

**Etude de la globuline des graines de Tournesol (*Helianthus annuus* L.) :
accumulation au cours de la maturation et localisation intracellulaire**

E. FERJANI* et G. LEDOIGT**

*Ecole Normale supérieure, 70121 Bizerte, Tunisie, et

**Laboratoire de Phytomorphogenèse UA 45 C.N.R.S., Biologie et Physiologie Végétales,
Université Clermont II, 4 rue Ledru, 63038 Clermont-Ferrand, France

Study of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seed Globulin: Accumulation and Intracellular Localization

Abstract. Protein synthesis and accumulation in growing sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Aïrelle) seeds are studied. The salt soluble fraction, globulin, is the main soluble protein component. The earlier stages of seed development (10 days after flowering) are characterized by high M_r polypeptides (74,58 and 44 kDa). Later stages mainly show nature globulin polypeptides. Thus, protein synthesis in seed occurs at a specific period of seed development which follows a period of fast cell divisions (0–14 days after flowering). Protein bodies are isolated and their protein composition analyzed. Globulin subunits are the main polypeptides of protein bodies soluble fraction. Mature globulin is only stored in protein bodies.

Les protéines de réserve de graines végétales sont, pour la plupart, localisées dans des organites spécifiques appelés corps protéiques (TULLY et BEEVERS 1976). Ces organites sont souvent entourés d'une membrane de 80 à 100 Å (PUSZTAI *et al.* 1978, WEBER et NEUMANN 1980) et montrent des tailles assez variables d'une plante à une autre et d'un tissu à un autre, en général entre 0,1 et 25 μm (PERNOLLET 1978, WEBER et NEUMANN 1980). Chez le Tournesol, les corps protéiques ont des diamètres de 2 à 5 μm et renferment des globoides inclus dans la matrice protéique (PSARAS 1985). Des études antérieures (SCHWENKE et RAAB 1973, DALGALAR-RONDO *et al.* 1984, FERJANI et LEDOIGT 1987, THIS *et al.* 1988) ont montré que les protéines de réserve des graines de tournesol sont constituées essentiellement de deux espèces protéiques, globuline et albumine.

La globuline, ou encore hélianthinine, constitue la fraction majoritaire et présente les mêmes caractéristiques que les protéines de réserve de type 11S (HIGGINS 1984, FERJANI 1988). Nous avons montré par ailleurs que la synthèse de la globuline implique l'élaboration de quatre précurseurs de haute masse moléculaire. Cette synthèse s'effectue sur les membranes du reticulum endoplasmique et des corps

Reçu le 23 novembre, 1989; accepté le 27 février, 1990

protéiques (FERJANI *et al.* 1989). Dans le présent travail, nous développons l'analyse des protéines, plus particulièrement la globuline, au cours de la maturation du grain de tournesol ainsi que l'étude de la localisation intracellulaire de cette même protéine.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal

Le Tournesol (*Helianthus annuus* cv. Airelle) est cultivé dans une chambre climatisée (25 °C). Les grains, en cours de développement, sont récoltés à des moments précis après la floraison du capitule. Les grains, entiers ou après décortilage, sont utilisés immédiatement ou bien conservés dans l'azote liquide, pour le fractionnement cellulaire et l'extraction des protéines.

Extraction des protéines

La méthode de SABIR *et al.* (1973) est utilisée avec les modifications suivantes. La farine, obtenue après broyage à froid (4 °C) des grains décortiqués mais non délipidés, est homogénéisée dans un tampon phosphate de sodium 0,002 M (pH 7,2) contenant 0,45 M NaCl; 0,005 % PMSF et 0,01 M 2-mercaptoéthanol (1 g farine/10 ml tampon d'extraction). Le mélange est agité dans un flacon bouché, à froid, pendant 45 min. Après centrifugation à $10\,000 \times g$ pendant 10 min, le culot est repris pour une deuxième extraction, identique à la première. Les deux surnageants sont alors rassemblés et filtrés sur filtre Whatmann de 0,45 µm.

Dosage des protéines

Protéines totales. La quantité de protéines totales des grains de Tournesol est estimée par le dosage de l'azote selon la procédure de micro-Kjeldahl. La teneur en protéines totales est donnée par la relation : $P = 6,25 N$.

Protéines solubles. Les extraits de protéines sont dosées selon la méthode de BRADFORD (1976).

Extraction et dosage de la globuline

La technique d'isolement de la globuline à partir des grains entiers et sa quantification sont effectuées selon le procédé d'ADLER et MÜNTZ (1983) qui séparent la globuline des albumines par trois extractions répétées avec un tampon

Abbréviations : DOC = désoxycholate de sodium ; JaF = jour après floraison ; kDa = kilo dalton ; PAGE = électrophorèse en gel de polyacrylamide ; PMSF = phényl méthyl sulfonyl fluorure ; SDS = dodécyl sulfate de sodium.

acide de pH 4,5. La préparation d'une solution enrichie en globuline à partir de corps protéiques isolés est effectuée d'après la technique de PLANT et MOORE (1983).

Isolement des corps protéiques

Les corps protéiques sont isolés selon la technique, légèrement modifiée, de DONHOWE et PETERSON (1982). Les grains mûrs de Tournesol mis dans l'eau, au froid (4 °C) pendant 16 heures, sont décortiqués et coupés en petits morceaux puis soumis à un écrasement doux dans 1,5 vol. de tampon de broyage (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂; 15 % saccharose). 0,5 vol. de tampon est ensuite rajouté et le broyat est bien homogénéisé puis filtré sur tissu (NY 60) de 60 µm avant d'être fractionné sur un gradient discontinu de saccharose de 0,5–1,5–2 M (préparé dans un tampon A: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1 mM EDTA; 0,1 mM MgCl₂) à 30 000 rpm pendant 4 heures et à 4 °C (rotor SW 41 – Beckman). L'interface 1,5/2 M du gradient est récupérée et diluée dans le tampon A puis centrifugée à 25 000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le culot obtenu correspond aux corps protéiques isolés.

Fractionnement des corps protéiques isolés sur gradient continu de saccharose

Le culot de corps protéiques obtenu précédemment est repris dans un minimum de tampon A et fractionné sur 12 ml d'un gradient linéaire de 17 à 66 % de saccharose dans le tampon A. Après centrifugation à 230 000 × *g* pendant 4 heures à 4 °C dans un rotor SW 41 – Beckman, des fractions de 0,6 ml sont collectées. La densité des fractions est déterminée par un réfractomètre (Bellingham et Stanley).

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les échantillons de protéines sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (LAEMMLI 1970). Les polypeptides séparés sont visualisés par coloration au bleu de Coomassie R-250.

RESULTATS

Evolution des protéines au cours de la formation du grain

La figure 1 montre l'évolution de la teneur des protéines totales (a) et des protéines solubles (b) au cours de la maturation du grain de Tournesol. L'azote protéique augmente rapidement entre 12 et 35 JaF où le taux maximum des protéines est de 15,5 mg/grain (Fig. 1a).

L'accumulation des protéines solubles (Fig. 1b) suit une cinétique presque parallèle à celle des protéines totales. Moins de 6 % des protéines solubles du grain mûr sont accumulées au bout de 14 JaF. L'accumulation de ces protéines est très

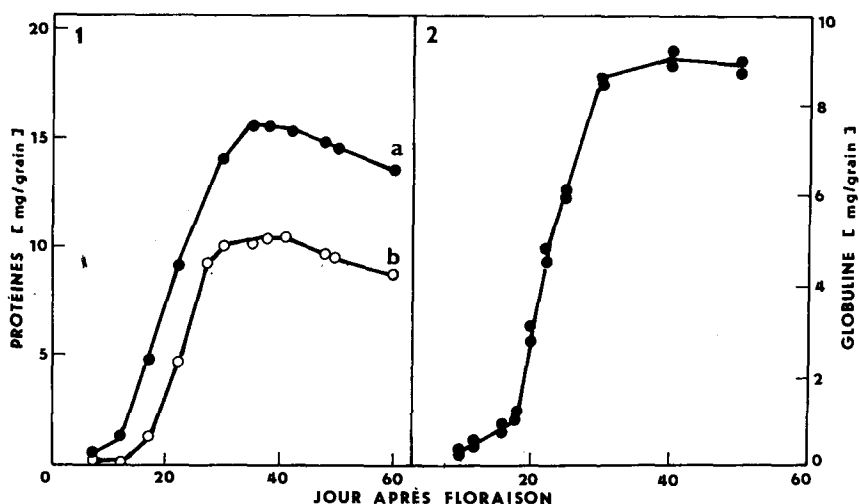


Fig. 1. Evolution des quantités de protéines totales (a) et de protéines solubles (b) au cours de la maturation du grain de Tournesol.

Fig. 2. Evolution de la quantité de globuline brute au cours du développement du grain de Tournesol.

rapide entre 14 et 30 JaF puis elle décroît et cesse avec l'établissement de la l'essiccation de la graine.

Evolution de la quantité brute de globuline au cours du développement du grain

La figure 2 montre l'accumulation de la globuline, déterminée par la technique d'ADLER et MÜNTZ (1983). La quantité de globuline reste assez faible jusqu'à 10 Jaf puis s'accroît rapidement entre 15 et 30 Jaf passant de 0,5 à 8,5 mg/grain, respectivement.

La comparaison des teneurs en protéines (Fig. 1b et Fig. 2) indique la prépondérance de la globuline parmi l'ensemble des protéines solubles.

Analyse qualitative des protéines solubles au cours de la maturation des grains

La composition peptidique des protéines des graines à différents moments du développement est analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Fig. 3). Les stades jeunes (10 JaF) sont caractérisés par les polypeptides de haute Mm 74, 58 et 44 kDa (Fig. 3-*) alors que les stades les plus avancés de la maturation montrent des bandes majeures de Mm plus faibles : 36, 30, 23-24 et 21-22 kDa (Fig. 3-→). Ces mêmes polypeptides sont de plus en plus accumulés au cours de la croissance. Parmi ces polypeptides, l'étude de la composition polypeptidique de la globuline purifiée (FERJANI et LEDOIGT 1987) a révélé l'existence de plusieurs sous-unités de 30, 23-24 et 21-22 kDa. La proportion

relative de la globuline observée par électrophorèse confirme la quantité de globuline mesurée dans les échantillons (Fig. 1b et Fig. 2).

Localisation intracellulaire de la globuline de Tournesol

Les corps protéiques ont été isolés par fractionnement sur gradient discontinu de saccharose (FERJANI *et al.* 1989). La répartition des corps protéiques isolés sur un gradient continu de saccharose de 17 à 66 % (Fig. 4) met en évidence un pic majeur dont le sommet correspond à une densité spécifique de $1,30 \text{ g cm}^{-3}$.

L'analyse des fractions collectées sur le gradient par électrophorèse en présence de SDS (Fig. 5) montre une composition polypeptidique relativement homogène pour les différentes fractions de corps protéiques. Parmi les polypeptides séparés, les sous-unités de la globuline (30, 23–24 et 21–22 kDa) sont bien représentées (Fig. 5 →).

Caractérisation des constituants protéiques des corps protéiques isolés

L'analyse de la composition polypeptidique des corps protéiques isolés à partir des grains mûrs (Fig. 6b) montre un profil très similaire à celui des constituants protéiques de la graine entière (Fig. 6a) où parmi les polypeptides majoritaires les sous-unités de la globuline mature (30, 23–24 et 21–22 kDa) sont bien représentées (Fig. 6*).

La comparaison des profils électrophorétiques des fractions membranaires (Fig. 6c) et solubles (Fig. 6d) des corps protéiques montre que l'essentiel des polypeptides de ces organites provient de leur fraction soluble. Les composants majeurs de ces polypeptides constituent les sous-unités de la globuline mature (Fig. 6e). Ces

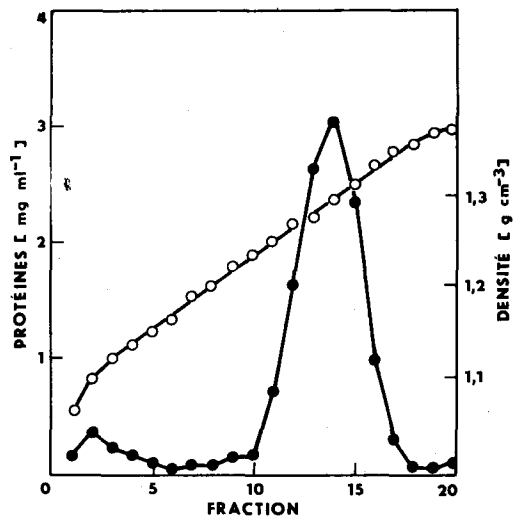


Fig. 4. Fractionnement des corps protéiques sur gradient continu de saccharose (17–66 %). Les cercles ouverts représentent les concentrations de saccharose mesurées au réfractomètre. Les cercles fermés représentent les quantités de protéines dosées par colorimétrie.

dernières sont pratiquement absentes du profil polypeptidique de la fraction enrichie en réticulum endoplasmique (Fig. 6F) qui correspond à l'interface 0,5–1,5 M du gradient discontinu.

DISCUSSION

La caractérisation des polypeptides constituant la globuline de Tournesol et l'étude de leurs précurseurs ont été précédemment développées (FERJANI et LEDOIGT 1987, FERJANI *et al.* 1989). L'analyse de l'évolution des protéines au cours de la formation du grain montre que les tout premiers stades du développement, entre la floraison et 12 JaF, sont caractérisés par un rythme de synthèse protéique très lent et donc par des quantités de protéines relativement faibles. En effet, moins de 6 % des protéines solubles sont accumulés au bout de 14 JaF. Ensuite, l'accumulation de ces protéines est très rapide (14 à 30 JaF). La chute relative des protéines totales et solubles à partir de 40 JaF peut correspondre à l'augmentation du poids sec d'autres composés tels les lipides. La quantité de globuline dont la teneur est prépondérante suit la même évolution que celle des protéines solubles au cours du développement du grain. A maturité, la globuline représente 72 % des protéines solubles. Ainsi, il est clair que l'essentiel des synthèses protéiques se produit à une période bien déterminée du cycle de développement du grain après une première phase de division cellulaire rapide (0–14 JaF). Le même phénomène a été décrit pour plusieurs graines de légumineuses (DURE III 1975, PERNOLLET 1975) et de céréales (GREENE 1983).

Les stades jeunes (10 JaF) sont caractérisés par la présence de polypeptides de haute Mm 74, 58 et 44 kDa qui correspondent à certains précurseurs des globulines et à une forme intermédiaire de maturation, 44 kDa (FERJANI *et al.* 1989).

Les fractions de corps protéiques purifiés montrent une composition polypeptidique homogène, comprenant les polypeptides de la globuline qui sont, en revanche, absents des fractions purifiées de réticulum endoplasmique. Ainsi la globuline, dont la biosynthèse s'effectue sur les membranes du réticulum endoplasmique et des corps protéiques (FERJANI *et al.* 1989), n'est stockée qu'au niveau des corps protéiques impliquant un processus de transport intracellulaire.

REFERENCES

- ADLER, K., MÜNTZ, K. : Origin and development of protein bodies in cotyledons of *Vicia faba* L. – *Planta* **157** : 401–410, 1983.
- BRADFORD, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. – *Anal. Biochem.* **72** : 248–254, 1976.
- DALGALARRONDO, M., RAYMOND, J., AZANZA, J. L. : Sunflower seed proteins : characterization and subunit composition of the globulin fraction. – *J. exp. Bot.* **35** : 1618–1628, 1984.
- DONHOWE, E. T., PETERSON, D. M. : Isolation and characterization of oat aleurone layer and starchy endosperm protein bodies. – *Plant Physiol.* **69** : 148–155, 1982.

- DURE, L. S. III : Seed formation . – Annu. Rev. Plant Physiol. **26** : 259–278, 1975.
- FERJANI, E. : Contribution à l'étude de la fraction protéique majeure (globuline) des graines de Tournesol (*Helianthus annuus* L.). – Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences. Pp. 219, Clermont-Ferrand (France), 1988.
- FERJANI, E., LEDOIGT, G. : Purification et caractérisation des polypeptides acides et basiques de la globuline de Tournesol. – Compt. rend. Soc. Biol. **181** : 624–632, 1987.
- FERJANI, E., PERRAULT, A., LEDOIGT, G. : Precursor analysis and biosynthesis of sunflower globulin. – Plant Physiol. Biochem. **27** : 315–322, 1989.
- GREENE, F. C. : Expression of storage protein genes in developing wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. Correlation of RNA accumulation and protein synthesis. – Plant Physiol. **71** : 40–46, 1983.
- HIGGINS, T. J. V. : Synthesis and regulation of major proteins in seeds. – Annu. Rev. Plant Physiol. **35** : 191–221, 1984.
- LAEMMLI, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. – Nature **227** : 680–685, 1970.
- PERNOLLET, J. C. : Protein bodies of seeds : ultrastructure, biosynthesis and degradation. – Phytochemistry **17** : 1473–1480, 1978.
- PERNOLLET, J. C. : Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. – Physiol. vég. **23** : 45–59, 1985.
- PLANT, A. R., MOORE, K. G. : NADH cytochrome *c*-reductase activity associated with a membrane fraction from protein bodies of *Lupinus angustifolius* cotyledons. – New Phytol. **93** : 359–368, 1983.
- PSARAS, G. : The structure of sunflower (*Helianthus annuus*) endosperm during germination. – Phytomorphology **35** : 141–146, 1985.
- PUSZTAI, A., STEWART, J. C., WATT, W. B. : A novel method for the preparation of protein bodies by filtration in high (over 70 % w/v) sucrose-containing media. – Plant Sci. Lett. **12** : 9–15, 1978.
- SABIR, M. A., SOSULSKI, F. W., MAC KENZIE, S. L. : Gel chromatography of sunflower proteins. – J. agr. Food Chem. **21** : 988–993, 1973.
- SCHWENKE, K. D., RAAB, B. : The distribution of the protein fractions obtained from sunflower seeds. – Nahrung **17** : 373–379, 1973.
- THIS, P., GOFFNER, D., RAYNAL, M., CHARTIER, Y., DELSENY, M. : Characterization of major storage proteins of sunflower and their accumulation. – Plant Physiol. Biochem. **26** : 125–132, 1988.
- TULLY, R. E., BEEVERS, H. : Protein bodies of castor bean endosperm. – Plant Physiol. **58** : 710–716, 1976.
- WEBER, E., NEUMANN, D. : Protein bodies, storage organelles in plant seeds. – Biochem. Physiol. Pflanz. **175** : 279–306, 1980.

Voir les figures 3,5 à 6 à la fin de cette issue.