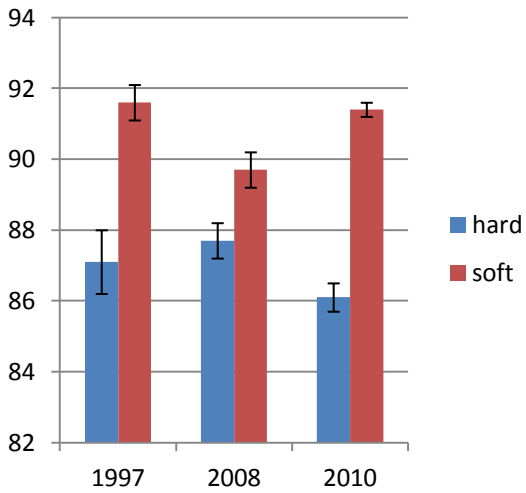


Figure 26. Pourcentage de volume occupé par les granules de type A.

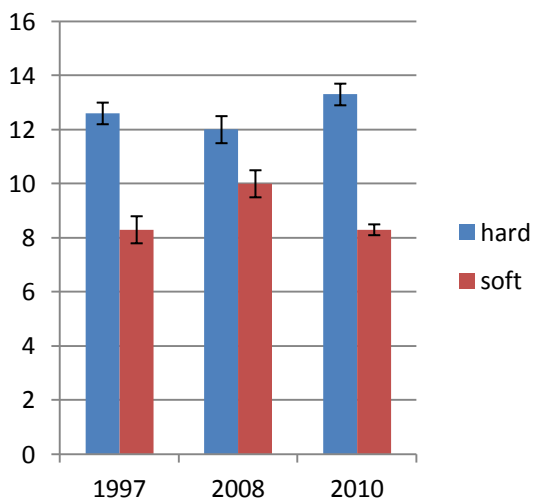


Figure 27. Pourcentage de volume occupé par les granules de type B.

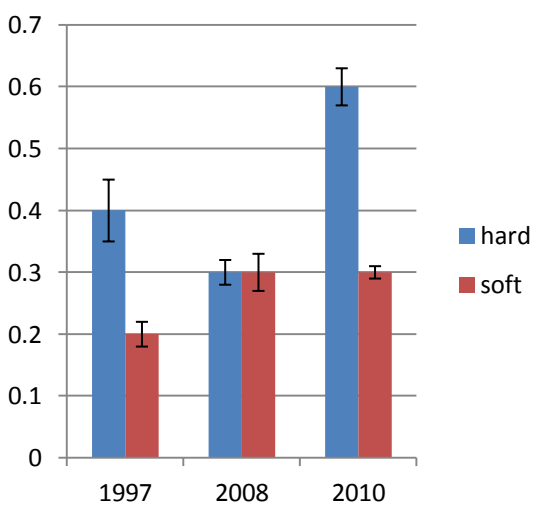


Figure 28. Pourcentage de volume occupé par les granules de type C.

5 Amidon

La quantité d'amidon exprimée en pourcentage de la matière sèche (Figure 24) est significativement plus élevée dans la lignée Hard que dans la lignée Soft. Toutefois, quand cette quantité est rapportée au poids moyen du grain (Figure 25), la significativité des différences entre les deux lignées dépend des années de culture ($p < 0,05$ pour 1997, $p < 0,01$ pour 2008 et $p > 0,05$ pour 2010).

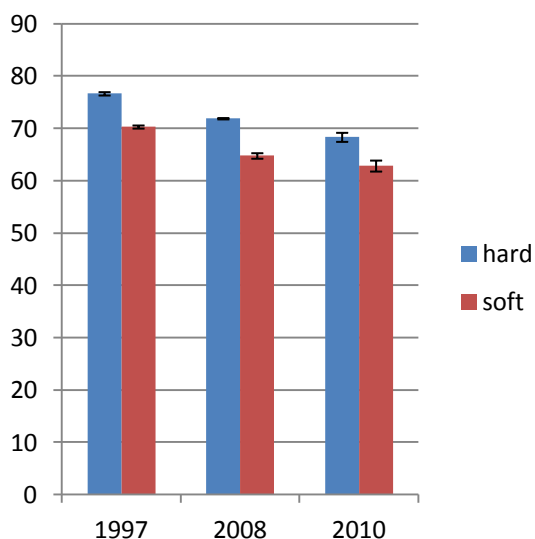


Figure 24. Quantité d'amidon (% MS)

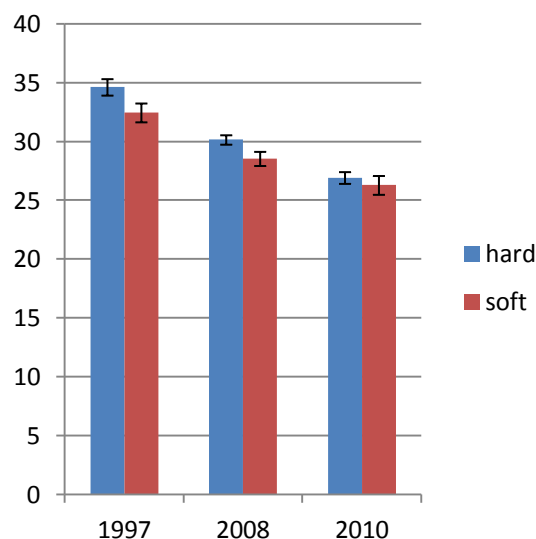


Figure 25. Quantité d'amidon (mg MS/grain)

Il semble y avoir une contradiction entre le faible PMG Hard et la quantité d'amidon plus élevée dans cette lignée, alors que la quantité de protéines est semblable dans les deux LQI. Cette contradiction est vraisemblablement due à une hydrolyse plus complète de l'amidon dans la lignée Hard, du fait de la plus grande proportion de petits granules B et C dans cette lignée (voir § 6 ci-dessous).

6 Taille des granules d'amidon

Les figures 26, 27 et 28 représentent la répartition du pourcentage de volume occupé par les granules d'amidon des types A, B et C dans les lignées quasi-isogéniques pour les trois années de culture. Le pourcentage de volume occupé par chaque type de granules est très significativement différent entre les LQI ($p < 0,001$ pour toutes les conditions, excepté pour les granules de type C en 2008 qui ne sont pas significativement différents entre Falcon Hard et Soft).

Le volume occupé par les granules A (diamètre $> 15 \mu\text{m}$) est plus grand dans la lignée Soft que dans la lignée Hard, alors que le volume occupé par les petits granules (B et C) est plus grand dans la lignée Hard.

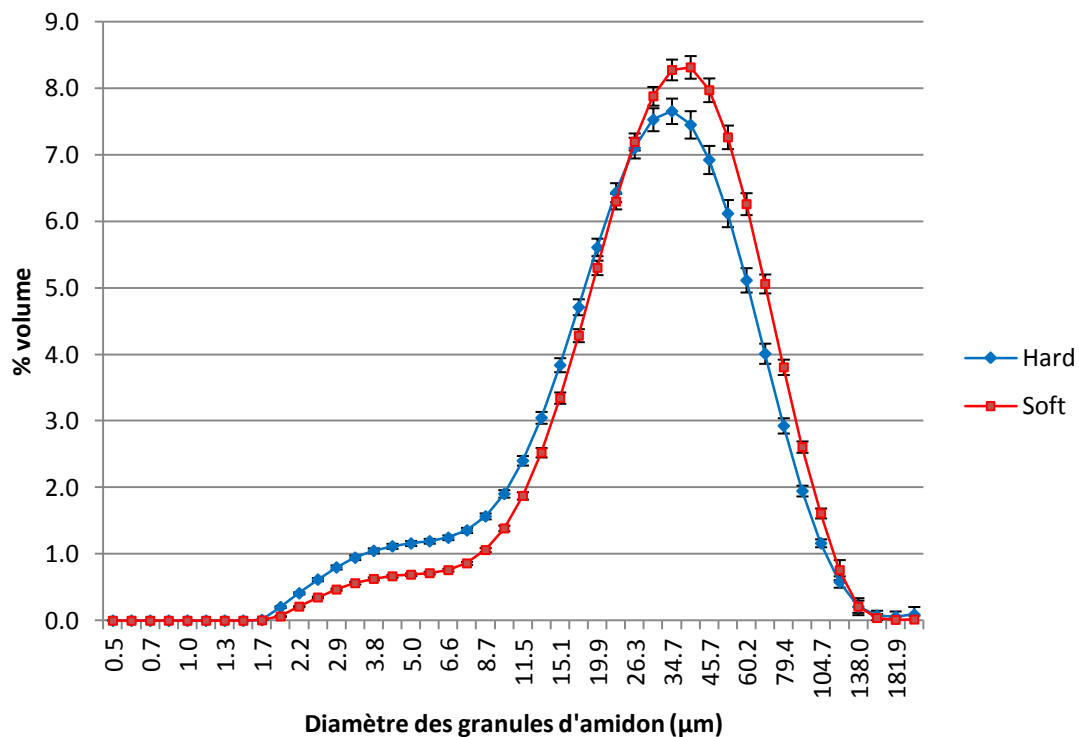


Figure 29. Pourcentage de volume par classe de diamètre des granules d'amidon (récolte 2010).

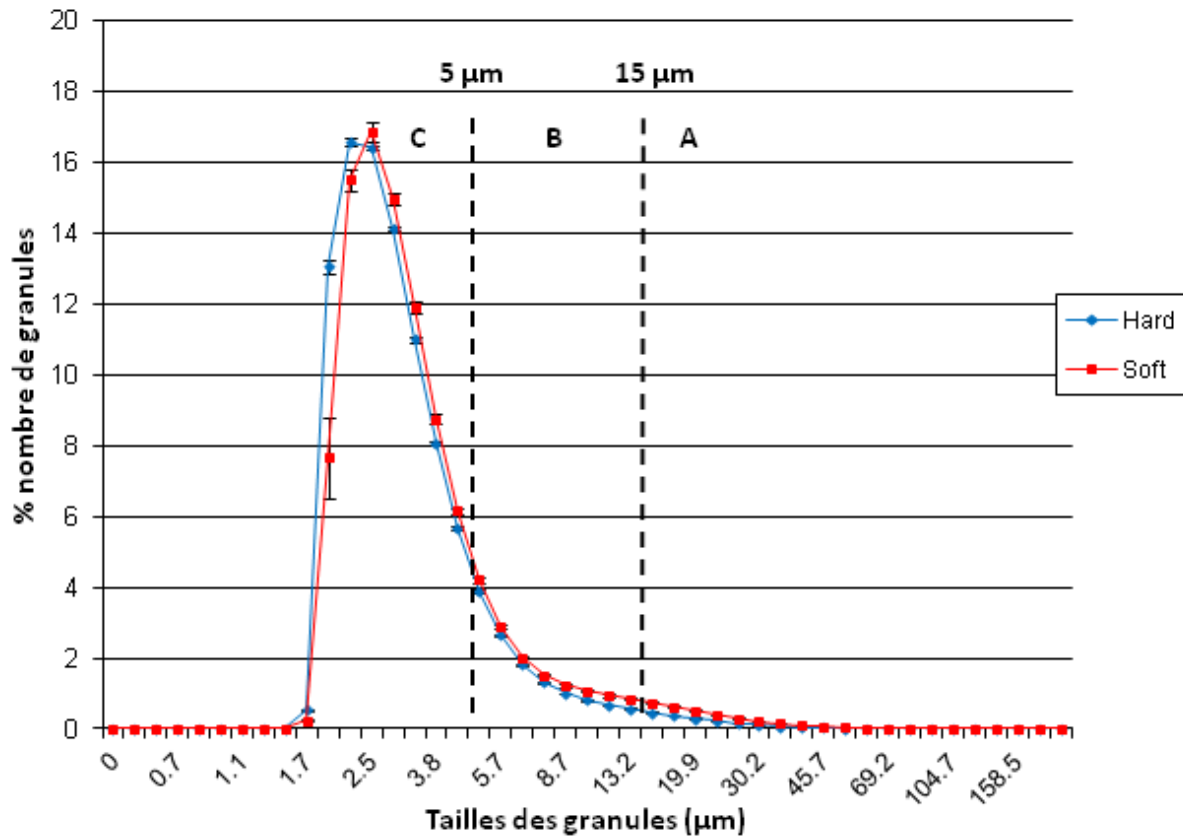


Figure 30. Distribution du pourcentage de nombre de granules d'amidon par classe de taille.

En ce qui concerne les granules de type A, ces différences de volume sont expliquées essentiellement par la taille des granules et pour une faible part par leur nombre. En effet, dans la lignée Soft, le diamètre de la classe de pourcentage de volume maximum des granules A est plus grand (39,8 μm) que dans la lignée Hard (34,7 μm) (Figure 29) et leur nombre est légèrement supérieur (Figure 30). Les granules de type B (de diamètre compris entre 5 et 15 μm) occupent un volume plus grand dans la lignée Hard (Figure 29), mais leur nombre est inférieur dans cette lignée par rapport à la lignée Soft (Figure 30). Par conséquent, le plus grand volume occupé par ces granules dans la lignée Hard est dû à leur plus grande taille. Les granules de type C (diamètre < 5 μm) occupent également un plus grand volume dans la lignée Hard mais leurs nombres relatifs varient selon les classes de tailles. Par exemple, les granules C de diamètre 1,9 μm et 2,2 μm sont plus nombreux dans la lignée Hard, mais les granules C de taille supérieure à 2,5 μm sont plus nombreux dans la lignée Soft. Le grand écart-type observé sur le point correspondant aux granules de 1,9 μm dans la lignée Soft est vraisemblablement dû à la libération progressive de petits granules, enchâssés dans les particules de farine, au cours des 50 mesures du même échantillon. Il est remarquable que, globalement, le nombre de chaque type de granules varie peu entre les deux lignées quasi-isogéniques. La plus grande différence est observée pour les granules autour de 2 μm .

Localisation des puroindolines in situ

Malgré les nombreux travaux menés sur la texture de l'albumen depuis les années 1960 et sur les puroindolines depuis leur découverte, les bases moléculaires de la relation entre la dureté de l'albumen et les puroindolines restaient inconnues. Leur découverte sur les granules d'amidon des grains à maturité, puis les observations de l'albumen en microscopie ont conduit à penser qu'elles induisaient une adhésion plus forte de la matrice protéique sur les granules.

Les travaux de localisation tissulaire des puroindolines ont toujours été conduits sur des coupes de grains matures, avec des résultats peu cohérents d'une étude à l'autre (cf bibliographie).

Selon les travaux de Capparelli et al (2005) sur des grains matures Soft, PINA et PINB ont la même localisation à la surface des granules d'amidon, sur la membrane plasmique et dans l'espace intercellulaire de l'albumen et de la couche à aleurone. De plus, les deux protéines sont plus abondantes dans la couche à aleurone que dans l'albumen, dans leur étude portant sur des variétés Hard ne contenant que l'une de ces deux protéines. Selon Dubreil et al (1998a), PINA est localisée plutôt dans l'albumen amylicé alors que PINB apparaît à la fois dans l'albumen et la couche à aleurone.

Cette incertitude sur la localisation des puroindolines ne permettant pas d'avoir une idée claire sur leur fonction putative, nous avons voulu les localiser au niveau subcellulaire au cours du développement du grain dans deux lignées quasi-isogéniques pour la dureté. Nous voulions également préciser si elles semblaient plutôt liées *in situ* à l'amidon ou aux lipides membranaires.

Les résultats de cette étude ont été publiés dans *Journal of Cereal Science* en mars 2011, dans un article intitulé: **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.**

Vol. 53 (2), p. 231-238

DOI: 10.1016/j.jcs.2011.01.002

Dans cet article, nous montrons que les puroindolines a et b ont le même routage cellulaire que les prolamines, du RE vers les corps protéiques. Elles sont en effet localisées sur la face interne des membranes vésiculaires issues du RE et dans les corps protéiques dès la fin de la mise en place des structures cellulaires de l'albumen à 180°Cj. Au cours du développement, aucun marquage n'est visible dans la couche à aleurone, le cytosol des cellules de l'albumen ni sur les membranes des amyloplastés. En fin de développement de l'albumen, les puroindolines sont majoritairement

localisées dans la matrice protéique. Le marquage sur les granules d'amidon est visible, essentiellement pour PINB, mais peu important.

De plus, nous avons mis en évidence pour la première fois une corrélation entre la dureté et la taille des polymères de protéines de réserve. Dans la farine issue de grains Hard, ces polymères ont une taille et un indice de polydispersité significativement plus élevés que dans la farine issue de grains Soft. Il semble donc que les puroindolines interagissent avec les prolamines en modifiant leur agrégation ce qui aurait une influence sur la dureté.

Références

- Capparelli, R., Amoroso, M.G., Palumbo, D., Iannaccone, M., Faleri, C., Cresti, M. (2005) Two Plant Puroindolines Colocalize in Wheat Seed and in Vitro Synergistically Fight Against Pathogens. *Plant Molecular Biology*, **58**(6), 857-867.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D.J., Broekaert, W.F., Quillien, L., 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**(2), 121-135.

Article 1 : New insight into puroindoline function

Journal of Cereal Science 53 (2011) 231–238



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cereal Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcs



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

Véronique S. Lesage^{a,*}, Brigitte Bouchet^b, Larbi Rhazi^c, Khalil Elmorjani^b, Gérard Branlard^a, Didier Marion^b

^aINRA, UMR 1095 INRA/UBP, Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales (GDEC), Domaine de Crouelle, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France

^bINRA, Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherche Biopolymères, Interactions, Assemblages, 44316, Nantes Cedex 3, France

^cInstitut Polytechnique LaSalle Beauvais, 19 rue Pierre Wagué, 60026 Beauvais, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2010

Received in revised form

7 January 2011

Accepted 8 January 2011

Keywords:

Hardness

Wheat endosperm texture

Protein bodies

Glutenin polymer

ABSTRACT

Wheat endosperm texture is correlated with one major locus, *Ha*, located on the short arm of chromosome 5D, which comprises several genes among which are two puroindoline genes, *Pina* and *Pinb*. In this study, we used two near-isogenic lines, the hard-textured line lacking *Pina* and the soft-textured line containing both *Pina* and *Pinb* wild-type genes. Hard and soft endosperms were observed at four kernel developmental stages, from 180 °Cd to 750 °Cd. Puroindolines were located within protein bodies at the onset of prolamin accumulation by transmission electron microscopy and immunolabelling. *Ab initio* modeling showed a closer structural relationship between puroindolines and 2S storage proteins from dicots than between puroindolines and other cysteine-rich wheat proteins, i.e. LTP and amylase inhibitors. Compared to the soft line, storage protein polymers in the hard line exhibited higher molecular mass (increase of from 6 to 93%) and polydispersity indices (increase of from 26 to 63%) over the course of the 4-year experiment. This suggests that puroindolines might impact the aggregation of storage proteins. Finally, these data pave the way for investigation of the role of protein–protein interactions in the texture of wheat endosperm.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Puroindolines are small (about 13 kDa), basic (*pI* 10–11), cysteine-rich (five disulphide bonds) seed-specific proteins that display an amphiphilic tryptophan-rich domain responsible for their capability of penetrating lipid membranes or oily phases *in vitro*. They share structural characteristics, i.e. a similar cysteine signature in 8 out of 10 cysteines and high helix secondary structure, with non-specific lipid transfer proteins (nsLTP), but, in contrast to the proteins in this family of ubiquitous plant proteins, they are only found in the seeds of plants from the

Triticeae and *Avenae* tribes (Doulliez et al., 2000; Morris, 2002). Their cellular location also differs from nsLTP, which are synthesized and stored in the aleurone layer (Dubreil et al., 1998), whereas puroindolines are mainly located in the starchy endosperm cells, although a possible location in the aleurone layer is under discussion (Digeon et al., 1999). Puroindolines display antimicrobial activity likely through their ability to form ion channels in biological membranes (Charnet et al., 2003) and in other cereals, their expression is related to an increase in their resistance to microbial pathogens (Krishnamurthy et al., 2001; Luo et al., 2008).

Soft kernel texture is closely associated with the presence of the two puroindoline 'wild-type' alleles, *Pina-D1a* and *Pinb-D1a*, on the short arm of chromosome 5D that co-localize with the locus carrying the most significant hardness QTL (Morris, 2002). Variable hardness of bread wheat kernel is observed in many cultivated varieties, due to the absence and/or mutations in one or two of these genes (Bhave and Morris, 2008a). The molecular basis of the relationship between these proteins and endosperm texture is still unknown. They were initially described as proteins associated with

Abbreviations: AFFF, Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation; °Cd, degree Celsius days; daa, days after anthesis; GH, grain hardness; MWD, molecular weight distribution; NILs, near-isogenic lines; NIRS, near-infrared reflectance spectrometry; PINa, puroindoline-a; PINb, puroindoline-b; PC, protein content; QTL, Quantitative Trait Loci; TEM, Transmission Electron Microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 62 40 82; fax: +33 4 73 62 44 53.

E-mail address: Veronique.Lesage@clermont.inra.fr (V.S. Lesage).

0733-5210/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jcs.2011.01.002

starch granules (Oda and Schofield, 1997) in mature kernel flour, but it has also been suggested that this location could be an artefact resulting from extraction processes (Gautier et al., 1994; Jolly et al., 1993). Stronger adhesion between starch granules and surrounding protein matrix in hard wheat was thought to be responsible for hardness and the higher number of damaged starch granules after milling (Barlow et al., 1973; Greenwell and Schofield, 1986). Puroindolines could limit the protein–starch interactions by an unknown mechanism perhaps involving their lipid binding properties. This role of puroindoline–lipid interaction in kernel texture is supported by previous results showing that hardness was also correlated with a decrease in free polar lipid contents (Morrison et al., 1989).

Although puroindolines and their impact on flour end uses have been extensively studied (Bhave and Morris, 2008a, 2008b), the biological role of these proteins is still an enigma. In the present work, we investigated the subcellular location of puroindolines in the developing hard and soft endosperms of near-isogenic wheat lines and the relationship between puroindolines and polymer size of storage proteins.

2. Materials and methods

2.1. Genetic material

Experiments were carried out on the Australian near-isogenic lines hard and soft *Triticum aestivum* L. cv Falcon, obtained by six generations of back crossing, selecting only for differences in grain hardness. Falcon hard and soft NILs have the same genetic background, and differ only in the presence or absence of the *Pina* gene. Falcon hard has a *Pina-D1b* (*Pina* null) and *Pinb-D1a* genotype (Ikeda et al., 2005). Falcon soft has a *Pina-D1a* and *Pinb-D1a* genotype (data not shown). Grain hardness values of Falcon lines grown at Clermont Ferrand in 2008 were 98 for Falcon hard and 42 for Falcon soft, assessed by NIRS (AACC method, 39-70A, 1999), from wholemeal flour ground in a Cyclotec 14,920 mill (Hilleröd, Denmark).

2.2. Culture conditions and sampling

Seeds were sown in pots in a glasshouse. After three weeks, plantlets were subjected to cold in a growth chamber for two weeks at 6 °C with an 8 h photoperiod. Plants were then grown in a plastic greenhouse in 2008 with natural photoperiod under irrigated 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 calculated and summed, allowing the expression of grain development in thermal time (°Cd). This process provides more precise information on the grain developmental stage than only recording days after anthesis. Developing caryopses were collected from the middle part of the ear at 180 °Cd, 300 °Cd, 500 °Cd and 750 °Cd corresponding in our conditions to respectively 11, 19, 32 and 44 daa (days after anthesis). These four stages correspond to the end of endosperm cellularization, fast starch accumulation, slow starch accumulation and maturity before desiccation, respectively. For each of the four developmental stages, three samples of 12 kernels (two kernels from six different plants) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –20 °C.

2.3. Determination of puroindoline content

Puroindoline content was determined by ELISA using polyclonal and specific monoclonal antibodies against PINa and PINb as previously described (Turnbull et al., 2000).

2.4. Immunolabelling and transmission electron microscopy

Samples were cut into 1 mm³ pieces with a razor blade and fixed in 0.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 4 h at 4 °C and then washed several times in phosphate buffer and deionized water. They were then subjected to dehydration, resin infiltration and polymerization as reported by Dubreil et al. (1998).

For electron microscopy, 80 nm sections were prepared using an ultramicrotome (MICROM MT-7000, Oklahoma City, USA).

PINa and PINb polyclonal antibodies have already been characterized (Dubreil et al., 1998; Turnbull et al., 2000). Wheat grain sections were collected on carbon-coated 200-mesh nickel grids. Immunogold labelling and silver enhancement were performed by floating each grid on a 50 µl droplet of solution. The grids were first floated on 3% (w/v) BSA in phosphate-buffered saline (PBS 0.1 M, pH 7.2) for 30 min at room temperature to block non-specific binding sites. The sections were incubated for 1 h at room temperature with either anti-PINa or anti-PINb rabbit polyclonal antibodies diluted 1/200 and 1/100 respectively in PBS containing 1% BSA and 0.05% Tween 20. Control sections were incubated with an anti-pealegumin serum diluted 1/100 in the same solution. The sections were washed six times for 5 min with PBS, 1% BSA, 0.05% Tween 20, and were then incubated for 1 h with a 1/20 dilution of goat anti-rabbit Nanogold (1 nm) conjugated antibody (Aurion, Biovalley, France). Sections were washed three times for 5 min each in 1% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS, and three times for 5 min each in PBS. The samples were post-fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS for 10 min at room temperature and rinsed three times in PBS and three times in deionized water. After incubation in Enhancement Conditioning (EC) solution, the size of the gold particles was amplified by silver enhancement for 40 min in darkness. The reaction was stopped by incubating the sections for 5 min in sodium thiosulfate (0.03 M in EC solution). After exchanges in EC solution and water, the samples were stained with uranyl acetate (2% in water) for 15 min in darkness. Finally, the grids were washed in deionized water, air-dried and stored.

Electron microscopy was carried out with a JEOL JEM 1230 transmission electron microscope running at 80 keV.

2.5. Structure prediction of puroindolines

Structure prediction was carried out using iterative threading assembly refinement (I-TASSER) server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). Three-dimensional (3D) atomic models were generated from multiple threading alignments of amino acid sequences and iterative structural assembly simulations (Roy et al., 2010). Protein structures were visualized with the PyMOL molecular graphics software.

2.6. Asymmetrical flow field-flow fractionation (AFFFF)

Proteins were extracted from wholemeal flour following the protocol of Lemelin (Lemelin et al., 2005) with some modifications. Briefly, flour samples (30 mg) were dispersed in 1 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 2% (w/v) SDS and incubated at 60 °C for 15 min. The extracts, containing both soluble and insoluble storage protein polymers, were sonicated for 15 s at an amplitude setting of 30% using an Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific, France). The fractionations were carried out using for the AFFFF an Eclipse3 F System (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) serially connected to a UV detector (Agilent 1200, Agilent Technologies, Germany), MALS detector (Dawn multi-angle Heleos TM, Wyatt Technology Corporation, Europe) and an

interferometric refractometer (Optilab rEX, Wyatt Technology Corporation, Europe). Absorbance was measured at $\lambda = 214$ nm. The channel had a trapezoidal geometry and a length of 286 mm. The thickness of the spacer used in this experiment was 350 μ m. The ultrafiltration membrane forming the accumulation wall was made of regenerated cellulose with a cut-off of 10 kDa (LC-10 Nadir reg.Cell, Wyatt Technology Europe Germany). An Agilent 1200 Series Isocratic HPLC Pump (Agilent Technologies, Germany) with an in-line vacuum degasser delivered the carrier flow to the channel. A 0.45 mm in-line filter (Gelman Sciences, France) was installed between the main pump and the Eclipse system. Sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.9) containing 0.1% (w/v) SDS was used as mobile phase and was filtered through a 0.1 mm membrane (Gelman Sciences, France).

For the fractionations using a gradient in the cross flow, the focus time was 0.5 min at a flow rate of 2.0 ml/min, followed by a focus/injection time of 1 min at 0.2 ml/min and a relaxation/focusing time of 0.5 min. Elution then followed at an outflow rate (Fout) of 1.0 ml/min and with a cross-flow rate (Fc) decreasing linearly from 3.0 to 0.0 ml/min for 12 min. Finally, elution at a cross-flow rate of 0.0 ml/min was maintained for 6 min.

3. Results

3.1. Puroindolines are mainly localized in endosperm protein bodies

Cellular trafficking of puroindolines was determined by immunolocalization. Figs. 1 and 2 show puroindoline immunolabelling, using polyclonal PINa and PINb antibodies, respectively, at different developmental stages of the endosperms of hard (left) and soft (right) near-isogenic Falcon lines. Immunolabelling was specifically observed within protein bodies throughout endosperm development. Puroindolines were evenly distributed within the protein bodies where storage proteins accumulate. PINa and PINb labelling of the membranes of vesicles (Fig. 3A) was also observed during the first developmental stages of the two NILs.

No labelling was observed in cytosol whatever the developmental stage. It is noteworthy that we never observed labelling of the amyloplast membranes during endosperm development (Fig. 3B). In mature dry endosperms, puroindolines were detected within the protein matrix and sometimes at the surface of starch granules. The latter localization was more frequently observed when PINb antibodies were used (Fig. 2: Mat-H and Mat-S, supplemental data 1).

Aleurone cells showed neither PINa nor PINb labelling (Supplemental data 2). Control sections incubated with anti-pealegumin serum were never labelled either (Supplemental data 2).

PINa labelling in the hard line, where *Pina* gene product is absent as shown by ELISA (Supplemental data 3), is likely due to cross-reactivity with PINb. Indeed, it was shown that these antibodies do not cross-react only at the higher dilutions used in ELISA (Turnbull et al., 2000) or Western blotting (Turnbull et al., 2003). Nevertheless, the two antisera led to the same result, i.e. puroindolines were localized within the protein bodies.

3.2. Puroindolines are structurally related to 2S storage proteins from dicots

The localization of puroindolines in the protein bodies prompted us to predict puroindoline structure by applying the recently developed iterative threading assembly refinement (I-TASSER). In the first run, we did not choose a particular template. In these conditions, the *ab initio* structure prediction

returned close structural homology between puroindolines and 2S storage proteins of dicot seeds. Indeed, the most frequently used templates were 1psy (structure of Ric3, a 2S albumin storage protein of *Ricinus communis*), 1s6d (a methionine-rich albumin from sunflower seed) and 1w2q (a 2S storage protein type of peanut seeds). The five models that were generated are closely related and the model with the best score displayed connectivities or topology of cysteine residues that corresponded to the experimentally determined links for eight cysteines (Douliez et al., 2000). Two cysteines were readily connected (Cys20/Cys55; Cys56/Cys104) and the two others (Cys11/Cys66; Cys68/Cys110) were positioned at close proximity but with a predicted distance that was slightly too long (3.05 and 3.28 Å , respectively) to allow the formation of a thermodynamically stable disulphide bond. The cysteines (Cys28/Cys48) that closed the tryptophan-rich peptide were predicted at a relatively long distance (15.42 Å , Fig. 4). Similar data were obtained for both PINa and PINb (Table 1). As expected, poor prediction of the tryptophan-rich loop was due to the absence of similar domains in the protein data bank. In the second run, we imposed the protein template, either wheat nsLTP1 (1bw0) or wheat 0.19 amylase inhibitor (1hss). In both cases, the predicted structures displayed poor C-scores (−0.10 and −0.42 respectively compared to +0.2 for 2S storage protein templates) with defects in cysteine connectivities (Table 1). The combination of *ab initio* folding and threading methods suggests that puroindolines are closely related to the structure of 2S storage proteins but not to any of the other cysteine-rich plant proteins, like plant nsLTP and amylase-protease inhibitors, in contrast with previous suggestions (Douliez et al., 2000).

3.3. Hard and soft lines exhibit different sizes of storage protein polymers

Polymer size was determined in Falcon hard and soft lines harvested in four different years. The weight (Mw) and number (Mn) of protein polymers were assessed in order to determine the polydispersity index (Mw/Mn), characterizing molecular weight distribution (MWD). Table 2 summarizes hardness, protein content (PC), and molecular weight distribution of glutenin polymer, obtained in both hard and soft NILs. Hard NILs protein molecular weights (Mw) were 6%–93% higher than the Mw of soft NILs. When compared to soft NILs, glutenin polymer polydispersity was also differentially affected, being 1.26–1.63 times more polydisperse (Mw/Mn) in hard NILs. Hard NILs are thus characterized by higher molecular weight and heterogeneity of their glutenin polymers.

4. Discussion

The present work is the first investigation of the subcellular localization of puroindolines in developing endosperm of hard-soft NILs sharing the same genetic background. In contrast to what could be expected from former observations performed at maturity, puroindolines were not observed on the surface of amyloplasts during endosperm development. This result is in agreement with amyloplast proteomics data (Dupont, 2008). Immunolocalization of both PINa and PINb during endosperm development showed that, at the onset of storage protein accumulation, these proteins were localized, as prolamins, within protein bodies. In the early stages of endosperm development, puroindolines were also observed on vesicular membranes. In dry mature endosperm, puroindolines were mainly localized in the protein matrix, as previously observed (Dubreil et al., 1998). These results suggest that puroindolines and prolamins follow the same intracellular trafficking. Moreover, as prolamins, puroindolines are seed-specific proteins, expressed only

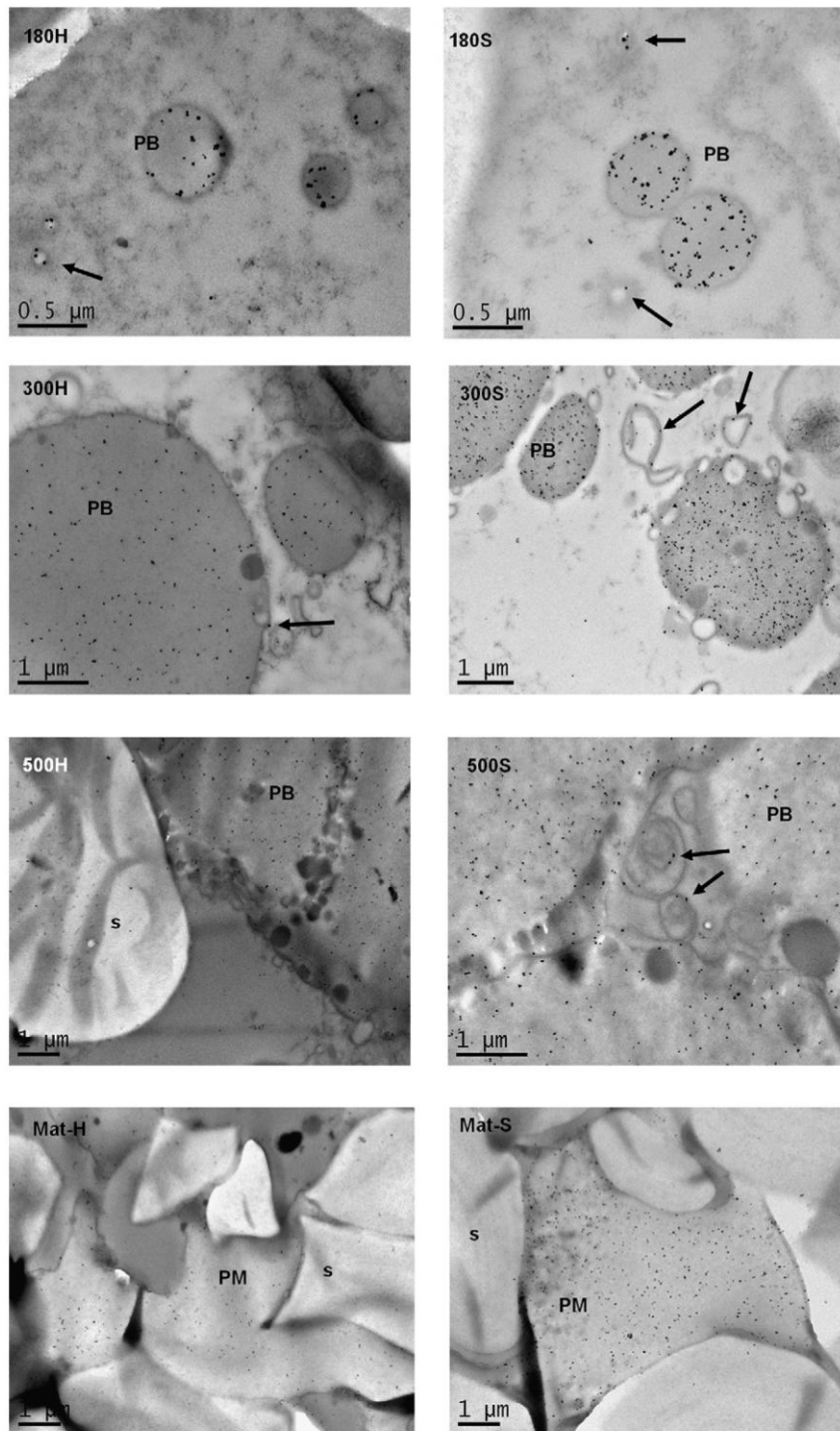


Fig. 1. PINa subcellular localization in hard (left) and soft (right) endosperm at each developmental stage (180 °Cd, 300°, 500°, Maturity). PB: Protein bodies, arrows: labelling on the membranes of vesicles, s: starch, PM: protein matrix at maturity.

during grain filling (Dubreil et al., 1998; Turnbull et al., 2000; this work) and degrade during germination (Dubreil et al., 1998). Remarkably, they represent a significant proportion of kernel dry weight and especially of kernel protein content. Indeed, PINa accounts for 0.05% of total dry weight (Dubreil et al., 1998),

i.e. the same order of magnitude as a single prolamin. Furthermore, *ab initio* and iterative threading prediction suggest very close structural relationships between puroindolines and 2S storage proteins. These relationships were not evidenced for other cysteine-rich proteins of wheat kernel, contrasting with previous

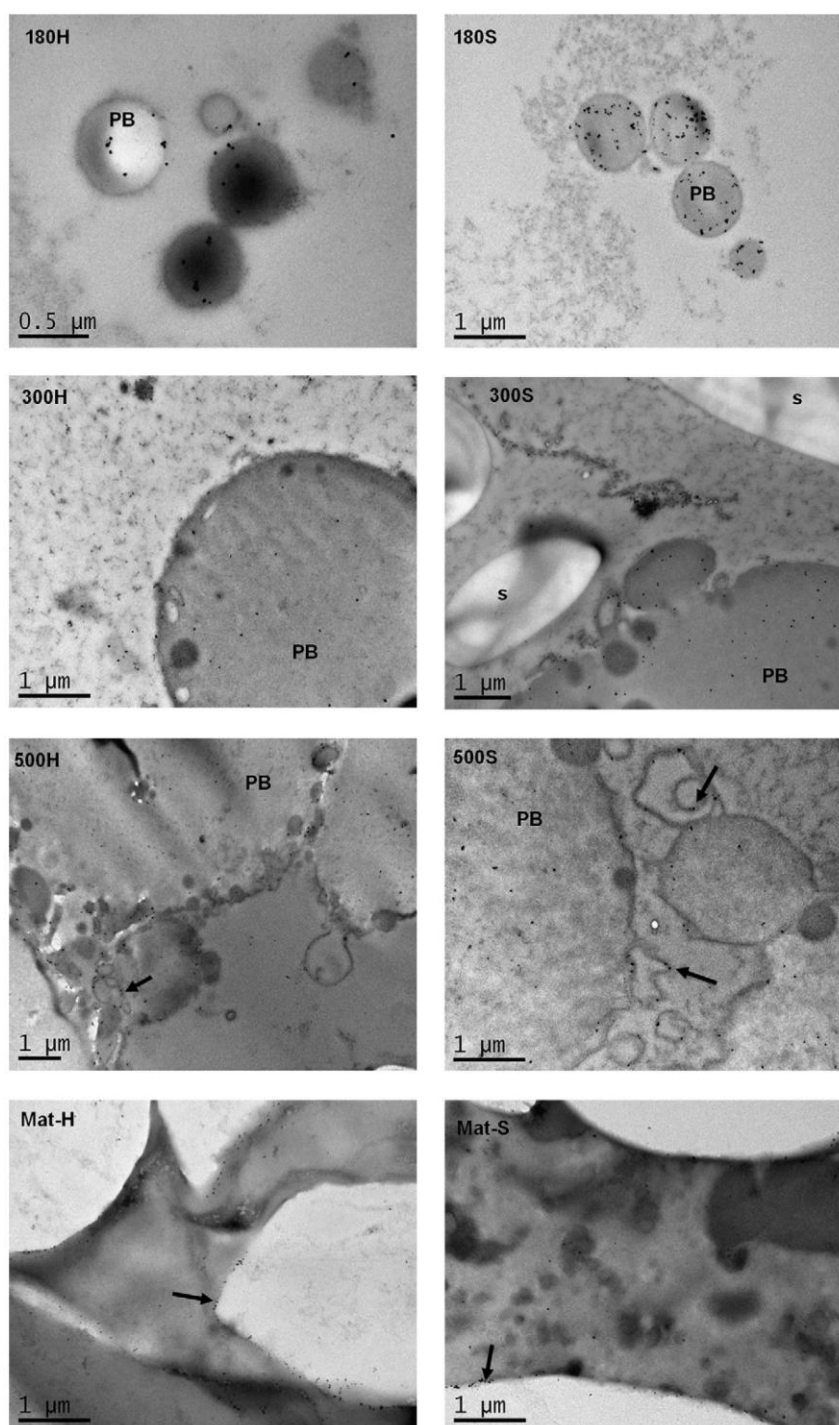


Fig. 2. PINb subcellular localization in hard (left) and soft (right) endosperm at each developmental stage (180 °Cd, 300°, 500°, Maturity). 500H, 500S: PBs and vesicular membranes labelling (arrows). At maturity, (Mat-H, Mat-S), PINb was sometimes labelled on starch granules (arrows).

hypotheses based on similar cysteine signatures and helix contents. Taken together, these results lead us to suggest that puroindolines could be 2S-like storage proteins of *Triticeae*.

The second major result of this work is the difference in the molecular weight distribution and heterogeneity of glutenin

polymers between hard and soft NILs, suggesting differential polymerization of these storage proteins between the two genotypes. Over the four years of the Falcon hard/soft trials, no relationships were found between grain hardness (GH) and protein content or polydispersity. In contrast, a significant relationship was evidenced

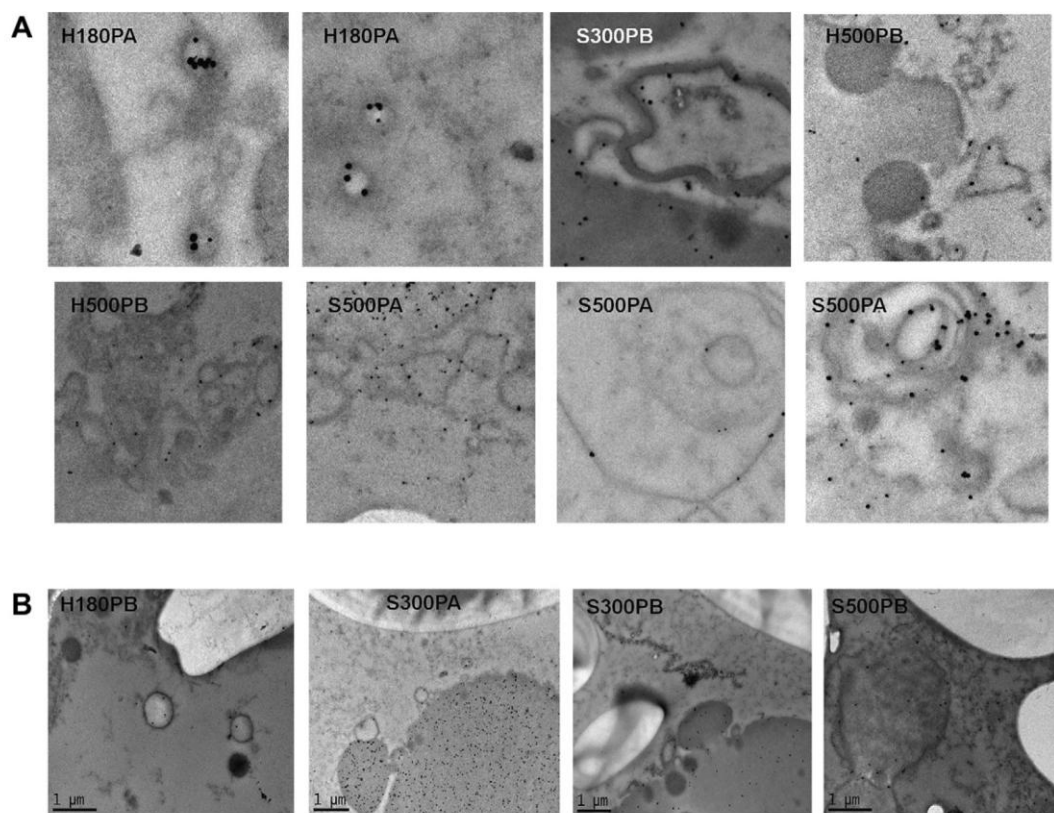


Fig. 3. Details of PIN subcellular labelling; S: soft line, H: hard line; 180, 300, 500: developmental stages in °Cd; PA: PINa labelling, PB: PINb labelling. A: Details of vesicle labelling. B: Absence of labelling on the amyloplasts at different developmental stages.

between GH and Mw ($r^2 = 60\%$, $p = 0.01$). Although these hard and soft-textured lines are not perfectly isogenic and were phenotypically selected for hardness, making the selection on other loci than *Ha* possible, it is likely that the correlation between higher storage protein polymer size and hardness is due to the absence of *Pina* in the

Ha locus. Since the hard and soft lines differ essentially in their puroindolines content, these proteins could play a role in the aggregation properties of wheat storage proteins. This relationship between hardness and storage protein polymers is supported by the findings of Li et al. (2009) who showed that, along with the major QTL

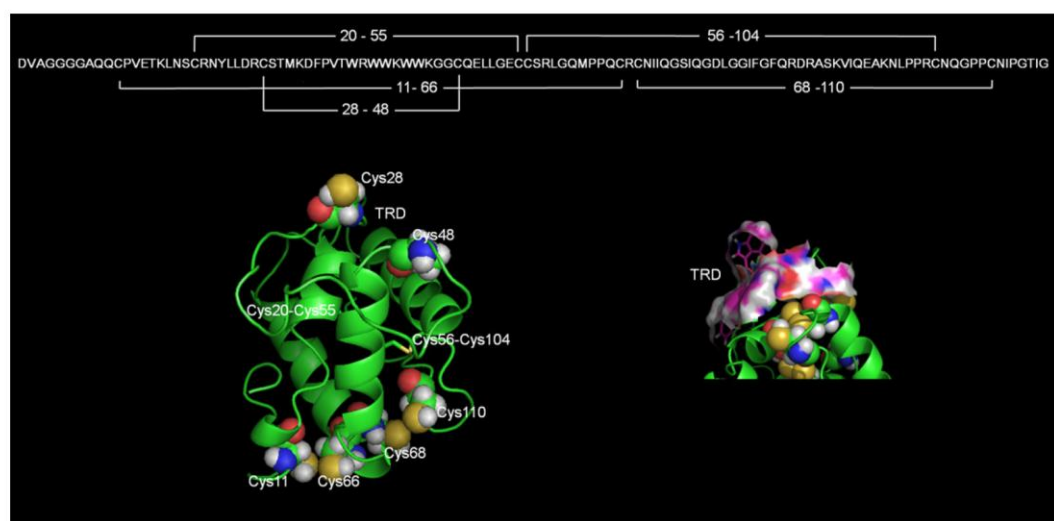


Fig. 4. PINa structure prediction using I-TASSER. Cys20/Cys55 and Cys56/Cys104 are connected; Cys11/Cys66 and Cys68/Cys110 are positioned at close proximity. The tryptophan-rich domain (TRD) is enclosed by two unconnected cysteines (Cys28, Cys48). Structural details on TRD are displayed on the right.

Table 1
Sulphur atom distances (Å) between cysteines in the models.

	PINA (<i>ab initio</i> 2S)	PINb (<i>ab initio</i> 2S)	PINA (LTP1)	PINA (AMYINH)
Cys11-Cys66(67) ^b	3.05	2.93	3.43	4.34
Cys20(21)-Cys55(56)	1.69 ^a	1.73 ^a	2.04 ^a	3.38
Cys28(29)-Cys48	15.42	15.92	10.85	12.66
Cys56(57)-Cys104(105)	2.31 ^a	3.55	2.04 ^a	3.52
Cys68(69)-Cys110(111)	3.28	2.72	8.14	11.80

Only results for model with the best C score are presented.

^a cysteine already connected in the generated model.

^b in brackets, cysteine number for PINb.

for hardness (*Ha* locus), a new one, located on chromosome arm 1BL and explaining 27.7% of hardness variation, co-located with a QTL for wet gluten content.

Like for membrane proteins, extraction of puroindolines requires the use of a non-ionic detergent and the puroindolines are recovered in the detergent-rich phase on TX-114 phase partitioning (Blochet et al., 1993). This suggested that puroindolines interacted with endosperm lipids, a hypothesis that was strengthened by their *in vitro* lipid and membrane binding properties (Kooijman et al., 1998; Le Guerneve et al., 1998; Wilde et al., 1993). However, after extraction, in absence of detergents, puroindolines are fairly water-soluble, a behaviour that distinguishes them from membrane proteins. The present work suggests that puroindolines may also interact with prolamins owing to their common localization and their relationship with polymer size, explaining the need for a detergent to extract these proteins from endosperm wheat flour. In full agreement with such an interaction, storage proteins, essentially γ -gliadins, have been extracted in non-ionic detergents with puroindolines (Blochet et al., 1990; personal observation).

Actually, the SH3 and WW domains involved in protein–protein interactions specifically recognize proline-rich modules through their aromatic residues (Macias et al., 2002). Other proteins or modules containing aromatic-rich pockets (tryptophan, tyrosine, phenylalanine) can form strong complexes with proline-rich peptides (Kay et al., 2000). In this work, structure modeling showed that the puroindoline tryptophan-rich domain is well exposed at the surface of the protein in agreement with previous fluorescence studies (Le Guerneve et al., 1998). Therefore, a putative interaction between the proline-rich domains of prolamins and the tryptophan-rich domain of both PINa and PINb can be reasonably hypothesized.

Table 2
Storage protein polymer mass and size in Falcon NILs endosperms assessed by AFFFF for 4 harvest years.

		1996	1997	2008	2010
Mw	Soft	1.85 ± 0.02	1.68 ± 0.05	2.85 ± 0.1	1.79 ± 0.01
	Hard	2.52 ± 0.03	2.42 ± 0.03	3.03 ± 0.03	3.46 ± 0.03
	Variation %	36	44	06	93
Mw/Mn	Soft	11.78 ± 0.23	12.73 ± 0.25	14.08 ± 0.33	22.67 ± 0.18
	Hard	15.15 ± 0.31	20.71 ± 0.34	18.47 ± 0.35	28.47 ± 0.2
	Variation %	28	63	31	26
Hardness	Soft	44.5	35.3	42.4	35
	Hard	60.5	77.2	97.9	98
PC	Soft	17.6 ± 0.06	16.0 ± 0.01	14.6 ± 0.0	18.0 ± 0.04
	Hard	16.8 ± 0.05	16.5 ± 0.02	15.7 ± 0.07	18.4 ± 0.16

Mw: polymer mass (10⁷ g/mol), Mw/Mn: polydispersity index, Variation: % variation between hard and soft lines. Hardness: NIRS values. PC: protein content (mean and standard deviation from two samples) in % of dry matter.

5. Conclusion

We demonstrated that both puroindolines (a and b) display the same trafficking properties as prolamins with a translocation from the ER to protein bodies. Based on protein structure modeling, puroindolines are unambiguously structurally related to 2S storage proteins of dicot seeds. Using AFFFF, absence of PINa was correlated to higher storage protein polymer size. This result is the first report of a correlation between endosperm texture and storage protein aggregation level. Taken together, these results open new perspectives for the identification of the biological functions of puroindoline. They could be storage proteins themselves or at least prolamins-interacting proteins impacting both polymer size and endosperm texture.

Acknowledgments

We are grateful to Marie Claire Debote for growing plants, to Nathalie Geneix for assistance in specimen sections and puroindoline quantification and to Nicolas Guilhot for assistance in image shaping. This work was supported by grants from INRA. Plants were produced thanks to experimental facilities of GDEC Unit, INRA Clermont-Ferrand, France. Microscopy experiments were performed using the facilities of the Biopolymers, Structural Biology platform, INRA Nantes, France.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jcs.2011.01.002.

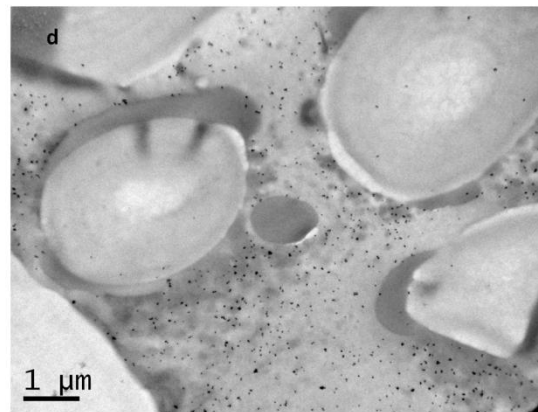
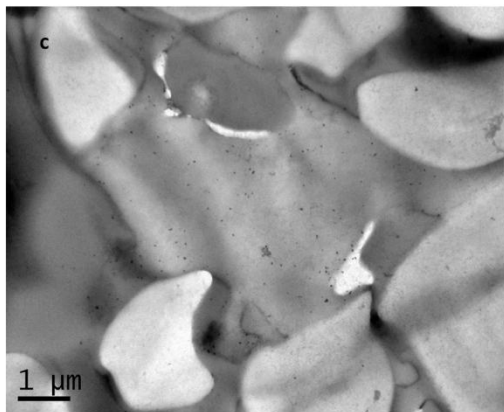
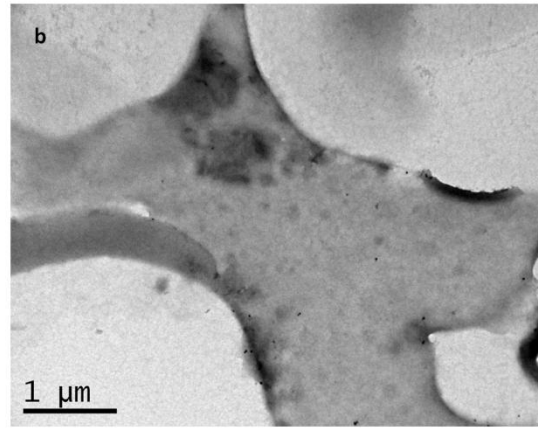
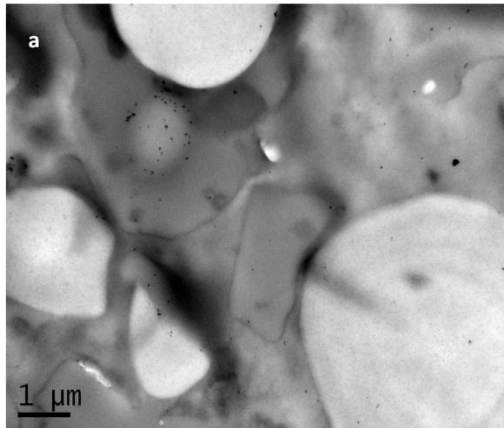
References

- AACC, 1999. Method 39-70A. Wheat Hardness Determined by Near Infrared Reflectance. AACC, St Paul, MN, USA, pp. 1–3.
- Barlow, K.K., Buttrose, M.S., Simmonds, D.H., Vesk, M., 1973. The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry* 50, 443–454.
- Bhave, M., Morris, C., 2008a. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology* 66, 205–219.
- Bhave, M., Morris, C., 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., Kaboulou, A., Compoin, J.-P., Marion, D., 1990. Amphiphilic proteins from wheat flour: specific extraction, structure and lipid binding properties. In: Bushuk, W., Tkachuk, R. (Eds.), *Gluten Proteins*. American Association of Cereal Chemists, St-Paul, USA, pp. 314–325.
- Blochet, J.-E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.-F., Joudrier, P., Pézolet, M., 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 Letters* 329, 336–340.
- Charnet, P., Molle, G., Marion, D., Rousset, M., Lullien-Pellerin, V., 2003. Puroindolines form ion channels in biological membranes. *Biophysical Journal* 84, 2416–2426.
- Digeon, J.F., Guiderdoni, E., Alary, R., Michaux-Ferrière, N., Joudrier, P., Gautier, M.F., 1999. Cloning of a wheat puroindoline gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. *Plant Molecular Biology* 39, 1101–1112.
- Doulliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D., 2000. Mini Review: structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and Indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels*1, *2. *Journal of Cereal Science* 32, 1–20.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D.J., Broekaert, W.F., Quillien, L., 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.
- Dupont, F.M., 17 April 2008. Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics. *BMC Plant Biology* 8.
- Gautier, M.F., Aleman, M.E., Guirao, A., Marion, D., 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.
- Greenwell, P., Schofield, J.D., 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry* 63, 379–380.

- Ikeda, T.M., Ohnishi, N., Nagamine, T., Oda, S., Hisatomi, T., Yano, H., 2005. Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars. *Journal of Cereal Science* 41, 1–6.
- Jolly, C.J., Rahman, S., Kortt, A.A., Higgins, 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. *Theoretical and Applied Genetics* 86, 589–597.
- Kay, B.K., Williamson, M.P., Sudol, M., 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *The FASEB Journal* 14, 231–241.
- Kooijman, M., Orsel, R., Hamer, R.J., Bekkers, A., 1998. The insertion behaviour of wheat Puroindoline-a into Diacylgalactosylglycerol films. *Journal of Cereal Science* 28, 43–51.
- Krishnamurthy, K., Balconi, C., Sherwood, J.E., Giroux, M.J., 2001. Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14, 1255–1260.
- Le Guerneve, C., Seigneuret, M., Marion, D., 1998. Interaction of the wheat endosperm lipid-binding protein puroindoline-a with phospholipids*1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 360, 179–186.
- Lemelin, E., Aussenac, T., Violeau, F., Salvo, L., Lein, V., 2005. Impact of cultivar and environment on size characteristics of wheat proteins using asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Cereal Chemistry* 82, 28–33.
- Li, Y., Song, Y., Zhou, R., Branlard, G., Jia, J., 2009. Detection of QTLs for bread-making quality in wheat using a recombinant inbred line population. *Plant Breeding* 128, 235–243.
- Luo, L., Zhang, J.R., Yang, G.X., Li, Y., Li, K.X., He, G.Y., 2008. Expression of puroindoline a enhances leaf rust resistance in transgenic tetraploid wheat. *Molecular Biology Reports* 35, 195–200.
- Macias, M.J., Wiesner, S., Sudol, M., 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands: protein domains. *FEBS Letters* 513, 30–37.
- Morris, C.F., 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology* 48, 633–647.
- Morrison, W.R., Law, C.N., Wylie, L.J., Coventry, A.M., Seekings, J., 1989. The effect of group 5 chromosomes on the free polar lipids and breadmaking quality of wheat. *Journal of Cereal Science* 9, 41–51.
- Oda, S., Schofield, J.D., 1997. Characterisation of Friabilin polypeptides. *Journal of Cereal Science* 26, 29–36.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5, 725–738.
- Turnbull, K.M., Gaborit, T., Marion, D., Rahman, S., 2000. Variation in Puroindoline polypeptides in Australian wheat cultivars in relation to grain hardness. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 153–158.
- Turnbull, K.M., Marion, D., Gaborit, T., Appels, R., Rahman, S., 2003. Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta* 216, 699–706.
- Wilde, P.J., Clark, D.C., Marion, D., 1993. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1570–1576.

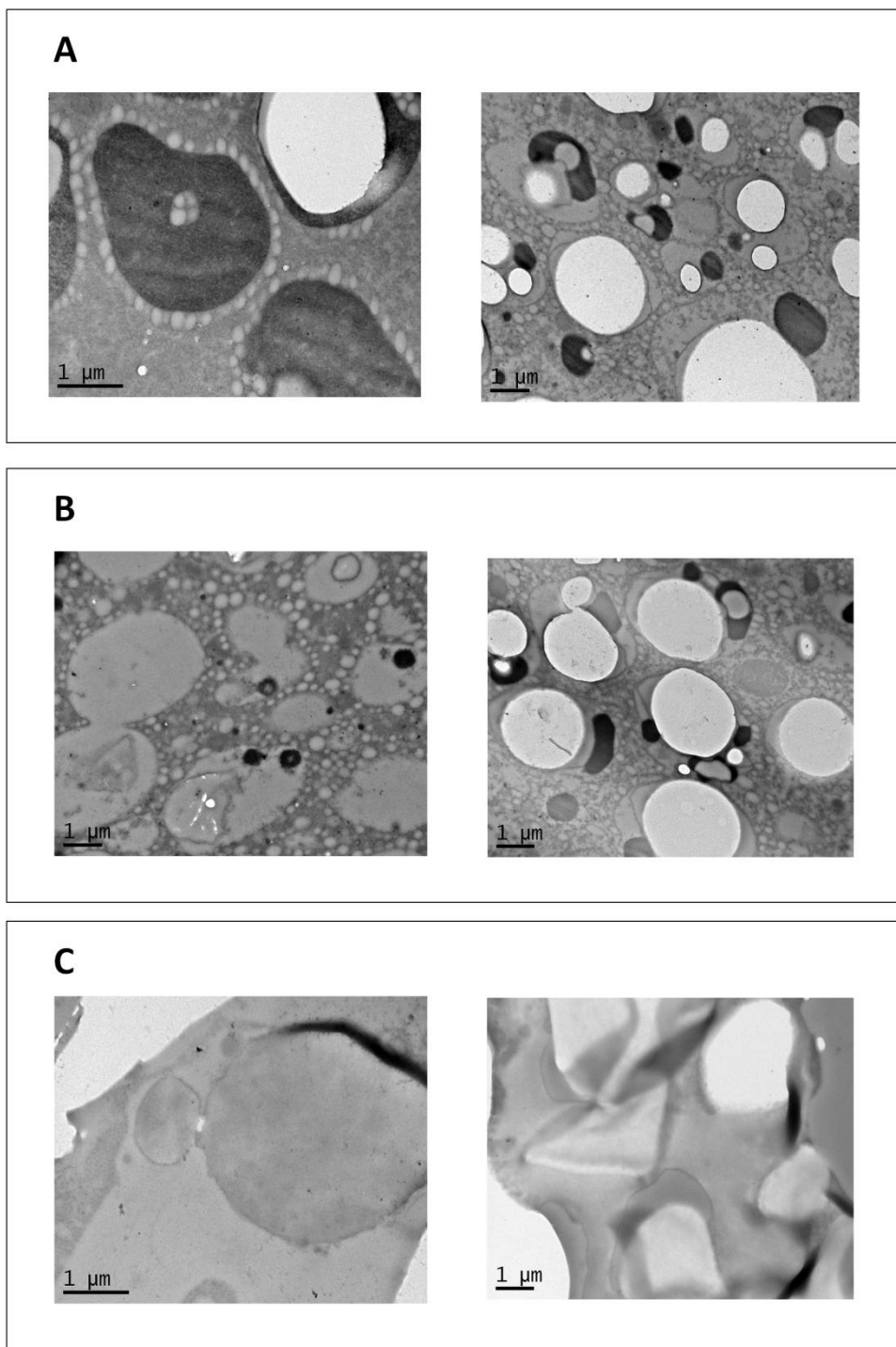
Supplemental data 1

No PIN labelling of starch granules at maturity, (a) no PINb labelling of starch granules in hard line, (b) no PINb labelling of starch granules in soft line, (c) no PINa labelling of starch granules in hard line, (d) no PINa labelling of starch granules in soft line



Supplemental data 2

No labelling in the aleurone layer or control sections. A: No PINa labelling of the aleurone layer of the hard line at maturity (left) or soft line at 500 °Cd (right). B: No PINb labelling of the aleurone layer of the hard line (left) or soft line (right) at 500 °Cd. C: No labelling of endosperms of control sections incubated with pea-legumin antiserum in the hard line at 500 °Cd (left) or in the soft line at maturity (right).



Supplemental data 3

Puroindoline content (mg/100 g freeze-dried germ-free kernel) during grain development.

	Falcon Soft		Falcon Hard	
	PINA	PINB	PINA	PINB
180	5.2±2.1*	0.6±0.1	0.1±0.1	0.6±0.2
300	28.3±2.2	11.7±0.8	0.2±0.1	5.4±0.4
500	43.0±2.5	19.8±0.9	0.4±0.2	10.5±0.3
750	54.1±3.8	24.3±1.1	0.5±0.2	12.7±0.5

*Mean/standard deviation from two samples.

Analyse protéomique du grain en développement

Afin de comprendre comment la physiologie des cellules de l'albumen est modifiée en l'absence de la puroindoline-a, nous avons entrepris la comparaison des protéomes métaboliques et structuraux des mêmes lignées quasi-isogéniques, aux mêmes quatre stades de développement du grain. Nous avons analysé les variations des albumines-globulines, protéines du métabolisme cellulaire, et des protéines amphiphiles dans des extraits protéiques de grains entiers. Les résultats de ce travail font l'objet d'un article, accepté pour publication dans *Journal of Experimental Botany*, reproduit ci-après. Ils donnent des réponses sur la façon dont l'absence de la puroindoline-a pourrait modifier la matrice protéique de l'albumen en jouant sur l'agrégation des protéines de réserve.

En effet, nos résultats montrent que les protéines impliquées dans le repliement des protéines néosynthétisées (folding) et dans le stress cellulaire sont surexprimées dans la lignée Hard par rapport à la lignée Soft, dès la fin de la cellularisation de l'albumen, tandis que la traduction est réprimée. Ceci suggère la mise en place précoce dans cette lignée d'un mécanisme de réponse au stress tel que l'UPR (Unfolded Protein Response) pouvant ainsi conduire à l'accélération de la mort cellulaire programmée dans la lignée Hard.

Cette hypothèse est corroborée par nos observations en MET sur l'ultrastructure de l'albumen qui montrent un raccourcissement de la cinétique de développement du grain dans la lignée Hard.

La puroindoline-a semble donc présenter une fonction cellulaire de type chaperone permettant le repliement correct ou évitant la polymérisation/agrégation précoce des protéines de réserve néosynthétisées entrant dans le RE. En son absence, le ratio entre la charge en protéines et la machinerie de folding du RE serait déséquilibré, altérant la capacité de repliement des monomères et conduisant ainsi à l'agrégation des protéines de réserve dans le RE. Cette hypothèse est cohérente avec les observations que nous avons faites sur la taille des polymères de protéines de réserve qui sont significativement plus élevées dans la lignée Hard (cf publication 1).

Ce travail représente la première étude protéomique de lignées quasi-isogéniques pour la dureté sur du grain en développement. Elle remet en question la vision communément admise du rôle des puroindolines dans la défense contre les agents pathogènes, qui apparaît plutôt comme un effet secondaire dû à leurs propriétés de liaison aux lipides. A l'issue de ce travail, il semble que les puroindolines fassent partie de la machinerie de repliement des protéines de réserve et cela ouvre de nouvelles voies de recherche sur la formation de la matrice protéique de l'albumen du grain de blé.

Article 2 : Proteomes reveal amplification of a stress response in the Hard line

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

Véronique S. Lesage, Marielle Merlino, Christophe Chambon, Brigitte Bouchet, Didier Marion, Gérard Branlard.

^a INRA UMR 1095 INRA/UBP, Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales (GDEC), Domaine de Crouelle, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand, France

^b INRA UR-370 PFEM-Plateau Protéomique, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^c INRA UR Biopolymères, Interactions, Assemblages, 44316, Nantes Cedex 3, France

* Corresponding author.

Email address: Veronique.Lesage@clermont.inra.fr

Tel.: +33 4 73 62 40 82, Fax: +33 4 73 62 44 53

Short title: Puroindolines effects on wheat kernel proteomes in hard/soft NILs

Numbers of tables: 2

Numbers of figures: 5

Publié par *Journal of Experimental Botany*.

doi: [10.1093/jxb/err330](https://doi.org/10.1093/jxb/err330)

Publication en ligne : 11 Novembre 2011

Abstract

Wheat kernel texture, a major trait determining the end-use quality of wheat flour, is mainly influenced by puroindolines. These small basic proteins display *in vitro* lipid binding and antimicrobial properties, but their cellular functions during grain development remain unknown. To gain insight into their biological function, we performed a comparative proteome analysis of two near-isogenic lines (NILs) of bread wheat *Triticum aestivum* L. cv Falcon differing in the presence or absence of the puroindoline-a gene (*Pina*) and kernel hardness. Proteomes of the two NILs were compared at four developmental stages of the grain for the metabolic albumin/globulin fraction and the Triton-extracted amphiphilic fraction. Proteome variations showed that during grain development folding proteins and stress-related proteins were more abundant in the hard line compared to the soft one. These results, taken together with ultrastructural observations showing that the formation of protein matrix occurred earlier in the hard line, suggested that a stress response, possibly the unfolded protein response, is induced earlier in the hard NIL than in the soft one leading to earlier endosperm cell death. Quantification of albumin-globulin fraction and amphiphilic proteins at each developmental stage strengthened this hypothesis as a plateau was revealed from the 500°Cd stage in the hard NIL whereas synthesis continued in the soft one. These results open new avenues concerning the function of puroindolines which could be involved in the storage protein folding machinery, affecting consequently the development of wheat endosperm and the formation of the protein matrix.

Keywords

Endosperm texture, grain hardness, near-isogenic lines, oxidative stress, puroindolines, seed development, grain softness, unfolded protein response

Introduction

Kernel hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), a staple food source for humans, is a major grain quality trait as it determines the physical properties and hence the end-uses of flour. Flour obtained from hard-textured grains is more suitable for bread-making, whereas soft grain flour is better for making pastry and biscuits. Grain hardness is defined by the resistance of kernels to crushing or by the particle size distribution of ground grain. The trait is associated to a major QTL located on the short arm of chromosome 5D, where the genes encoding puroindoline-a (PINA) and puroindoline-b (PINB) co-localize with the hardness (*Ha*) locus. A deletion or mutation in either *Pina* or *Pinb* has been linked to hard kernel texture in wheat (Bhave and Morris, 2008). PINA and PINB are low-molecular-weight (about 13 kDa) cationic proteins (Blochet et al., 1993) whose folded helicoidal structure is stabilized by five disulfide bonds. Some other plant proteins have similar structural

characteristics like amylase/protease inhibitors, 2S storage proteins and lipid transfer proteins (Douliez et al., 2000). The most distinctive feature of puroindolines is a tryptophan-rich domain (TRD), comprising 5 and 3 tryptophan residues in PINA and PINB, respectively (Gautier et al., 1994). The TRD is involved in lipid binding and destabilization of biological membranes, which gives these proteins their antimicrobial properties (Charnet et al., 2003; Jing et al., 2003).

Puroindolines are specifically expressed in the caryopsis of plants from the *Triticeae* and *Avenae* tribes (Douliez et al., 2000). They start to accumulate from 8-12 days after anthesis (DAA), increasing rapidly until 15-18 DAA to reach a maximum around 26-33 DAA (Gautier et al., 1994; Turnbull et al., 2003). Recently, we showed that puroindolines and storage proteins followed the same route within the grain, moving from protein bodies to the storage vacuole to become finally embedded in the protein matrix at the end of endosperm development (Lesage et al., 2011). We also showed that puroindolines influence storage protein polymer size and polydispersity.

Although numerous reports describe the influence of puroindolines on the technological end-uses of flour, their antimicrobial activities and the genetic bases of hardness, their biological functions during cereal grain development are still not understood. To gain an insight into the cellular function of puroindolines, we analyzed the metabolic and amphiphilic proteomes of developing wheat grains of two near-isogenic lines (NILs), one hard and one soft, of *Triticum aestivum* cv Falcon. Differences in the proteomes during grain development were related to ultrastructural observations of developing endosperm cells in the genetic context of the absence or presence of *Pina*. The results suggest puroindolines affect protein folding in the secretory pathway (endoplasmic reticulum) and consequently the aggregation of storage proteins and the formation of the protein matrix in drying endosperm.

Materials and methods

Genetic material

Experiments were carried out on hard and soft Australian near-isogenic lines (NILs) of the bread wheat *Triticum aestivum* cv Falcon, obtained after six generations of back-crossing with selection for differences in grain hardness only, which was evaluated by particule size index (Symes, 1969). The soft allele was contributed by the bread wheat *Triticum aestivum* cv Heron, genetically related to Falcon.

Hard and soft Falcon NILs differ mainly by the presence or absence of the *Pina* gene; hard Falcon has a *Pina-D1b* (*Pina* null) and *Pinb-D1a* genotype (Giroux and Morris, 1998) and soft Falcon has a *Pina-D1a* and *Pinb-D1a* genotype. These NILs were grown during Spring 2008 at INRA Plant Breeding Station under normal greenhouse conditions. Grain hardness values were 98 for the Falcon hard NIL and 42 for the Falcon soft NIL respectively, evaluated by NIRS (AACC, 1999).

Culture conditions and sampling

Seeds were sown in pots in a greenhouse. After three weeks, plantlets were placed in a growth chamber at 6°C with an 8 h day/16 h night photoperiod for two weeks. Plants were then grown in a plastic greenhouse with the natural photoperiod and irrigated without fertilizer. At anthesis wheat ears were tagged and air temperatures were recorded every 30 min in four locations in the greenhouse near the spikes. Daily average temperatures were calculated and summed, allowing the expression of grain development in thermal time (°Cd). For proteomics analysis developing caryopses were collected from the middle of the ear at 180°Cd, 300°Cd, 500°Cd and 750°Cd, corresponding in our conditions to 11, 19, 32 and 44 DAA. These four stages correspond to the end of endosperm cellularization, the fast starch accumulation period, the slow starch accumulation period and maturity before desiccation, respectively. For each of the four developmental stages, three samples of 12 kernels (two kernels from six different plants) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C.

Extraction of albumins and globulins from developing kernels

The three samples of each developmental stage and genotype (i.e. 24 samples) were weighed then ground in liquid nitrogen. Before proteins were extracted according to the method of Debiton et al (2011), wholemeal flour was first washed with acetone to eliminate chlorophyll, particularly abundant in young kernels. For this, 500 µl of cold extraction solution (-20°C) containing cold acetone, 0.07% (v/v) β-mercaptoethanol and 0.34% (w/v) protease inhibitor cocktail (Product number P 9599, Sigma, Steinheim, Germany), which displays a broad specificity for the inhibition of serine, cysteine, aspartic, metalloproteases and aminopeptidases, were added to 250 mg of fresh powdered material. After vortexing, proteins were precipitated at -20°C for 24 h. After centrifugation (15,000 rpm, 30 min, 0°C), the supernatant was discarded. The pellet was washed three times with cold extraction solution until no longer green and dried at room temperature for 2 h, before albumins and globulins were extracted together as described by Debiton et al (2011).

Extraction of amphiphilic proteins from developing kernels

Amphiphilic proteins were extracted from the pellet after extraction of the albumin/globulin fraction according to Debiton et al (2011). Amphiphilic proteins present in the 300°Cd, 500°Cd and 750°Cd samples were solubilized in 200 µl of 2-DE solution buffer (4% CHAPS, 7 M urea, 2 M thiourea, 1% IPG buffer pH 3-11, 70 mM DTT) by vortexing and shaking for 2 h. The suspensions were sonicated at 20 W for 20 s and kept for 30 min at 20°C. Samples were centrifuged (10,000g, 5 min, 20°C). Amphiphilic proteins, mainly hydrophobic membrane proteins, are not easily solubilized and are proportionally more abundant in samples from early developmental stages. To improve the solubilization of amphiphilic proteins in 180°Cd samples, two detergents ASB14 at 1.5% and Triton X100 at 0.5% were

included in the 2-DE solution buffer whereas CHAPS concentration was reduced at 2.5%, keeping a total detergent concentration of 4%, without any other change in the protocol.

Proteins in the two fractions were quantified using the Bradford protein assay (Bradford, 1976) on 5 μ l from replicates of each developmental stage using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) as the standard.

Two-dimensional electrophoresis (2-DE)

Two proteomic analyses were carried out, one for each fraction of proteins extracted from developing kernel with 48 samples in each analysis (2 NILs x 4 stages x 3 biological replicates x 2 technical replicates). The first dimension of protein separation (isofocusing) was carried out on 24-cm long Immobiline immobilized pH gradient (IPG) DryStrips pH 3-11 NL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Strips were first rehydrated overnight in a reswelling tray at room temperature with 460 μ l of a solution containing 4% (w/v) CHAPS, 7M urea, 2M thiourea, 1% (v/v) IPG buffer pH 3-11, 1.2% (v/v) Destreak reagent (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and a few grains of bromophenol blue. Protein extracts (150 μ g) were cup-loaded on the acidic side of the strip and isofocused in an Ethan IPGphor II apparatus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) for a total of 90 kVh for albumin/globulin fraction and 70 kVh for amphiphilic fraction. After pH equilibration for 15 min in a solution of 6M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS containing 1% (w/v) DTT, the proteins were alkylated for 15 min in a solution that was the same except that DTT had been replaced by 2.5% (w/v) iodoacetamide. The strips were deposited on SDS-polyacrylamide gels (14% T, 2.1% C) and proteins separated in the second dimension (5W/gel for 30 min and then 10W/gel for 6h). Gels were stained overnight using G250 colloidal Coomassie Brilliant Blue.

Image analysis

Gels were scanned using a GS-800 scanner and Quantity One software (Biorad, Richmon, VA, USA). Images were analyzed using Samespots v 4.1 (Nonlinear Dynamics, UK). Statistical tests were done on mean values computed for normalized volumes of four to six replicates on the basis that the total spot volume from gel to gel should be equal since the same amount of protein was loaded thus correcting for possible variations between gels. Quantitative differences between protein spots of the two NILs were evaluated for each developmental stage and considered significant when the *p*-value of the ANOVA test was less than 0.05. Relative abundance of the same spot in hard and soft NILs was calculated using means of normalized volumes.

Protein identification by mass spectrometry

Coomassie-stained spots of interest were excised using pipette tips. Spots were then destained with 100 μ L of 25 mM NH₄HCO₃-acetonitrile (95:5, v/v) for 30 min, washed twice in 100 μ L of 25 mM NH₄HCO₃-acetonitrile (50:50, v/v) and then dehydrated in 100% acetonitrile. Gel spots were completely dried using a SpeedVac before digestion at 37°C for 5 h with 15 μ L of trypsin (10 ng/ μ L;

V5111, Promega) in 25 mM NH_4HCO_3 . Peptide extraction was optimized by adding 8 μL of acetonitrile, followed by 10 min of sonication.

For LC-MS/MS analysis of peptide mixtures, on-line nanoflow liquid chromatography was performed using the Ultimate 3000 RSLC (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) with 15- cm nanocapillary columns of an internal diameter of 75 μm (Acclaim Pep Map RSLC, Dionex). The solvent gradient from 4% to 50% acetonitrile in 0.5% formic acid was run at a flow rate of 300 nl/min for 30 min. The eluate was electrosprayed into an LTQ Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France) through a nanoelectrospray ion source. The LTQ Velos was operated in a CID top 10 mode (i.e. one full scan MS from which 10 major peaks are selected for MS/MS). Raw data files were processed using version 1.2 of Thermo Proteome Discoverer. For protein identification, the NCBI nr Viridiplantae protein database was combined with sequences of possible human keratin contaminants. Variable modifications were oxidation (M) and carbamidomethylation (C). Peptide mass tolerance was set to 1.5 Da and fragment mass tolerance was set to 0.8 Da. Two missed cleavages were allowed. Protein identification was validated when at least two peptides originating from one protein showed significant Mascot™ scores ($p < 0.01$)

(http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). When several proteins were identified in the same spot, we chose the one with the best score and the most peptides. When proteins were identified from only two peptides, spectra were verified to assess their validity.

Specimen preparation for transmission electron microscopy

For ultrastructural observations, samples of endosperm were cut into 1-mm³ pieces with a razor blade and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 for 4 h at 4°C. After several washes in phosphate buffer then deionized water, samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide in water for 1 h at room temperature and rinsed several times in deionized water.

Tissue samples were transferred to 30% (v/v) ethanol for 30 min at room temperature then dehydrated through a series of ethanol solutions: 50% ethanol for 30 min, then 70%, 85%, 95%, and 100% ethanol for 1 h each. Samples were stored overnight in 100% ethanol. Specimens were then infiltrated with ethanol-London Resin White (v/v) mixtures as follows: 4:1 for 45 min, 3:2 for 60 min, 2:3 for 90 min, 1:4 for 2 h then pure resin 3 times for 1 h each. Samples were incubated overnight in pure resin then transferred to capsules filled with resin and allowed to polymerize for 4 days at 55°C. For electron microscopy, 80-nm sections were prepared using an ultramicrotome (Microm MT-7000, Oklahoma City, USA). The sections were collected on carbon-coated 150-mesh copper grids and stained with uranyl acetate (2% (w/v) in deionized water filtered through a 0.45 μm sieve) by flotation on 50 μl droplets in a dark wet chamber. Finally, the grids were washed in deionized water, air-dried and stored. Samples were observed using a JEOL JEM 1230 transmission electron microscope (TEM) running at 80 keV.

Table 1-A2.

Spots numbers in each proteomic experiment

Developmental stages (°Cd)	Albumins-Globulins					Amphiphilic proteins					Total
	180	300	500	750	Total	180	300	500	750	Total	
Total number of spots	2113	2156	2175	2058	8502	1404	1370	1312	1306	5392	13894
Varying spots ^a	8	8	31	7	54	0	19	7	7	33	87
Picked spots	7	6	27	4	44	0	18	7	7	32	76
Identified spots	4	6	22	0	32	0	11	5	6	22	54

^a numbers of spots significantly different between hard and soft kernels ($p < 0.05$).

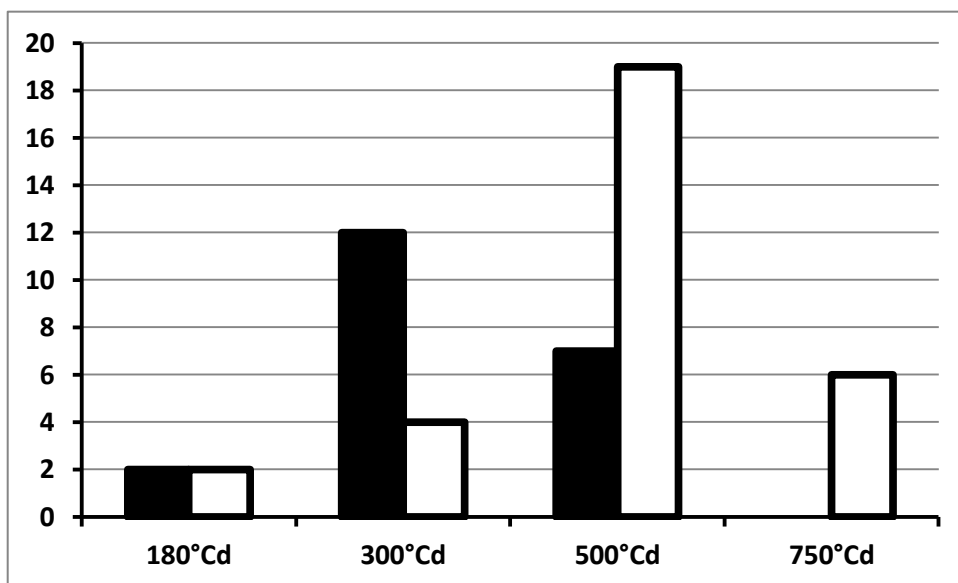


Fig. 1. Numbers of over-expressed proteins at each developmental stage (°Cd) in the hard line (dark bar) and in the soft line (white bar).

Results

Proteomic analyses of developing kernels

The proteomes of near-isogenic hard and soft wheat endosperms of the Falcon wheat cultivar were compared on 12 gels for each of four key developmental stages: the end of endosperm cellularization (at 180°Cd), during the fast starch accumulation period (at 300°Cd), during the slow starch accumulation period (at 500°Cd) and at maturity before desiccation (at 750°Cd). Table 1-A2 displays, for each developmental stage, the numbers of albumin/globulin and amphiphilic proteins and the number of significantly different spots that were then picked and identified.

The percentages of albumin/globulin spots that differed significantly between hard and soft NILs were 0.57%, 0.58%, 2.36% and 0.54% of the total number of spots, for the 180°Cd, 300°Cd, 500°Cd and 750°Cd stages, respectively. For the amphiphilic proteins, significantly different spots represented 0%, 0.88%, 0.32% and 0.34% of the total number of spots for the 180, 300, 500 and 750°Cd stages, respectively. A total of 54 proteins were identified among the 87 proteins expressed differentially between hard and soft endosperms at the four developmental stages. Images of 2-DE gels showing the positions of identified proteins are supplied in Supplementary material (Fig. S1-S6).

Of the proteins that were differentially expressed in hard and soft kernels, most up-regulation occurred in the early developmental stages in the hard line and in the late stages of kernel development in the soft line (Fig. 1). Differentially expressed proteins were involved in several cellular processes: protein synthesis and assembly, stress-defense, cell structure, carbohydrates metabolism, photosynthesis, energy and storage (Table 2-A2).

Effect of hard/soft genotype on endosperm abundance of translation, folding, stress and cell redox proteins

We noted that proteins involved in processes of folding, translation and stress account for nearly 50% of the differentially regulated spots in developing hard kernel. At the first stage (180°Cd), corresponding to the end of endosperm cellularization, protein disulfide isomerase (PDI) and 60S ribosomal protein were more abundant in the hard NIL (+ 48 % and + 56 %, respectively) whereas signal recognition particle and 40S ribosomal protein were more abundant in the soft line (+ 46 % and + 79 %, respectively). Each of these proteins is involved in protein translation and folding (Table 2-A2). During the fast starch accumulation stage (300°Cd), HSP70 and cBiPe2, both protein-folding related proteins extracted in the amphiphilic fraction, were much more abundant in hard kernel (+ 98% and + 95%, respectively). Two other proteins with functions related to protein folding, PDI and calnexin, were more abundant in hard kernel (+ 46% and + 45%, respectively) during the later slow starch accumulation stage (500°Cd).

At the 300°Cd and 500°Cd stages, nine of the proteins differentially expressed between hard and soft NILs have functions relating to translation. Among them, seven were more abundant in the soft NIL, up-regulated by 49% to 99%: elongation factor 1 α , acidic ribosomal protein, putative S18 ribosomal protein, two aspartate aminotransferases, cold shock protein-1 and alanine aminotransferase 2. Two proteins were more abundant in the hard line: 60S ribosomal proteins L5-1 and aspartate aminotransferase.

At the 300°Cd and 500°Cd stages, significant differences were also found in the abundance of proteins related to stress processes including cell redox homeostasis present in hard and soft NILs. There was more peroxidase 1 chain A, glutathione S-transferase, pathogenesis-related protein, guanine nucleotide-binding subunit, serpin Z1C, CM 17 protein precursor (a member of the plant amylase/protease inhibitor family) in hard kernel, but less serpin Z1B (Table 2-A2).

The hard/soft genotype affects levels of proteins involved in photosynthesis, energetics and storage

At the 300°Cd stage, kernels of both NILs are still green so are probably still photosynthesizing. Two spots corresponding to Rubisco large subunits were more abundant in the hard NIL (Table 2-A2), suggesting peripheral layers of hard kernels have a greater capacity for carbon fixation at this stage. Another chloroplast protein, oxygen-evolving enhancer protein 2, was more abundant in the soft line at 500°Cd. Four spots involved in energy processes were also more abundant in the soft line, glyceraldehyde 3P dehydrogenase and 5, 10 methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase at 300°Cd, and vacuolar proton-ATPase subunit A and a putative 2-oxoglutarate dehydrogenase E1 subunit at 500°Cd. The mitochondrial outer membrane porin was overexpressed in the hard line by 89%.

Two spots of glucose-1P adenylyltransferase (AGPase) were more abundant in the soft line during the period of slow starch accumulation whereas a limit-dextrinase type starch debranching enzyme was more abundant in the hard endosperm. Starch metabolism seems therefore to be influenced by the hard/soft genotype.

Some storage proteins were extracted in the amphiphilic protein fraction. It is noteworthy that there was 78% more of a gamma-gliadin at the 300°Cd stage in the hard kernel. In the soft line, HMW glutenin subunit Dy and globulin 3 were more abundant at the 500 °Cd stage whereas HMW glutenin subunit Bx and another gamma-gliadin were more abundant at the 750°Cd stage. The greatest difference between hard and soft proteomes was the PINA content, as there was 332% and 271% more PINA at the 500°Cd and the 750°Cd stages, respectively, in the soft NIL than in the hard one. Differential amount of PINB in the NILs at 750°Cd (+ 91% in the soft line compared to the hard one) is consistent with ELISA quantification (24.3 ± 1.1 mg PINB and 12.7 ± 0.5 mg PINB in 100 g freeze-dried soft and hard kernels, respectively) (Lesage et al., 2011).

Kinetics of protein accumulation and ultrastructure of developing kernels

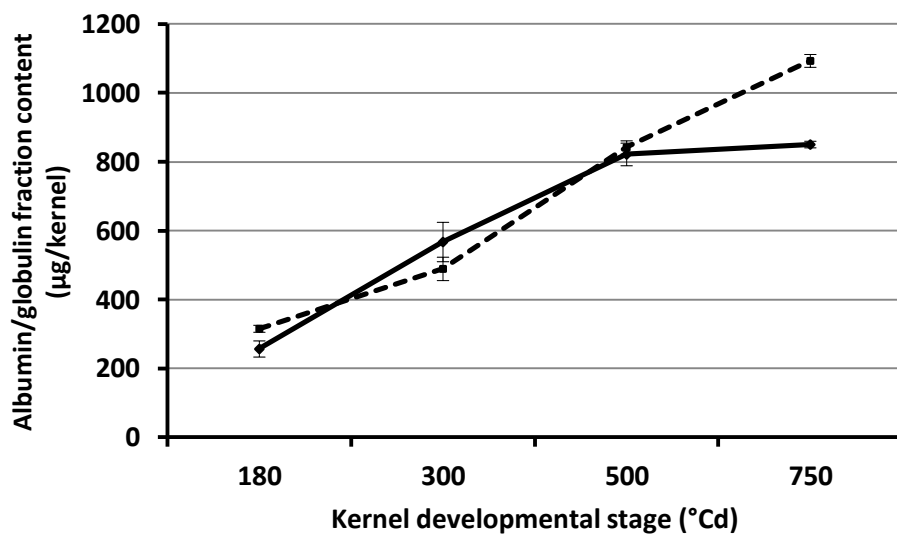


Fig. 2. Albumin/globulin content in developing kernels ($\mu\text{g}/\text{grain}$). Solid line: Falcon hard, dash line: Falcon soft. Confidence intervals are from replicated data.

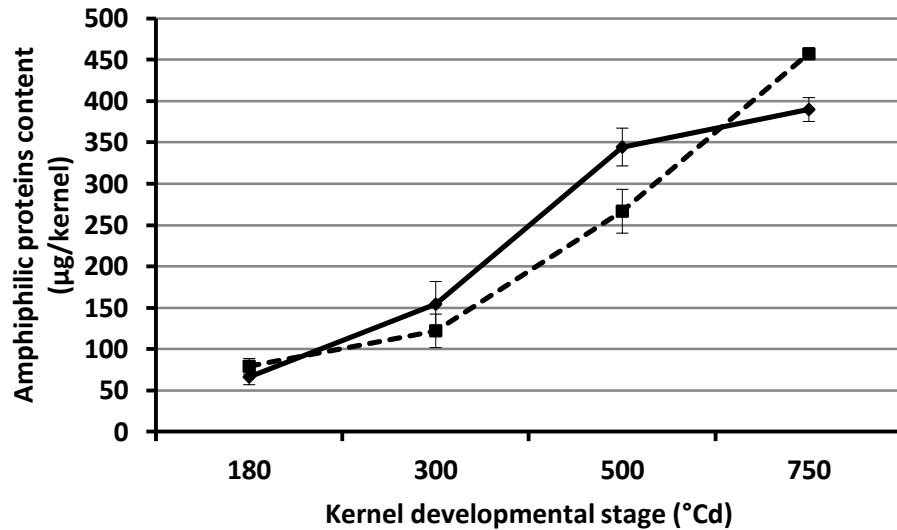


Fig. 3. Amphiphilic proteins content in developing kernels ($\mu\text{g}/\text{grain}$). Solid line: Falcon hard, dash line: Falcon soft. Confidence intervals are from replicated data.

The total amount of protein in the albumin/globulin (Fig. 2) and amphiphilic fractions (Fig. 3) increased from 180°Cd to 500°Cd in both NILs. From 500°Cd, however, the kinetics began to differ as protein accumulation reached a plateau in the hard NIL whereas both protein types continued to accumulate in the soft line until 750°Cd.

The ultrastructure of developing grain from each NIL was observed by TEM. ER and mitochondria showed unusual appearance in hard endosperm (Fig. 4). At 300°Cd, ER appeared as distended beads (Fig. 4B and 4C) and mitochondria seemed to be swollen showing whitish spots, low density matrix. We observed multivesicular body (MVB)-like organelles only in hard endosperm (Fig. 4D). We also found that protein bodies were still merging in the soft endosperm at 500°Cd (Fig 5A) whereas the protein matrix was already formed in hard endosperm at the same stage (Fig 5B). The protein matrix in 750°Cd soft endosperm (Fig. 5D) appeared similar to that of 500°Cd hard endosperm (Fig. 5C), showing that hard endosperm completed its development earlier.

Discussion

The two Falcon NILs phenotypically selected for hardness theoretically after six generations of back-crosses are 99.22% identical (Symes, 1969). DArTs polymorphism markers were used to compare the genomes of these two lines revealing that they are 99.38% identical based on 2236 markers tested (data not shown). Two-dimensional electrophoresis of albumin/globulin and amphiphilic proteins revealed on average only 0.69% of protein spots differed significantly between hard and soft NILs. Lower level of evaluated genetic difference between the two NILs, showed by two independent analyses (DArTs and proteomics), as compared to the theoretical value, is likely related to the low degree of polymorphism between Falcon and Heron. However, the small genetic differences between the two NILs, which were located on different chromosomes, might influence several developmental plant traits not directly related to puroindolines.

The two NILs tested here are known to differ at the *Pina* locus - the gene is absent in the hard NIL - so it was expected that the major proteomic difference found between the two lines would be in the amount of PINA. The extent of the difference however seemed less than expected. This fact can be explained by the presence of another protein at the same location on 2-DE gels of the hard NIL proteome, which is masked by the large spot area of PINA on 2-DE gels of the soft NIL proteome. Indeed, we identified the cytoplasmic ribosomal protein S15a on 2-DE gels of the hard NIL proteome where the PINA spot is located (Fig. S6: spot 1697) on 2-DE gels of the soft NIL proteome (data not shown). This superposing of proteins means that the quantitative difference in *Pina* expression between hard and soft NILs may be underestimated. For comparison, the levels of PINB in the two NILs concur with results obtained independently by ELISA (Lesage et al., 2011).

A stress response is amplified in developing kernels of the hard NIL

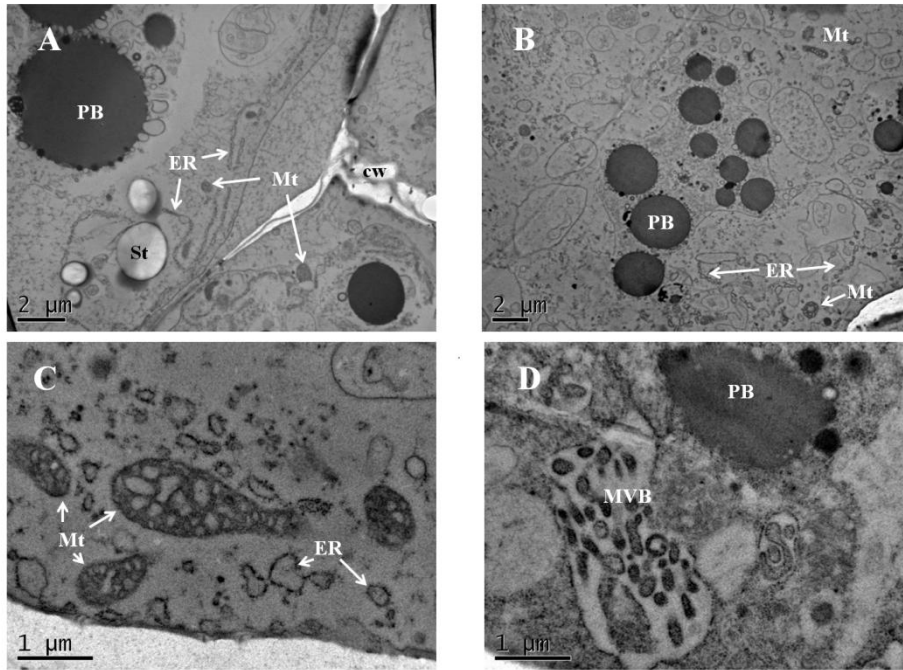


Fig. 4. Unusual organelles appearance in wheat hard endosperm observed by TEM. A: 300°Cd soft endosperm (x 8000). B: 300°Cd hard endosperm (x 6000). C: Swollen mitochondria and distended ER in 300°Cd hard endosperm (x 25000). D: Multivesicular Body-like in 300°Cd hard endosperm (x 25000). PB: Protein Body, ER: endoplasmic reticulum, St: starch, cw: cell wall, Mt: mitochondria, MVB: multivesicular body.

Proteomics analysis indicated that several chaperones and enzymes resident in endoplasmic reticulum (ER) were more abundant in hard kernel compared to the soft kernel, leading us to hypothesize that there is an increase in protein misfolding in the developing hard NIL grain. As spontaneous polypeptide folding is faster than protein synthesis itself, shown *in vitro* (Landry and Gierasch, 1994), nascent polypeptide chains are prevented from premature folding and/or aggregation by the binding of molecular chaperones from several conserved protein families, initially described as heat shock proteins (HSP), particularly HSP70/BiP. Compared to the cytoplasm, the ER then provides an oxidizing environment that facilitates disulfide bond formation and protein folding in the lumen. This feature is important in wheat endosperm where numerous storage proteins, i.e. α - , β - and γ -gliadins and glutenins contain disulphide bonds in their non-repetitive domains (Shewry and Tatham, 1997).

We found there was almost twice as much of both BiP and HSP70 in hard endosperm as in soft endosperm at 300°Cd, possibly indicating that more proteins are misfolded in hard endosperm. Zhang and Boston (1992) demonstrated that prolamins are misfolded in the maize endosperm of the *floury-2* mutant, correlating this with an increase in BiP content. Increases of up to almost 50% in the amounts of other proteins involved in protein folding, like PDI and calnexin, were found in hard kernel at different stages of development. Up-regulation of BiP, HSP70, PDI and calnexin could indicate that an unfolded protein response (UPR) is activated early in the hard NIL. It is well established that the UPR can be triggered when an imbalance in the ratio between client proteins and chaperones induces ER stress. As demonstrated in yeast and animal cells, the UPR enhances the expression of many genes involved in various processes such as chaperone action, ER associated degradation, N-linked glycosylation, mannosylation, synthesis of cytoskeleton proteins, lipid biosynthesis, cell metabolism, vacuolar function, and trafficking (Jonikas et al., 2009). The UPR in plants has been less documented although recent data confirm similar molecular mechanisms may operate in this response (Deng et al., 2011; Gupta and Tuteja, 2011; Vitale and Boston, 2008).

In our results, differences in the intensities of eleven spots from 180°Cd to 500°Cd could relate to differences in translation. For example, down-regulation of elongation factor and ribosomal proteins in the hard line compared to the soft one might be expected to have a direct effect on the translation capacity and cold shock proteins might inhibit translation by their cold shock domains binding to mRNA (Sommerville, 1999). The two 60S ribosomal proteins that were up-regulated in the hard line would normally be recruited after fixation of 40S ribosomal protein by mRNA, but were likely redundant as 40S subunits were down-regulated. Three spots more abundant in soft kernel at 500°Cd were identified as HSP 80-2, cytosolic chaperones known to form complexes with HSP 70 (Frydman, 2001). Their decrease in the hard line may be coupled to the down-regulation of proteins involved in translation. Activation of the UPR is known to be associated to attenuated translation

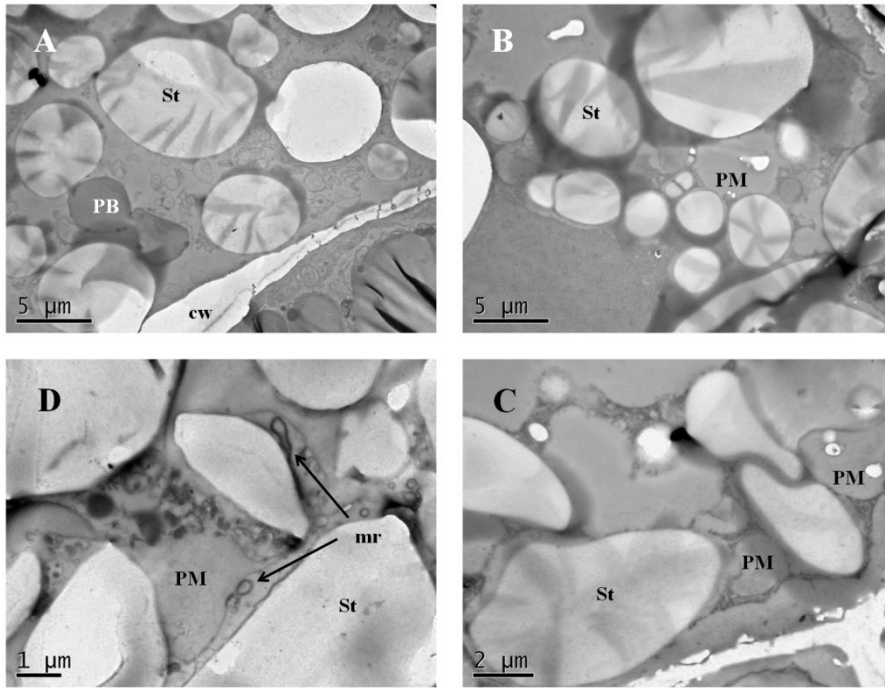


Fig. 5: Kinetics of the protein matrix formation. A: soft endosperm at 500°Cd, protein bodies are still merging, (x 5000). B and C: hard endosperm at 500°Cd, protein bodies are no longer visible (B: x 5000; C: x 10000). D: soft endosperm at 750°Cd, (x 15000) Appearance of protein matrix is similar to hard endosperm at 500°Cd (C). PB: Protein Body, St: starch, cw: cell wall, mr: membrane remnants.

(Trusina et al., 2008), thus reducing the polypeptide load entering the ER, so it is possible that the differentially expressed translation-related proteins in hard NIL may be an effect of the UPR.

Several features of the hard NIL proteome suggest the redox status of the endosperm is perturbed. Glutathione S-transferase 19E50, an antioxidant enzyme, was up-regulated in hard kernel, as were peroxidase 1 chain A, involved in the response to oxidative stress, and a guanine nucleotide-binding subunit, a signal transducer acting as regulator of ROS production (Nakashima et al., 2008). Differential expression (described below as up-regulated or down-regulated in the hard line) of several other proteins indicates the hard endosperm is subject to redox stress. Mitochondrial porin (up-regulated), which modifies mitochondrial permeability is involved in oxidative stress signaling, leading to apoptosis (Jabs, 1999). This likely enhanced permeability might explain mitochondria's aspect. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (down-regulated), an oxidoreductase essential in carbohydrate metabolism, is a major target of oxidative stress (Hwang et al., 2009) regulating transcription (Sheng and Wang, 2009). Cytoskeleton proteins actin (down-regulated) and β -tubulins (up-regulated) are known to be targets of glutathione S-transferase in plants under oxidative stress (Colville and Kranner, 2010). This apparently amplified stress response in hard kernels is consistent with the fact that pathogenesis-related proteins, like serpins and amylase-protease inhibitor CM17, are up-regulated. Incidentally, the UPR mechanism is linked to the cell's redox status through enhancement of the glutathione pathway and regulation of reactive oxygen species (ROS) production (Sevier and Kaiser, 2008) so the phenotypes of redox stress and UPR could be causally linked in the hard NIL.

The hard/soft genotype affects the kinetics of kernel development

Several lines of evidence from both endosperm protein expression and ultrastructure indicate that the developmental kinetics is altered within a shorter time frame in hard kernels than in soft kernels. While differential expression consisted mostly of up-regulation of proteins in the early developmental stages in the hard kernel, from 500°Cd onwards it was mostly due to down-regulation of proteins in the hard kernel compared to the soft one (Fig. 1). Up-regulation of Rubisco in the hard NIL at the 300°Cd stage is a specific example illustrating that the shift in developmental kinetics was not limited to the endosperm but also involved the peripheral layers of the developing grain.

It is known that wheat endosperm undergoes programmed cell death (PCD) in a stochastic manner (Young and Gallie, 2000) from 16 to 30 DAA and that PCD affects the entire endosperm except for the aleurone layer. ROS can activate PCD in animals and plants (Jabs, 1999). In our work, oxidative stress response proteins and ultrastructural features were indicators that PCD began earlier in hard endosperm than in soft endosperm. Synthesis of proteins, both metabolic and amphiphilic ones, also ceased earlier in hard kernel. Down-regulation of proteins involved in energy processes, like vacuolar

proton-ATPase subunit A, from 300°Cd onwards in the hard NIL is consistent with the early onset of apoptosis.

The overall picture is that there is likely higher oxidative stress within cells lacking *Pina* (i.e. hard kernel) resulting from probable failure to restore protein folding homeostasis. This would induce aggregation of misfolded proteins in rough ER causing it to appear distended and undergo accelerated cell death (Frydman, 2001). MVBs were observed only in hard endosperm. As MVBs are involved in degradation (Piper and Katzmann, 2007), this observation strengthens the hypothesis that the hard NIL has a heavier load of misfolded proteins and/or greater degradation of no longer functional mitochondria than the soft NIL.

Putative physiological function of puroindolines

Storage protein polymer size was found to be significantly higher in the hard Falcon NIL compared to the soft one (Lesage et al., 2011), so the absence of PINA might affect the aggregation of storage proteins. Here we showed that folding and cell redox processes probably differ in hard kernel compared to soft, such that the folding capacity of hard endosperm cells is limited leading to the aggregation of prolamins. Some storage proteins were recovered from amphiphilic protein extracts, suggesting that they could interact with puroindolines in the same cellular compartment. Puroindolines have *in vitro* lipid and membrane binding properties (Kooijman et al., 1998; Le Guernevé et al., 1998; Wilde et al., 1993) owing to their amphiphilic TRD (Evrard et al., 2008; Jing et al., 2003). We previously found PINA localizes to vesicular membranes in developing endosperm cells before they merge with protein bodies (Lesage et al., 2011). It is conceivable then that puroindolines could interact both with membranes and prolamins. If so, puroindolines could be seed-specific proteins that contribute to the proper folding or prevent early aggregation of storage proteins entering the ER. Like BiP, they are very abundant and follow the same pathway of intracellular trafficking from the ER to protein bodies (Lesage et al., 2011). According to this hypothesis, absence of PINA might impair the folding capacity of hard endosperm cells inducing ER stress. If an increase in ER stress leads to the UPR cascade of signals, this could explain pleiotropic effects related to the hardness genotype. The amplification of oxidative stress would be expected to result in storage protein aggregation, an increase in protein polymer size and hardness.

Conclusion

This study challenges the current view that the main function of puroindolines is in defence against pathogens. By evaluating developmental differences between two wheat NILs differing in their grain hardness and the presence/absence of *Pina* we found that stress-related and folding proteins are more abundant in hard kernel and that endosperm development of the hard NIL reached completion earlier than the soft NIL. This suggests that puroindolines affect endosperm development and

especially storage protein polymerization via the protein folding machinery, with a putative amplified UPR accelerating PCD. The interaction between storage proteins and puroindolines would be very important to explore for understanding the protein matrix formation.

Supplementary material

Figures S1 to S6: 2-DE gels of albumin/globulin and amphiphilic protein fractions at four developmental stages, showing the localization of significantly different and identified spots.

Funding

This work was supported by grants from Institut National de la Recherche Agronomique.

Acknowledgements

We thank Marie-Claire Debote for growing plants. We are grateful for the use of plant growth facilities at the GDEC Unit, INRA Clermont-Ferrand, France and for the use of microscopy facilities at the Biopolymers-Structural Biology platform, INRA Nantes, France.

Abbreviations

2-DE, two-dimensional electrophoresis

Pina, puroindoline-a gene

PINA, puroindoline-a protein

Pinb, puroindoline-b gene

PINB, puroindoline-b protein

NILs, near isogenic lines

DAA, days after anthesis

LMW, low molecular weight

HMW, high molecular weight

UPR, Unfolded Protein Response

ROS, Reactive Oxygen Species

PCD, Programmed Cell Death

TRD, Tryptophan Rich Domain

SDS Sodium Dodecyl Sulfate

CHAPS, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

IPG, immobilized pH gradient

DTT, dithiothreitol

ASB14, amidosulfobetaine-14

LC-MS/MS, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
CID, collision induced dissociation

References

- AACC.** (1999). In *Method 39-70A. Wheat hardness determined by near infrared reflectance.*, vol. AACC (eds), pp. 1-3. St Paul, MN, USA: AACC.
- Bhave, M. and Morris, C.** (2008). Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology* **66**, 205-219.
- Blochet, J.-E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.-F., Joudrier, P., Pézolet, 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 Letters* **329**, 336-340.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Charnet, P., Molle, G., Marion, D., Rousset, M. and Lullien-Pellerin, V.** (2003). Puroindolines Form Ion Channels in Biological Membranes. *Biophysical Journal* **84**, 2416-2426.
- Colville, L. and Kranner, I.** (2010). Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation* **62**, 241-255.
- Debiton, C., Merlino, M., Chambon, C., Bancel, E., Decourteix, M., Planchot, V. and Branlard, G.** (2011). Analyses of albumins, globulins and amphiphilic proteins by proteomic approach give new insights on waxy wheat starch metabolism. *Journal of Cereal Science* **53**, 160-169.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, J. X., Srivastava, R., Rothstein, S. J. and Howell, S. H.** (2011). Heat Induces the Splicing by Ire1 of a Mrna Encoding a Transcription Factor Involved in the Unfolded Protein Response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 7247-7252.
- 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*1, *2. *Journal of Cereal Science* **32**, 1-20.
- Evrard, A., Lagarde, V., Joudrier, P. and Gautier, M.-F.** (2008). Puroindoline-a and puroindoline-b interact with the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane through different amino acids present in their tryptophan-rich domain. *Journal of Cereal Science* **48**, 379-386.
- Frydman, J.** (2001). FOLDING OF NEWLY TRANSLATED PROTEINS IN VIVO: The Role of Molecular Chaperones. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 603-647.
- 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.
- Giroux, M. J. and Morris, C. F.** (1998). Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS* **95**, 6262-6266.
- Gupta, D. and Tuteja, N.** (2011). Chaperones and Foldases in Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**.
- Hwang, N. R., Yim, S. H., Kim, Y. M., Jeong, J., Song, E. J., Lee, Y., Lee, J. H., Choi, S. and Lee, K. J.** (2009). Oxidative Modifications of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Play a Key Role in Its Multiple Cellular Functions. *Biochemical Journal* **423**, 253-264.
- Jabs, T.** (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* **57**, 231-245.
- Jing, W., Demcoe, A. R. and Vogel, H. J.** (2003). Conformation of a Bactericidal Domain of Puroindoline a: Structure and Mechanism of Action of a 13-Residue Antimicrobial Peptide. *Journal of Bacteriology* **185**, 4938-4947.

- Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S. et al.** (2009). Comprehensive Characterization of Genes Required for Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Science* **323**, 1693-1697.
- Kooijman, M., Orsel, R., Hamer, R. J. and Bekkers, A.** (1998). The Insertion Behaviour of Wheat Puroindoline-a Into Diacylgalactosylglycerol Films. *Journal of Cereal Science* **28**, 43-51.
- Landry, S. J. and Gierasch, L. M.** (1994). Polypeptide Interactions with Molecular Chaperones and their Relationship to in Vivo Protein Folding. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**, 645-669.
- Le Guernevé, C., Seigneuret, M. and Marion, D.** (1998). Interaction of the Wheat Endosperm Lipid-Binding Protein Puroindoline-a with Phospholipids*1. *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.
- Nakashima, A., Chen, L., Thao, N. P., Fujiwara, M., Wong, H. L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K.** (2008). RACK1 Functions in Rice Innate Immunity by Interacting with the Rac1 Immune Complex. *The Plant Cell Online* **20**, 2265-2279.
- Piper, R. C. and Katzmann, D. J.** (2007). Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 519-547.
- Sevier, C. S. and Kaiser, C. A.** (2008). Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum: Redox regulation of protein folding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1783**, 549-556.
- Sheng, W. Y. and Wang, T. C. V.** (2009). Proteomic Analysis of the Differential Protein Expression Reveals Nuclear Gapdh in Activated T Lymphocytes. *Plos One* **4**.
- Shewry, P. R. and Tatham, A. S.** (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science* **25**, 207-227.
- Sommerville, J.** (1999). Activities of cold-shock domain proteins in translation control. *BioEssays* **21**, 319-325.
- Symes, K. J.** (1969). Influence of a gene causing hardness on the milling and baking quality of two wheats. *Australian Journal of Agricultural Research* **20**, 971-979.
- Trusina, A., Papa, F. R. and Tang, C.** (2008). Rationalizing translation attenuation in the network architecture of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20280-20285.
- Turnbull, K. M., Marion, D., Gaborit, T., Appels, R. and Rahman, S.** (2003). Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta* **216**, 699-706.
- Vitale, A. and Boston, R. S.** (2008). Endoplasmic Reticulum Quality Control and the Unfolded Protein Response: Insights From Plants. *Traffic* **9**, 1581-1588.
- Wilde, P. J., Clark, D. C. and Marion, D.** (1993). Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1570-1576.
- Young, T. E. and Gallie, D. R.** (2000). Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* **44**, 283-301.
- Zhang, F. and Boston, R. S.** (1992). Increases in binding protein (BiP) accompany changes in protein body morphology in three high-lysine mutants of maize. *Protoplasma* **171**, 142-152.

Table 2-A2. LC-MS/MS identification of differentially expressed proteins in the developing wheat kernels of the hard and soft NILs. Relative amount of each protein is indicated for the relevant stage of kernel development (180°Cd, 300°Cd, 500°Cd, 750°Cd), followed by a letter specifying the genotype displaying the highest mean of the spot volume (H: hard, S: soft). PS&A: protein synthesis and assembly, S-D: stress-defense, C S: cell structure, C M: carbohydrates metabolism, Phot: photosynthesis, Ener: energy, Stor: storage. AG: albumin/globulin fraction, Amph: amphiphilic protein fraction.

Cell process	Function	Protein name	180°Cd	300°Cd	500°Cd	750°Cd	Taxonomy	Reference	Protein fraction	Spot number
PS&A	Folding	Protein Disulfide Isomerase	+ 48% /H				<i>Aegilops tauschii</i>	gi 47118046	AG	899
PS&A	Folding	HSP70		+ 98% /H			<i>Hordeum vulgare</i>	gi 476003	Amph	261
PS&A	Folding	Luminal binding protein cBiPe2		+ 95% /H			<i>Zea mays</i>	gi 1575128	Amph	291
PS&A	Folding	Protein Disulfide Isomerase			+ 46% /H		<i>Triticum aestivum</i>	gi 508975	AG	918
PS&A	Folding	Calnexin			+ 45% /H		<i>Triticum aestivum</i>	gi 296524380	AG	590
PS&A	Folding	HSP80-2 cytoplasmic			+ 48% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 5123910	AG	582
PS&A	Folding	HSP80-2 cytoplasmic			+ 57% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 5123910	AG	687
PS&A	Folding	HSP80-2 cytoplasmic			+ 64% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 5123910	AG	694
PS&A	Targeting to membrane	Signal recognition particle 54 kDa subunit	+ 46% /S				<i>Hordeum vulgare</i>	gi 1020000	AG	1514
PS&A	Translation	40S ribosomal protein S7	+ 79% /S				<i>Hordeum vulgare</i>	gi 49036474	AG	2499
PS&A	Translation	Similar to 60S ribosomal protein L32A	+ 56% /H				<i>Oryza sativa</i>	gi 115479981	AG	2972
PS&A	Translation	60S ribosomal protein L5-1		+ 58% /H			<i>Triticum aestivum</i>	BJ290988	AG	1767
PS&A	AA synthesis	Aspartate aminotransferase		+ 82% /H			<i>Triticum aestivum</i>	gi 164471780	Amph	1192
PS&A	AA synthesis	Aspartate aminotransferase		+ 87% /S			<i>Triticum aestivum</i>	gi 164471780	Amph	816

Cell process	Function	Protein name	180°Cd	300°Cd	500°Cd	750°Cd	Taxonomy	Reference	Protein fraction	Spot number
PS&A	AA synthesis	Aspartate aminotransferase		+ 99% /S			<i>Triticum aestivum</i>	gi 164471780	Amph	841
PS&A	Translation	cold shock protein-1			+ 66% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 259439834	AG	2655
PS&A	Translation	Acidic ribosomal protein			+ 49% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 32400796	AG	2955
PS&A	Translation	Putative ribosomal protein S18			+ 66% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 22204120	Amph	1947
PS&A	Translation	Elongation Factor 1 α			+ 53% /S		<i>Gymnadenia conopsea</i>	gi 89276321	AG	1538
PS&A	AA synthesis	Alanine aminotransferase2			+ 48% /S		Unknown species	gi 1703227	AG	1160
S-D	antioxidant enzyme	Peroxidase 1 chain A cristal structure		+ 88% /H			<i>Hordeum vulgare</i>	gi 57830301	AG	1939
S-D	antioxidant enzyme	Glutathione S-transferase 19E50		+ 62% /H			<i>Triticum aestivum</i>	gi 22022400	AG	2254
S-D		Pathogenesis related protein		+ 60% /H			Unknown species	gi 1588926	AG	3205
S-D	Transducer	Guanine nucleotide-binding subunit		+ 89% /H			<i>Triticum aestivum</i>	BJ281061	Amph	898
S-D	Protease inhibitor	Serpin Z1C			+ 74% /H		Unknown species	gi 75313848	AG	1408
S-D	Endopeptidase inhibitor	CM 17 protein precursor			+ 54% /H		<i>Triticum aestivum</i>	gi 21711	AG	2793
S-D	Protease inhibitor	Serpin Z1B			+ 49% /S		Unknown species	gi 75279910	AG	1364
C S	Cytoskeleton	Beta-tubulin 3			+ 55% /H		<i>Hordeum vulgare</i>	gi 146760211	AG	1010
C S	Cytoskeleton	Beta-tubulin 3			+ 72% /H		<i>Hordeum vulgare</i>	gi 146760211	AG	1019
C S	Cytoskeleton	Actin			+ 54% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 48927618	AG	2009
C S	Lipid storage	Oleosin			+ 71% /S		<i>Hordeum vulgare</i>	gi 479082	Amph	1921
C S	Cell wall synthesis	UDP-D-glucuronate decarboxylase		+ 76% /S			<i>Hordeum vulgare</i>	gi 50659030	Amph	918

Cell process	Function	Protein name	180°Cd	300°Cd	500°Cd	750°Cd	Taxonomy	Reference	Protein fraction	Spot number
C M	Starch synthesis	Glucose-1P adenylyltransferase large			+ 92% /S		Unknown species	gi 1707930	AG	1089
C M	Starch synthesis	Glucose-1P adenylyltransferase large			+ 51% /S		Unknown species	gi 1707930	AG	1121
C M	Starch catabolism	Limit dextrinase type starch debranching enzyme			+ 54% /H		<i>Triticum aestivum</i>	gi 119633045	AG	299
Phot	Carboxylase/oxygenase	Rubisco large subunit		+ 86% /H			<i>Podocarpus aff. pilgeri</i>	gi 13549392	Amph	590
Phot	Carboxylase/oxygenase	Rubisco large subunit		+ 91% /H			<i>Deschampsia cespitosa</i>	gi 144583548	Amph	607
Phot		Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic			+ 46% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 131394	AG	2391
Ener	Oxidoreductase	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		+ 45% /S			<i>Triticum aestivum</i>	gi 148508784	AG	1720
Ener	Oxidoreductase	5,10 methylene-tetrahydrofolate		+ 48% /S			<i>Triticum monococcum</i>	gi 115589734	AG	1890
Ener	Ion transport	Vacuolar proton-ATPase subunit A			+ 77% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 90025017	AG	682
Ener	Decarboxylase	Putative 2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit			+ 45% /S		<i>Oryza sativa</i>	gi 115474297	AG	325
Ener	Ion transport	Mitochondrial outer membran porin		+ 89% /H			Unknown species	gi 1172553	Amph	1197
Stor		Gamma-gliadin		+ 78% /H			<i>Triticum aestivum</i>	gi 15148385	Amph	1922
Stor		Puroindoline-a			+ 332% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 408873	Amph	2072
Stor		Puroindoline-a			+ 137% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 408873	Amph	2078
Stor		HMW glutenin subunit Dy			+ 67% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 140169817	Amph	258
Stor		Globulin 3			+ 50% /S		<i>Triticum aestivum</i>	gi 215398470	AG	839

Cell process	Function	Protein name	180°Cd	300°Cd	500°Cd	750°Cd	Taxonomy	Reference	Protein fraction	Spot number
Stor		HMW glutenin subunit Bx				+ 69% /S	<i>Triticum aestivum</i>	gi 109452233	Amph	150
Stor		Gamma-gliadin				+ 134% /S	<i>T. turgidum ssp. dicoccoides</i>	gi 209971793	Amph	793
Stor		Grain softness protein-1D				+ 90% /S	<i>Triticum aestivum</i>	gi 60652224	Amph	1526
Stor		Puroindoline-a				+ 271% /S	<i>Triticum aestivum</i>	gi 408873	Amph	1697
Stor		Puroindoline-b				+ 91% /S	<i>Triticum aestivum</i>	gi 201071365	Amph	1708
Stor		Puroindoline-a				+ 99% /S	<i>Triticum aestivum</i>	gi 408873	Amph	1759

Figure S1.

2-DE gel (IPG x SDS-PAGE) of the albumin/globulin fraction at the 180°Cd stage (hard sample). Spots that differed significantly between hard and soft NILs ($p < 0.05$) and that were identified are encircled. Spot numbers correspond to those mentioned in Table 2.

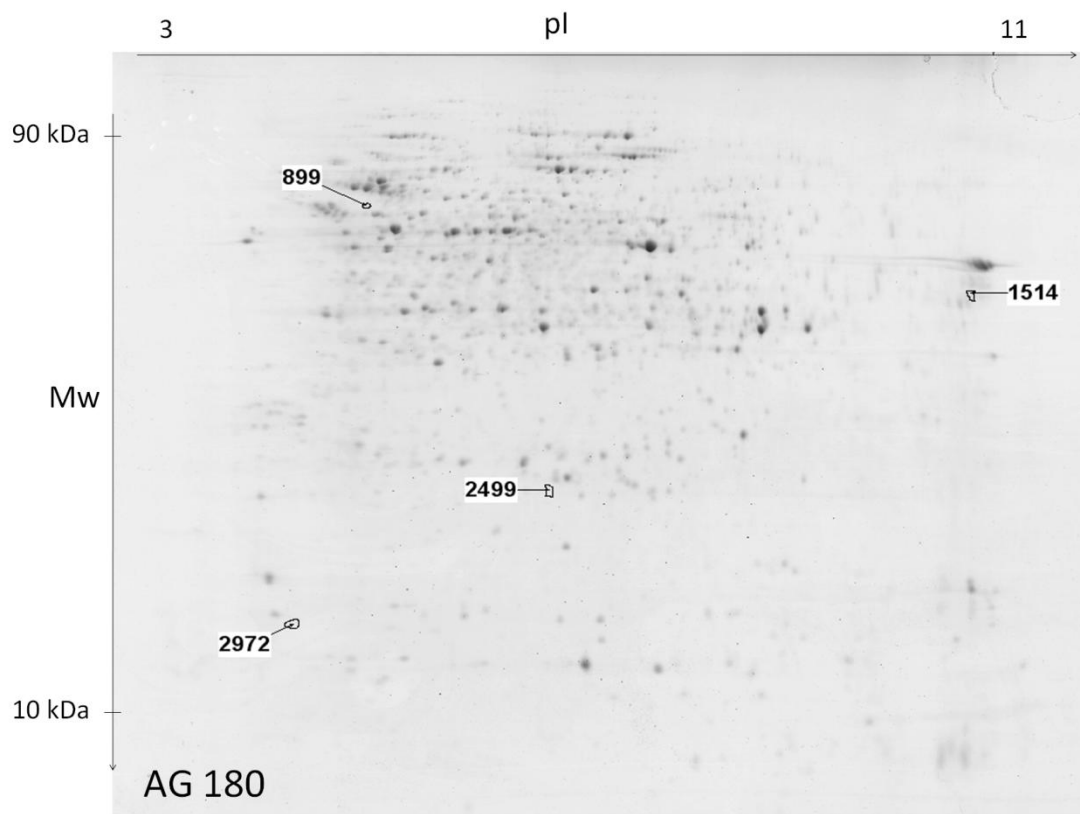


Figure S2.

2-DE gel (IPG x SDS-PAGE) of the albumin/globulin fraction at the 300°Cd stage (hard sample). Spots that differed significantly between hard and soft NILs ($p < 0.05$) and that were identified are encircled. Spot numbers correspond to those mentioned in Table 2.

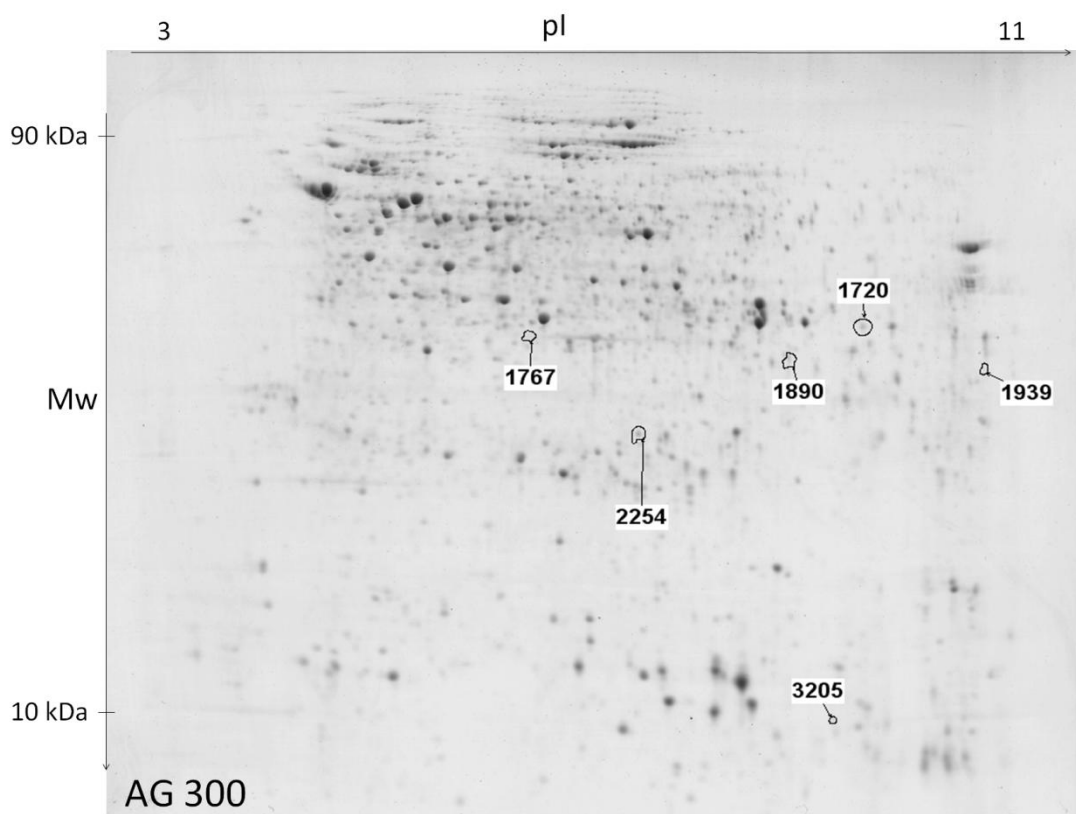


Figure S3.

2-DE gel (IPG x SDS-PAGE) of the albumin/globulin fraction at the 500°Cd stage (hard sample). Spots that differed significantly between hard and soft NILs ($p < 0.05$) and that were identified are encircled. Spot numbers correspond to those mentioned in Table 2.

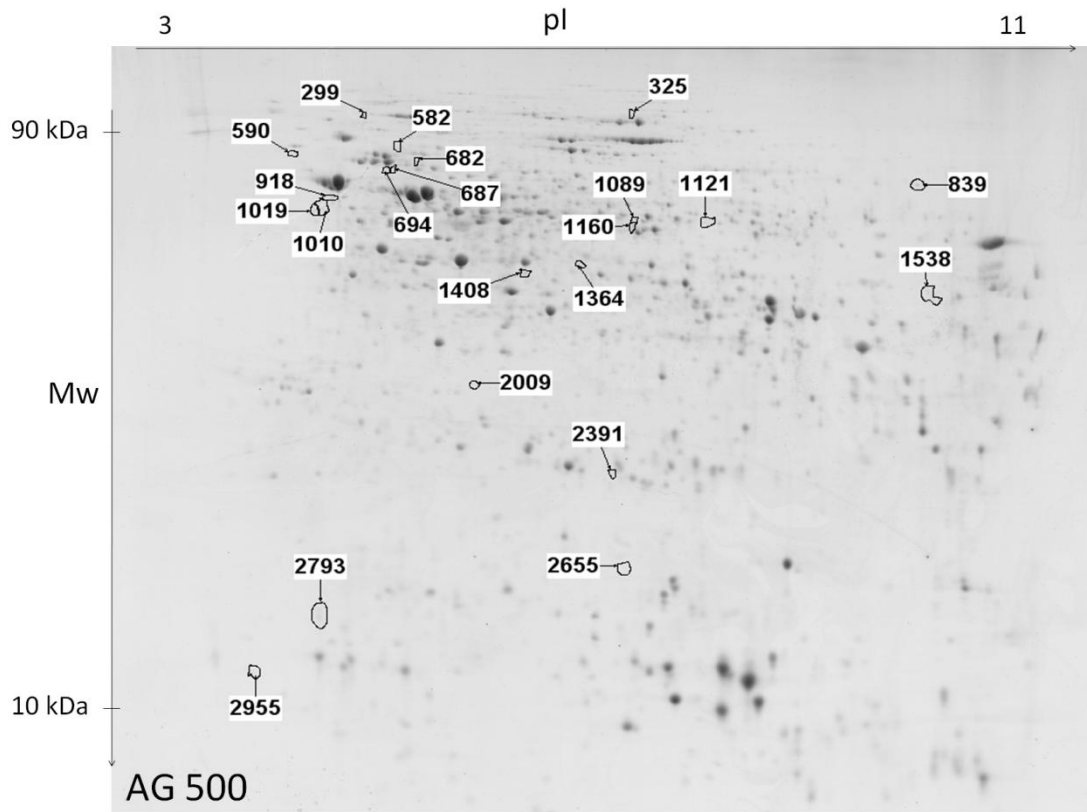


Figure S4.

2-DE gel (IPG x SDS-PAGE) of the amphiphilic proteins fraction at the 300°Cd stage (hard sample). Spots that differed significantly between hard and soft NILs ($p < 0.05$) and that were identified are encircled. Spot numbers correspond to those mentioned in Table 2.

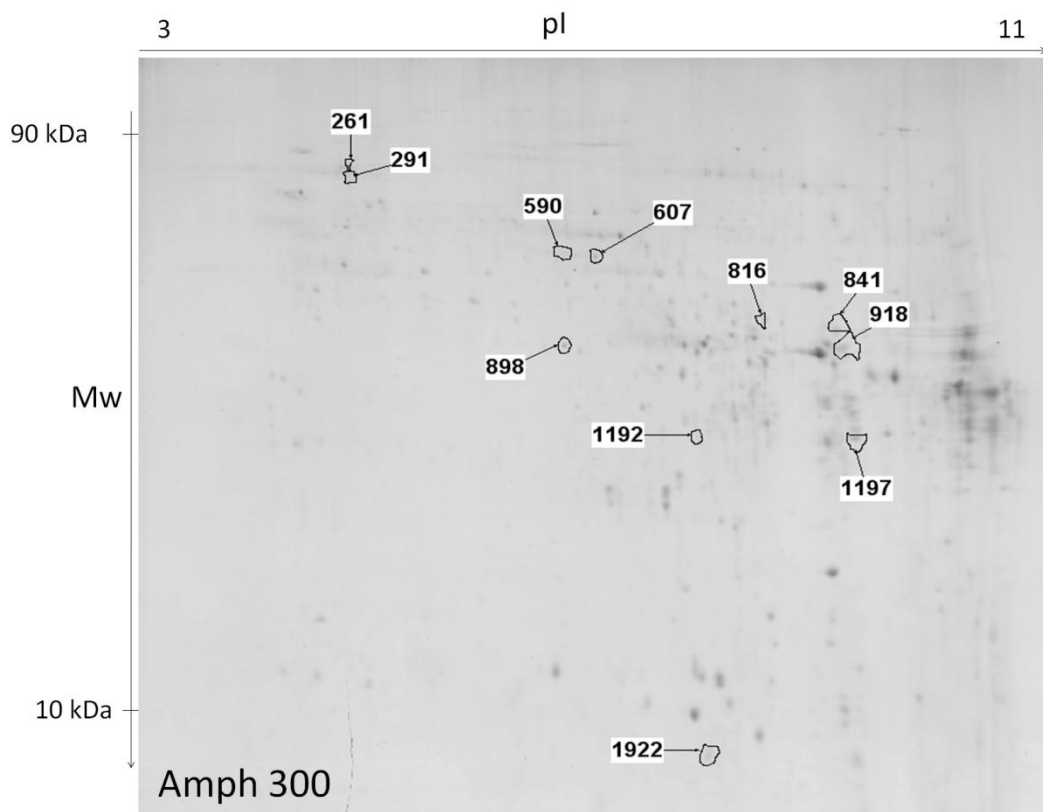


Figure S5.

2-DE gel (IPG x SDS-PAGE) of the amphiphilic proteins fraction at the 500°Cd stage (soft sample). Spots that differed significantly between hard and soft NILs ($p < 0.05$) and that were identified are encircled. Spot numbers correspond to those mentioned in Table 2.

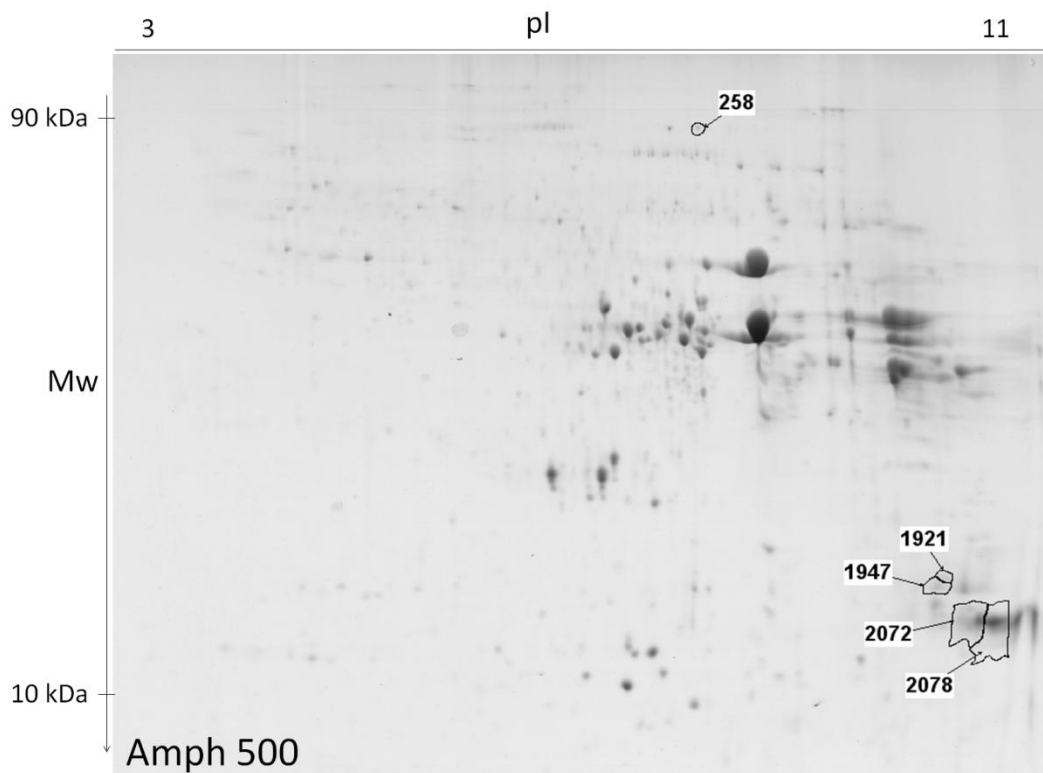
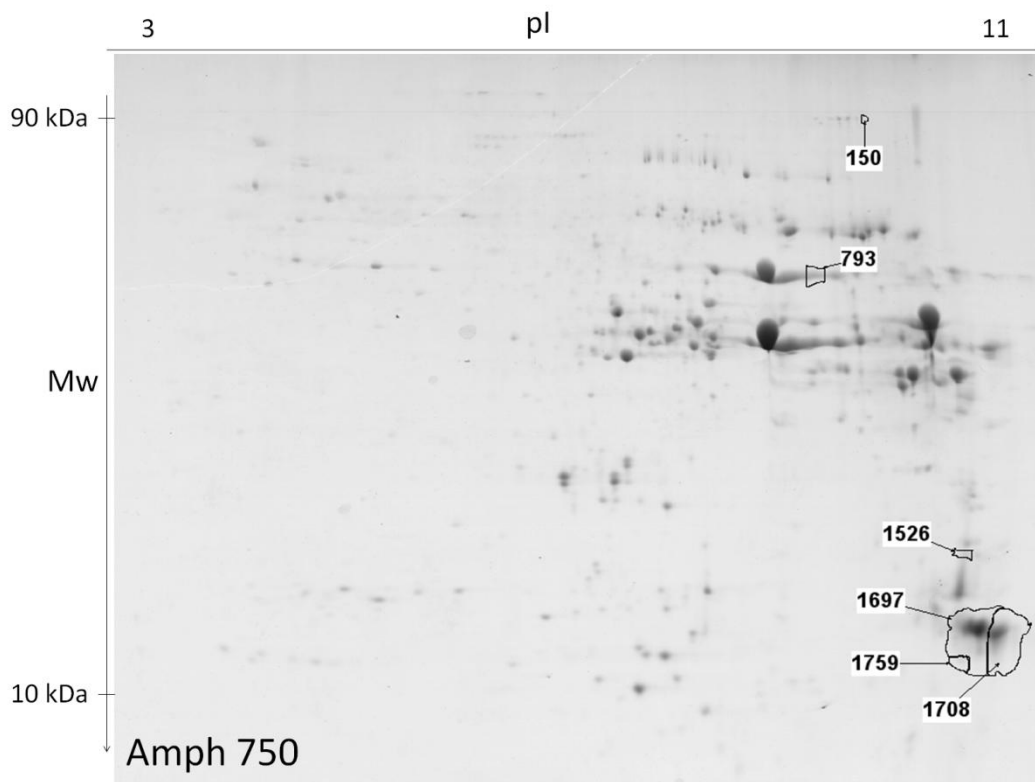


Figure S6.

2-DE gel (IPG x SDS-PAGE) of the amphiphilic proteins fraction at the 750°Cd stage (soft sample). Spots that differed significantly between hard and soft NILs ($p < 0.05$) and that were identified are encircled. Spot numbers correspond to those mentioned in Table 2.



Discussion - Perspectives

Dans le but de préciser le rôle biologique des puroindolines dans l'albumen du grain de blé, nous avons étudié le grain en développement de deux lignées quasi-isogéniques pour le caractère de dureté et différant essentiellement par l'absence ou la présence de puroindoline-a. Nous avons vérifié leur niveau d'isogénicité par différentes techniques génomique et protéomique qui nous ont indiqué que leur niveau de similarité était supérieur (99,38% et 99,31%, respectivement) au niveau théorique attendu (99,22%), constituant ainsi un modèle très intéressant pour l'étude de l'effet de l'absence du gène *Pina* sur la physiologie du développement du grain de blé.

Dans un premier temps, nous avons observé l'ultrastructure de l'albumen des deux lignées en développement et localisé les puroindolines par immunocytochimie. Puis, nous avons réalisé une étude des protéomes de ces deux lignées quasi-isogéniques sur du grain prélevé à des stades précis de développement. Nous avons également étudié la taille des polymères de protéines de réserve, ainsi que diverses caractéristiques phénotypiques sur des grains à maturité provenant de 3 années de récolte.

Les résultats marquants de nos études mettent en évidence :

- (1) une localisation des puroindolines sur la face interne des membranes vésiculaires et dans les corpuscules protéiques dès le début de leur formation,
- (2) une augmentation de l'expression des protéines de la machinerie de repliement et de réponse à un stress cellulaire dans la lignée Hard par rapport à la lignée Soft, dès la fin de la cellularisation de l'albumen,
- (3) une augmentation significative de la taille des polymères de protéines de réserve à maturité dans la lignée Hard par rapport à la lignée Soft.

Ces résultats suggèrent que les puroindolines interagissent avec les prolamines dès le début de leur synthèse. Elles seraient des protéines résidentes du réticulum endoplasmique (RE), impliquées dans le repliement ou l'assemblage des protéines de réserve, avant leur translocation commune dans les corpuscules et les vacuoles protéiques.

En l'absence de PINA dans la lignée Hard, nous avons vu que la taille des polymères de prolamines augmente, de même que l'indice de polydispersité. Ceci indique probablement une moindre régularité du repliement des polypeptides dans le RE et une augmentation de l'agrégation aléatoire des constituants du polymère, dans cette lignée.

Il est connu que le RE est un compartiment subcellulaire essentiel pour la synthèse massive des protéines de réserve où le contrôle de qualité du repliement des protéines néosynthétisées est finement régulé. En cas de déséquilibre entre la charge de protéines et la machinerie de repliement (par exemple les chaperones), un signal de stress est perçu qui déclenche une réponse cellulaire appelée UPR (Unfolded Protein Response) destinée à rétablir l'homéostasie (Bernales et al., 2006).

L'UPR fait appel à de nombreux senseurs localisés sur la membrane du RE qui vont générer des signaux et solliciter des réponses permettant d'accompagner ou de réprimer la synthèse protéique. Ainsi, dans la lignée Hard, il semble que l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE en plus de la charge normale génère un stress précoce et/ou plus intense déclenchant la cascade de signaux de l'UPR (activation des gènes codant pour des chaperones et des antioxydants, diminution de la transcription et de la traduction des ARNm, augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la synthèse des phospholipides (Schröder and Kaufman, 2005)). Nous avons pu observer une augmentation ou une diminution de l'expression de certains des acteurs associés à ces mécanismes lors de l'analyse protéomique. La différence dans l'expression des protéines de la machinerie de repliement et de réponse au stress, observée entre les deux lignées, n'est pas due à une charge supérieure en protéines de réserve dans la lignée Hard. En effet, nous avons montré que la teneur du grain en protéines totales n'est pas significativement différente entre Hard et Soft lorsqu'elle est rapportée au poids du grain de chaque lignée. C'est la raison pour laquelle nous pensons que l'amplification de la réponse de stress dans la lignée sans PINA est due à une charge supérieure en protéines mal repliées.

A la différence de la couche à aleurone, l'albumen amyloacé est par ailleurs un tissu qui est programmé pour mourir. La mort cellulaire programmée de l'albumen pourrait, comme dans d'autres cellules eucaryotes, être étroitement associée à l'UPR. Il est probable que la modification de la cinétique du développement du grain Hard, par comparaison au Soft, soit la conséquence directe d'une modification de la réponse UPR lors du stress du RE, entraînant une induction précoce du programme de mort cellulaire (PCD) dans la lignée Hard. Une des voies pour confirmer cette hypothèse serait de doser dans les deux lignées le cytochrome c qui, libéré par les mitochondries perméabilisées par les ROS, initie une cascade de signaux conduisant à la mort cellulaire programmée.

Les puroindolines présentent des caractéristiques structurales uniques chez les végétaux : leur domaine riche en tryptophane (TRD) et leurs 10 résidus cystéines formant des ponts disulfures. Peut-on relier ces domaines structuraux à leur fonction ? Les données acquises sur la structure et les propriétés *in vitro* de ces protéines ont montré que le TRD interagit de façon électrostatique et hydrophobe avec les membranes biologiques et notamment avec les phospholipides. Par ailleurs, nous avons localisé les puroindolines au contact des membranes vésiculaires et au sein des corpuscules protéiques, puis dans la matrice protéique. On peut donc faire l'hypothèse que leur rôle biologique met en jeu une interaction avec les lipides membranaires endocellulaires. Il est parallèlement intéressant de noter que le même routage a été décrit pour d'autres molécules impliquées dans le repliement et/ou l'assemblage des protéines telles que BiP (Levanony et al., 1992) et PDI (Shimoni et al., 1995). Ces diverses observations nous conduisent à supposer que les

puroindolines pourraient faire partie d'un complexe protéique présent sur la face interne de la membrane du RE interagissant avec les protéines de réserve néosynthétisées pour permettre un repliement correct et/ou éviter leur agrégation trop précoce. Certaines cystéines des puroindolines, spatialement trop espacées pour former un pont disulfure intramoléculaire stable (Lesage et al., 2011), pourraient être impliquées dans la stabilisation des prolamines par création de ponts disulfures intermoléculaires. L'existence de liaisons covalentes entre les puroindolines et les prolamines n'a jamais été montrée, probablement parce que les études protéomiques ont été faites sur des culots protéiques réduits. Néanmoins, nous avons observé dans plusieurs études que des γ -gliadines, usuellement solubilisées dans l'éthanol, sont extraites avec les protéines amphiphiles, suggérant une liaison entre elles. Toutes les protéines extraites avec les amphiphiles n'ayant pas été identifiées, il est également possible que des gluténines de faible poids moléculaire soient aussi présentes. Cette liaison probable des puroindolines aux prolamines était inconnue et l'étude de leurs interactions sur la texture de l'albumen constitue une perspective extrêmement intéressante.

Il reste donc à mettre en évidence ces interactions protéine-protéine et à déterminer si ces liaisons probables entre les cystéines des puroindolines et des prolamines sont temporaires ou définitives. Nous avons vu au cours du développement, qu'après leur localisation sur les membranes, les puroindolines sont réparties uniformément à l'intérieur des corps protéiques contenant les prolamines. On peut en déduire que leur liaison à la membrane est temporaire ; en revanche, nous ne savons pas si elles restent liées aux prolamines dans les corps protéiques puis dans la matrice. Cependant, le fait que l'extraction de ces protéines, très solubles dans l'eau après extraction et purification, nécessite la présence de détergent tend à prouver qu'elles restent liées aux protéines de réserve. Il serait intéressant d'étudier quels types de liaisons sont à la base de cette interaction. Il conviendrait pour cela d'étudier les protéines de réserve réduites et non-réduites afin de comprendre comment se constituent les polymères dans ces deux lignées. Il serait également primordial de savoir si les ratios gliadines /gluténines d'une part et gluténines FPM/ gluténines HPM d'autre part sont affectés par l'absence de puroindolines et comment les différences éventuelles se mettent en place au cours du développement du grain. Il faudrait étudier en particulier l'incidence de la présence/absence des puroindolines, et du statut redox associé, sur la polymérisation de diverses compositions alléliques des sous-unités gluténines. On sait en effet que la taille des polymères varie en fonction de la composition allélique des gluténines FPM et HPM (Branlard et al., 2008), mais on ignore l'effet des variants des puroindolines sur cette taille. Nous disposons de nombreuses lignées nulles pour l'un des allèles de gluténines, que nous pourrions utiliser pour construire des génotypes permettant d'étudier l'effet, sur le stress oxydant et la polymérisation, de combinaisons de présence/absence de puroindolines et d'allèles de gluténines. D'autre part, l'utilisation des blés medium-hard, qui possèdent *Pina* mais ont en général une mutation ponctuelle dans le gène *Pinb*,

semble une voie intéressante pour diversifier les sources de dureté, donc potentiellement le mode d'action des puroindolines. On peut aussi imaginer l'intérêt qu'il y aurait à construire un génotype hexaploïde sans puroindolines, à la fois sur un plan théorique et pour ses propriétés technologiques. Cette lignée aurait beaucoup d'avantages du point de vue de la qualité car elle disposerait de tous les allèles de prolamines, y compris ceux portés par le génome D, et on peut penser que l'absence des deux puroindolines induirait une augmentation de la taille des polymères de protéines de réserve. Ainsi, l'utilisation des différents allèles de puroindolines, couplée à celle des allèles de gluténines, pourrait être une voie de gestion des propriétés des polymères de protéines de réserve pour la valeur d'usage des farines.

Si l'on admet l'hypothèse selon laquelle l'absence de PINA induit une amplification du stress cellulaire lors du développement de l'albumen Hard déclenchant les mécanismes liés à l'UPR, on peut mieux comprendre les nombreux effets pléiotropiques, liés à la dureté, et détectés dans le grain à maturité.

Le premier effet qui ne peut qu'être multifactoriel est le poids de mille grains. Les grains Hard sont significativement plus petits (4,4 %) que les Soft, ce qui pourrait être lié à l'augmentation du stress et à une durée d'accumulation écourtée en raison d'une PCD plus précoce. On remarque en outre un effet des conditions agroclimatiques sur le PMG de ces lignées quasi-isogéniques, probablement dû, au moins pour l'année 2010, à un effet du stress thermique en fin de développement du grain.

De même, de nombreux QTL expliquant des parts variables de la dureté ont été localisés sur presque tous les groupes d'homéologie, montrant ainsi que la dureté est probablement liée à de nombreux caractères (Bordes et al., 2011; Groos et al., 2004; Li et al., 2009; Osborne et al., 2001; Sourdille et al., 1996; Tsilo et al., 2011; Turner et al., 2004; Zhang et al., 2009). Ces QTL sont quelquefois co-localisés avec des QTL impliqués dans la quantité de protéines de la farine et dans la quantité de gluten. Nous avons, nous aussi, mis en évidence une corrélation positive entre dureté et quantité de protéines, mais nous avons vu que cette corrélation n'existait plus lorsqu'on rapportait la quantité de protéines au poids du grain. En revanche, la dureté est nettement corrélée à l'augmentation de la taille des polymères de protéines de réserve dans les lignées Hard, pouvant expliquer la co-localisation des QTL de dureté et de quantité de gluten.

Il a été montré que des QTL de texture du grain sont liés à la couleur de la farine (Bordes et al., 2011; Tsilo et al., 2011). Nous avons également mis en évidence une relation entre la dureté et la couleur de la farine blanche et des sons pour les LQI de Falcon. La farine Soft est plus blanche que la farine Hard. En revanche, les valeurs de jaune et de rouge sont plus élevées dans la farine Hard que dans la farine Soft. Cela pourrait être dû à une quantité différente de pigments de type caroténoïdes, qui ont une fonction antioxydante. Cependant, il est également possible d'imaginer que le statut redox de

l'albumen pourrait avoir une influence sur la couleur finale de la farine, éventuellement par l'intermédiaire d'une oxydation des lipides, potentiellement plus forte dans la lignée Hard. La part de chaque hypothèse reste à démontrer par la mesure du contenu en différents pigments et en éventuels lipides oxydés dans la farine blanche des deux lignées quasi-isogéniques.

Les sons de la lignée Hard présentent une couleur rouge plus marquée que ceux de la lignée Soft, ce qui peut indiquer une synthèse plus importante d'anthocyanes, qui ont, comme les caroténoïdes, des propriétés antioxydantes. L'analyse protéomique a montré que la Rubisco était surexprimée dans la lignée Hard suggérant que la photosynthèse dans le péricarpe du grain Hard pourrait être plus forte que dans celui du grain Soft. Les différents pigments pourraient être présents en plus grande quantité dans la lignée Hard afin de maintenir un ratio adéquat avec la quantité de chlorophylle, permettant de remplir leur rôle d'absorption de l'énergie lumineuse lors de la photosynthèse et de protection antioxydante de la chlorophylle.

La corrélation, rapportée dans la littérature, entre la dureté et les lipides polaires libres pourrait être un autre exemple de pléiotropie et pourrait être due à la mise en place précoce de l'UPR qui induit une augmentation de la synthèse de phospholipides (Schröder and Kaufman, 2005). La composition en lipides de grains en développement des deux LQI pourrait être déterminée pour vérifier cette hypothèse.

Nous avons également montré une corrélation, en général très significative, entre la dureté et la quantité des trois types de granules d'amidon. Le volume occupé par les gros granules de type A est plus grand dans les lignées Soft que dans les lignées Hard et ceux des granules de type B et C sont plus petits. Cette influence de la dureté sur le métabolisme de l'amidon, probablement par l'intermédiaire du stress oxydant, a aussi été observée sur les protéomes des deux lignées. La plus grande abondance d'une starch debranching enzyme dans la lignée Hard à 500°Cj laisse supposer une dégradation de l'amidon en cours de développement, peut-être pour fournir de l'énergie à l'albumen soumis précocement à la PCD. On peut supposer que la dégradation a préférentiellement lieu dans les granules de type A dans la lignée Hard, ce qui expliquerait qu'ils soient moins gros que dans la lignée Soft. Il serait souhaitable d'analyser les quantités d'amidon, d'amylose et d'amylopectine, ainsi que la taille des polymères d'amylopectine au cours du développement du grain, dans les deux lignées quasi-isogéniques, pour mieux comprendre comment le métabolisme de ces composés est affecté par le stress de l'albumen. Une deuxième explication, plus physique, de la différence de taille des granules d'amidon pourrait reposer sur la rigidité plus précoce de la matrice protéique dans la lignée Hard, bloquant physiquement la croissance des gros granules, tandis que les espaces encore libres seraient disponibles pour la croissance des petits granules. L'espace intracellulaire serait alors beaucoup plus rempli induisant des contacts plus nombreux entre granules et matrice qui pourraient expliquer une dureté plus importante. Il convient de rappeler, en appui de

cette explication hypothétique faisant appel à des contacts physiques, que l'albumen Soft montre de nombreux espaces vides entre matrice protéique et granules d'amidon.

Enfin, il reste à montrer formellement que la modification de la taille des polymères de prolamines est bien la raison physique de la modification de la dureté du grain. Un élément très intéressant à l'appui de cette hypothèse a été apporté par la modélisation mécanique de la dureté et de la fragmentation du blé. Celle-ci indique que la rigidité en compression de l'albumen est une fonction linéaire croissante du volume de la matrice protéique (Topin et al., 2009). La démonstration concrète de la relation de cause à effet entre la dureté et la taille des polymères de prolamines pourrait être apportée par deux expérimentations. En premier lieu, il conviendrait d'évaluer, dans deux conditions contrôlées, témoin et stress thermique, la taille de ces polymères et la dureté sur les grains des deux lignées quasi-isogéniques cultivées. Les stress thermique et hydrique ayant respectivement un effet sur la dureté (Gibson et al., 1998) et la polymérisation des protéines de réserve (Carceller and Aussenac, 2001), il est essentiel de contrôler la température et l'humidité au cours du développement des plantes et du remplissage du grain. En appliquant un stress thermique sur les deux lignées Hard et Soft au cours du remplissage du grain, sans stress hydrique, on s'attend à observer une augmentation de la dureté dans chaque lignée par rapport au témoin non stressé de la même lignée. Si on observe corrélativement une augmentation de la taille des polymères protéiques par rapport à la condition témoin, nous pourrions en conclure que le même stress environnemental a un effet sur les deux caractères, dans chacun des génotypes. Ensuite, il faudrait envisager des mesures physiques sur la matrice protéique isolée à maturité pour tester sa résistance dans chacune des quatre conditions de culture. Cela représente un défi technique qui nécessitera une mise au point probablement difficile. Il faudrait en effet pouvoir mesurer la résistance de très petits fragments de matrice protéique, ne contenant pas de granules d'amidon.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'absence de puroindoline-a (qui est aussi celui de la présence de la puroindoline-b seule) qui provoque une forte dureté du grain. Il est à noter que la délétion de *Pina* n'est pas rare alors que le gène *Pinb* est rarement délété, bien que souvent muté. Les mutations ponctuelles de *Pinb* induisent des duretés intermédiaires entre Soft et Hard. Ce fait amène à supposer qu'il peut exister une différence de fonctionnalité entre ces deux gènes. Pour vérifier cela, il serait intéressant d'étudier l'effet, sur la taille des polymères de prolamines et sur le stress cellulaire, de l'inactivation de *Pinb* par RNAi, d'une part, et des différentes mutations ponctuelles connues dans le gène *Pinb*, d'autre part.

Les puroindolines sont à la fois des protéines très importantes pour la valeur d'utilisation des farines et des protéines non indispensables au fonctionnement du grain de blé, puisqu'il poursuit son

développement en leur absence, comme dans le cas du blé tétraploïde qui en est totalement dépourvu. Il semble même qu'il ne puisse en supporter plusieurs doses puisque les gènes de puroindolines ne sont présents qu'à l'état diploïde, même dans un contexte hexaploïde comme le blé tendre. D'autres études seront nécessaires pour en comprendre la raison.

Références

- Bernales, S., Papa, F.R., Walter, P. (2006) Intracellular Signaling by the Unfolded Protein Response: Annual Review of Cell and Developmental Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**(1), 487-508.
- Bordes, J., Ravel, C., Le Gouis, J., Lapiere, A., Charmet, G., Balfourier, F. (2011) Use of a global wheat core collection for association analysis of flour and dough quality traits. *Journal of Cereal Science*, **54**(1), 137-147.
- Branlard, G., Oury, F.X., Martre, P., Aussenac, T., Regnard, J.B. (2008) Etude et prédiction des fractions protéiques de réserve et indices de sélection pour la qualité. In *Synthese des programmes de recherche FSOV*: pp 68-73.
- Carceller, J.-L. and Aussenac, T. (2001) SDS-insoluble glutenin polymer formation in developing grains of hexaploid wheat: the role of the ratio of high to low molecular weight glutenin subunits and drying rate during ripening. *Functional Plant Biol.*, **28**(3), 193-201.
- Gibson, L.R., McCluskey, P.J., Tilley, K.A., Paulsen, G.M. (1998) Quality of hard red winter wheat grown under high temperature conditions during maturation and ripening. *Cereal Chemistry*, **75**(4), 421-427.
- Groos, C., Bervas, E., Charmet, G. (2004) Genetic Analysis of Grain Protein Content, Grain Hardness and Dough Rheology in a Hard X Hard Bread Wheat Progeny. *Journal of Cereal Science*, **40**(2), 93-100.
- Lesage, V.S., Bouchet, B., Rhazi, L., Elmorjani, K., Branlard, G., 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**(2), 231-238.
- Levanony, H., Rubin, R., Altschuler, Y., Galili, G. (1992) Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *Journal of Cell Biology*, **119**(5), 1117-1128.
- Li, Y., Song, Y., Zhou, R., Branlard, G., Jia, J. (2009) Detection of QTLs for bread-making quality in wheat using a recombinant inbred line population. *Plant Breeding*, **128**(3), 235-243.
- Osborne, B.G., Turnbull, K.M., Anderssen, R.S., Rahman, S., Sharp, P.J., Appels, R. (2001) The Hardness Locus in Australian Wheat Lines. *Australian Journal of Agricultural Research*, **52**(11-12), 1275-1286.
- Schröder, M. and Kaufman, R.J. (2005) THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. *Annual Review of Biochemistry*, **74**(1), 739-789.
- Shimoni, Y., Zhu, X., Levanony, H., Segal, G., Galili, G. (1995) Purification, Characterization, and Intracellular Localization of Glycosylated Protein Disulfide Isomerase from Wheat Grains. *Plant Physiology*, **108**(1), 327-335.
- Sourdille, P., Perretant, M.R., Charmet, G., Leroy, P., Gautier, M.F., Joudrier, P., Nelson, J.C., Sorrells, M.E., Bernard, M. (1996) Linkage Between Rflp Markers and Genes Affecting Kernel Hardness in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**(4), 580-586.
- Topin, V., Radjāi, F., Delenne, J.-Y., Mabilhe, F. (2009) Mechanical modeling of wheat hardness and fragmentation: Selection of Papers from the Symposium Powder Science and Technology - Powders and Sintered Material STP-PMF 2007 Symposium on Powder Science and Technology - Powders and Sintered Material STP-PMF 2007. *Powder Technology*, **190**(1-2), 215-220.
- Tsilo, T.J., Simsek, S., Ohm, J.B., Hareland, G.A., Chao, S.M., Anderson, J.A. (2011) Quantitative Trait Loci Influencing Endosperm Texture, Dough-Mixing Strength, and Bread-Making Properties of the Hard Red Spring Wheat Breeding Lines. *Genome*, **54**(6), 460-470.
- Turner, A.S., Bradburne, R.P., Fish, L., Snape, J.W. (2004) New Quantitative Trait Loci Influencing Grain Texture and Protein Content in Bread Wheat. *Journal of Cereal Science*, **40**(1), 51-60.
- Zhang, Y., Wu, Y., Xiao, Y., Yan, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Ma, C., Xia, X., He, Z. (2009) Qtl Mapping for Milling, Gluten Quality, and Flour Pasting Properties in a Recombinant Inbred Line Population Derived From a Chinese Soft * Hard Wheat Cross. *Crop & Pasture Science*, **60**(6), 587-597.

Conclusion

Le but de cette thèse était de mieux comprendre la fonction biologique des puroindolines.

En raison de leurs propriétés de liaison aux lipides, nous avons formulé l'hypothèse initiale que leur fonctionnalité devait probablement être en relation avec les structures endomembranaires des cellules de l'albumen. Cela semble être confirmé par leur localisation au contact des membranes vésiculaires. De plus, nous avons pour la première fois mis en évidence leur interaction avec les protéines de réserve, en lien avec l'augmentation du stress oxydant au cours du développement du grain. Les puroindolines sont co-localisées avec les protéines de réserve et suivent le même routage cellulaire dans la voie sécrétoire, du RE vers les corpuscules protéiques. Elles ont de plus une influence sur la taille des macropolymères protéiques. Elles induisent ainsi un changement dans la structure de la matrice amylo-protéique et *in fine* dans les qualités technologiques de la farine.

Ce travail a permis de progresser dans la compréhension de la fonction cellulaire des puroindolines. Nous avons montré que ces protéines, associées à la tendreté du grain et initialement à un rôle de défense contre les agents pathogènes, ont probablement une fonction dans les mécanismes de repliement et d'assemblage des prolamines. Leur absence amplifie le stress oxydant de l'albumen au cours du remplissage du grain.

Ces résultats ouvrent de nouveaux champs de recherche dans le domaine du contrôle de la texture du grain et de sa stabilité. Peut-on utiliser les puroindolines pour contrôler le stress de l'albumen et faire varier l'état d'agrégation des protéines de réserve ? L'agrégation des protéines est liée au statut redox des cellules de l'albumen. Mais le métabolisme d'oxydo-réduction de l'albumen en développement est lui-même peu connu. Nos résultats indiquent que son exploration, notamment par l'analyse des mécanismes moléculaires liés à la voie UPR dans le grain de blé, devra prendre en compte la nature des allèles de puroindolines. Il faudra également y associer l'effet de la diversité allélique des protéines de réserve pour appréhender les modifications de la texture du grain et sa stabilité.

Nos travaux, en mettant en lumière la nécessité d'étudier les stress, thermique, hydrique et oxydant, pour mieux comprendre le développement du grain, ouvrent la voie à l'obtention de nouvelles connaissances sur les mécanismes de régulation de la polymérisation des protéines et sur l'accumulation des réserves. Sans nul doute, cela donnera aux généticiens de nouveaux éléments pour la sélection de blés ayant une plus grande stabilité de leur qualité.

Annexes

Annexe 1. Pina-D1 alleles in *T. aestivum* and *Ae. tauschii* (Bhave and Morris, 2008)

Allele designation ^a	Nature of mutation ^b , original allele designation (if applicable)	Genetic source, representative Genbank accession(s) ^c	References
Pina-D1	Wild type	<i>T. aestivum</i> (X69914)	Gautier et al. (1994)
Pina-D1a	Wild type	<i>T. aestivum</i> (DQ363911)	Giroux and Morris (1997)
		<i>T. aestivum</i> (CR626934)	Chantret et al. (2005)
Pina-D1b	Gene deletion	<i>T. aestivum</i> (NA)	Giroux and Morris (1998)
Pina-D1c	One SNP. Arg58Gln	<i>Ae. tauschii</i> (AY252031)	Massa et al. (2004)
Pina-D1d	Two SNPs. Arg58Gln + one synonymous mutation	<i>Ae. tauschii</i> (AY252043)	Massa et al. (2004)
Pina-D1e	Two SNPs. Arg58Gln + one synonymous mutation	<i>Ae. tauschii</i> (AY252034)	Massa et al. (2004)
Pina-D1f	Three SNPs. Arg58Gln + two synonymous mutations	<i>T. aestivum</i> (AY251998)	Massa et al. (2004)
Pina-D1g	One SNP. One synonymous mutation	<i>Ae. tauschii</i> (AY252029)	Massa et al. (2004)
Pina-D1h	Two SNPs. Arg58Gln + one synonymous mutation	Synthetic wheat (AY573898)	Gedye et al. (2004)
Pina-D1i	Two SNPs. Arg58Gln + Arg21Ser	Synthetic wheat (AY573899)	Gedye et al. (2004)
Pina-D1j	Arg58Gln + Pro108Arg + one synonymous mutation	Synthetic wheat (AY573900)	Gedye et al. (2004)
Pina-D1k	Multiple deletions (Pina-D1b/PinbD1h(t)) 'double null' 'double null'	<i>T. aestivum</i> Red Egyptian 5D (NA)	Tranquilli et al. (2002)
		<i>T. aestivum</i> Chosen 68 (NA)	Ikeda et al. (2005)
		<i>T. aestivum</i> Gaiyuerui (NA)	Chang et al. (2006)
Pina-D1l	One-base deletion, frame-shift Gln 61Lys, then a stop codon downstream (Pina-D1c)	<i>T. aestivum</i> KT020-584 (NA)	Tanaka et al. (2007)
		<i>T. aestivum</i> Fortuna, Glenman (NA)	Gazza et al. (2005)
Pina-D1m	One SNP. Pro35Ser	<i>T. aestivum</i> five Chinese landraces (NA)	Chen et al. (2006)
Pina-D1n	One SNP. Trp43Stop	<i>T. aestivum</i> one Chinese landrace (EF620907)	Chen et al. (2006)
Pina-D1o	Two SNPs. Arg58Gln + one synonymous mutation	<i>T. aestivum</i> five Chinese landraces (EF620908)	Chen et al. (2006)
Pina-D1p	One SNP, V13E in the leader peptide. Then one-base deletion, frame-shift at Cys110Ala, then a stop codon downstream	<i>T. tauschii</i> RM0182 (AY608595)	Huo et al. (unpublished)
		<i>T. aestivum</i> Jing 771 (AY599893)	Chang et al. unpublished;
Pina-D1q	a2, Pina-D1p Two SNPs. Asn111Lys, Ile112Leu	<i>T. aestivum</i> lu-27 (AB181238)	McIntosh et al. (2006)
			Chang et al. (2006)

a As per Morris and Bhave (2007); relevant allele designations updated in the Catalogue of Gene Symbols for wheat: 2007 Supplement (McIntosh et al. 2007)

b Substitutions in relation to the wild type amino acid sequence assuming mature protein starts at Asp29 (from the initiating Met) as per established numbering of residues

c NA: Genbank accession number and/or full DNA sequence information not available

Additional alleles (Ikeda et al., 2010)

Pina-D1r	Deletion 4.4 kbp beginning at + 371 within the coding region	<i>T. aestivum</i> one Korean, 2 Chinese cv	Ikeda et al. (2010)
Pina-D1s	Deletion 10.4 kbp beginning at - 5112 upstream of the coding region	<i>T. aestivum</i> 3 Chinese, 9 Japanese cv	Ikeda et al. (2010)

Annexe 2. Pinb-D1 alleles in *T. aestivum* and *Ae. tauschii* (Bhave and Morris, 2008)

Allele designation ^a	Nature of mutation ^b , original allele designation (if applicable)	Genetic source, representative Genbank accession(s) ^c	References
Pinb-D1	Wild type	<i>T. aestivum</i> (X69912)	Gautier et al. (1994),
Pinb-D1a	Wild type	<i>T. aestivum</i> (DQ363913)	Giroux and Morris (1997)
Pinb-D1b	One SNP. Gly46Ser	<i>T. aestivum</i> (DQ363914)	Giroux and Morris (1997),
		<i>T. aestivum</i> (CR626934)	Chantret et al. (2005)
Pinb-D1c	One SNP. Leu60Pro	<i>T. aestivum</i> (NA)	Lillemo and Morris (2000)
Pinb-D1d	One SNP. Trp44Arg	<i>T. aestivum</i> (NA)	Lillemo and Morris (2000)
Pinb-D1e	One SNP. Trp39 to stop codon	<i>T. aestivum</i> (NA)	Morris et al. (2001a)
Pinb-D1f	One SNP. Trp44 to stop codon	<i>T. aestivum</i> (NA)	Morris et al. (2001a)
Pinb-D1g	One SNP. Cys56 to stop codon	<i>T. aestivum</i> (NA)	Morris et al. (2001a)
(Pina-D1k)	Multiple gene deletions Pinb-D1h(t)	<i>T. aestivum</i> three Korean, two North American varieties	Ikeda et al. (2005)
Pinb-D1h	Twenty-nine SNPs. 14 amino acid substitutions ^{b,d}	<i>Ae. tauschii</i> (AY251983)	Massa et al. (2004)
Pinb-D1i	Thirty SNPs. 14 amino acid substitutions ^{b,d}	<i>Ae. tauschii</i> (AY251989)	Massa et al. (2004)
		<i>Ae. tauschii</i> TA1704, TA2381 (AY649747)	Morris et al. (2001b)
	Pinb-D1w	<i>Ae. tauschii</i> Q03-002 (DQ257533)	Simeone et al. (2006)
	Allele 2, Pinb-D1w	<i>Ae. tauschii</i> CR626926	Chen et al. (2005a, b)
Pinb-D1j	Nineteen SNPs. 9 amino acid substitutions ^b	<i>Ae. tauschii</i> (AY251962)	Chantret et al. (2005)
Pinb-D1k	Thirty-one SNPs. 14 amino acid substitutions ^{b,d}	<i>Ae. tauschii</i> (AJ302108)	Massa et al. (2004)
Pinb-D1l	Lys45Glu	<i>T. aestivum</i> GaoCheng 8901 (NA)	Lillemo et al. (2002)
Pinb-D1m	Twenty-eight SNPs. 14 amino acid substitutions ^{b,d}	Synthetic wheat (AY573901)	Pan et al. (2004)
Pinb-D1n	Twenty-nine SNPs. 14 amino acid substitutions ^{b,d}	Synthetic wheat (AY573902)	Gedye et al. (2004)
Pinb-D1o	Twenty-eight SNPs. 14 amino acid substitutions ^{b,d}	Synthetic wheat (AY573903)	Gedye et al. (2004)
Pinb-D1p	One-base deletion, frame-shift at Lys42Asn, then a stop codon at 60. Pinb-D1i(t), Pinb-D1v Pinb-D1z b3, Pinb-D1u	<i>T. aestivum</i> several Chinese varieties (NA)	Xia et al. (2005)
		<i>T. aestivum</i> Chinese landrace Qingdao 1	Ikeda et al. (2005)
		<i>T. aestivum</i> dahuangpi (AY581889)	Chang et al. (2006)
		<i>T. aestivum</i> dahuangpi (AB177391)	
Pinb-D1q	One SNP. Trp44Leu	<i>T. aestivum</i> Chinese variety Jingdong 11(EF620909)	Chen et al. (2005a)
(Pina-D1k)	Gene deletion Pinb-D1q	<i>T. aestivum</i> CS (Red Egyptian 5D) (NA)	Tranquilli et al. (2002); McIntosh et al. (2006)
Pinb-D1r	One-base deletion, frame-shift at Glu14Gly, then a stop codon at 48. Pinb-D1h	<i>T. aestivum</i> . Hyb65 (AJ619022)	Ram et al. (2005), McIntosh et al. (2005)
Pinb-D1s	One-base deletion + one SNP. Frameshift at Glu14Gly, then a stop codon at 48. Pinb-D1h	<i>T. aestivum</i> . NI5439 (AJ619021)	Ram et al. (2005), McIntosh et al. (2005)
Pinb-D1t	One SNP. Gly47Arg	<i>T. aestivum</i> Guangtouxiamai (EF620910)	Chen et al. (2006)
Pinb-D1u	One-base deletion, frame-shift at Glu14Ser, then a stop codon at 18.	<i>T. aestivum</i> spp. yunnanense Tiekemai (EF620911)	Chen et al. (2007)

Table 2 continued

Allele designation ^a	Nature of mutation ^b , original allele designation (if applicable)	Genetic source, representative Genbank accession(s) ^c	References
Pinb-D1v	Two SNPs, Ala8Thr and Leu9Ile in the leader peptide. b5, Pinb-D1y	T. aestivum Tachun 3 (AY598029) T. aestivum (AB177390)	Chang et al. (2006) McIntosh et al. (2006)
Pinb-D1w	Same as wild type PINB	T. aestivum Jing 771 (AY640304)	Chang et al. 2006
Pinb-D1aa	One SNP. Ser115Ile: b4, Pinb-D1x Then one-base deletion, frame-shift at Lys42Asn, then a stop codon at 60.	T. aestivum Jing 771 (AB180737) T. aestivum Changmangtoulongbai (EF620912)	McIntosh et al. (2006) Li et al. (2007)
Pinb-D1ab	One SNP. Gln99stop.	T. aestivum KU3062, KU3069 (AB302894)	Tanaka et al. (2007)

a As per Morris and Bhave (2007); relevant allele designations updated in the Catalogue of Gene Symbols for wheat: 2007 Supplement (McIntosh et al. 2007); allele designations Pinb-D1x, y and z are unassigned at this stage

b Substitutions in relation to the wild type amino acid sequence, assuming mature protein starts at Glu30 (from the initiating Met) as per established numbering of residues

c NA: Genbank accession number and/or full DNA sequence information not available

d Alleles Pina-D1h, I, k, m, n and o encode an identical protein product

Annexe 3. Pedigree du cultivar Falcon.

Source: <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>

Accession name	FALCON
Synonym	
Pedigree	BENCUBBIN//DUNDEE/GULAR/3/GULAR;GULAR//DUNDEE/GULAR/3/BENCUBBIN; DUNDEE/GULAR//BENCUBBIN (F4) /3/GULAR
Other number	K-44494;PI-292578;PI-304389;AUS-206
Species	<i>Triticum aestivum</i> L. (2n=42)
Variety	albidum
Type	spring
Locality	AUS:New-South-Wales
Genes, alleles	Ne1w;D1,D3;Vrn1;Kr1,Kr2;Nor-B1a-,Nor-B2g;Nor-B2g;Nor-B1e;Glu-A1b,Glu-B1i,Glu-D1a,Glu-A3e,Glu-B3b,Glu-D3b;Gli-A1m,Gli-B1b,Gli-D1f;Pina-D1b;ha;
Status	Released cultivar
Year	1960
Last update	25.10.2003
Comments	<p>1.1. ORIGINATOR: Wagga Agricultural Research Institute</p> <p>1.2. RECOMMENDED FOR: AUS (NSW)</p> <p>1.3. YEARS: 1960-</p> <p>2. MATURING: ME</p> <p>3. MARKET CLASS:</p> <p>4. QUALITY: Md</p> <p>5.1. RESISTANCE: Dr,He;Fs;Lg</p> <p>5.2. TOLERANCE:</p> <p>5.3. MODERATE RESISTANCE: Lg</p> <p>5.4. SUSCEPTIBILITY: Lr,Sr;Pm,Lr,Stb;Pm,Lr</p> <p>6.1. SENSITIVITY:</p> <p>6.2. INSENSITIVITY:</p> <p>7. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS: Mod</p> <p>10. COMMENTS:</p>

