Biosynthèse des protéines de réserve et formation des corps protéiques dans la graine de lupin jaune (*Lupinus luteus* L, Légumineuses)

MA Esnault, A Merceur, J Citharel

Université de Rennes I, laboratoire de physiologie végétale, campus de Beaulieu, F 35042 Rennes Cedex, France

(Reçu le 18 septembre 1992; accepté le 15 février 1993)

Résumé — Le dépôt des protéines et la formation des corps protéiques dans la graine du lupin jaune sont observés en microscopie optique à différents stades de la séminogénèse. Parallèlement, la biosynthèse des protéines de réserve est suivie par l'étude de la composition en polypeptides des protéines totales et de fractions purifiées au moyen de l'électrophorèse et de l'utilisation de 2 sérums spécifiques des congglutines γ et α . La congglutine γ est synthétisée (22 j après anthèse [JAA]) avant le dépôt de protéines dans les vacuoles. Durant la période de forte activité synthétique de la graine (27-33 JAA), les congglutines α (légumine) et δ (fraction 2S) apparaissent sous leurs formes matures. Les 2 types de corps protéiques, l'un à matrice homogène et l'autre hétérogène, sont déjà visibles. Le sérum anti-congglutine γ ne permet pas la détection d'un précurseur de la congglutine γ . Le sérum anticongglutine α met en évidence la présence de polypeptides de 84, 74 et 62 kDa au stade 27 JAA, suggérant que le processus de synthèse de la congglutine α est le même chez le lupin jaune que chez d'autres lupins.

globuline / corps protéique / maturation / légumineuse / immunologie / microscopie photonique

Summary — **Biosynthesis of storage proteins and protein body formation in the seeds of the yellow lupin (*Lupinus luteus* L, Leguminosae).** Protein deposit and protein body formation in the seed of the yellow lupin were observed by optical microscopy for different stages of maturation. At the same time, storage protein biosynthesis was assessed by study of polypeptide composition of whole proteins and purified fractions, through electrophoresis and by the use of 2 specific sera. Conglutin γ was synthesized from 22 DAA (day after anthesis) prior to protein deposition in the vacuoles. During the period of intense synthetic activity in the seed (27–33 DAA), mature forms of conglutins α (legumin) and δ (2S fraction) appeared. Two types of protein bodies were detected depending on whether the matrices were homogeneous or heterogeneous. No conglutin γ precursor could be detected by serum anti-conglutin γ . Polypeptides of 84, 74 and 62 kDa present at 27 DAA were recognized by serum anti-conglutin α , suggesting that the biosynthetic process of conglutin α was the same in yellow lupin as in other lupins.

globulin / protein body / maturation / Leguminosae / immunology / photonic microscopy

INTRODUCTION

Les protéines de réserve des graines des lupins sont constituées de globulines (87 à 90% des protéines totales) et d'albumines (10–13%). Chez le lupin jaune (*Lupinus luteus* L), 5 globulines ont été caractérisées (Esnault *et al*, 1991) : les congglutines $\beta 1$ et $\beta 2$ (vicilines), les congglutines α (légumine), γ et δ . Ces 2 dernières sont spécifiques des lupins.

La congglutine γ peut être rapprochée d'une fraction 10S du soja décrite par Sato *et al* (1987). Elle est formée chez les lupins par l'association de monomères constitués de 2 polypeptides liés par des ponts disulfures, de taille variable suivant les espèces. Chez le lupin jaune, le monomère de 41 kDa contient 2 polypeptides de 33 et 17 kDa (Esnault *et al*, 1991). La congglutine δ du lupin jaune est la fraction 2S identifiée par Joubert (1955). Chez *L. augustifolius*

lius, elle est présente sous 2 formes. La première (conglutine $\delta 2$) est composée de 2 sous-unités de 9 et 4,5 kDa associées par des ponts disulfures (Lilley et Inglis, 1986). La seconde (conglutine $\delta 1$) serait un dimère de la première (Lilley, 1986). Restani *et al* (1981) décrivent chez *L. albus*, une fraction 9b, la conglutine δ , composée de 2 sous-unités, l'une de 21,6 kDa formée par l'association de 2 polypeptides de 10,5 kDa et l'autre de 13,7 kDa contenant au moins un polypeptide de 12,8 kDa. Dans le lupin jaune, la conglutine δ serait constituée des 2 types de protéines (Esnault *et al*, 1992). Une forme correspondant à la conglutine $\delta 2$ a pu être purifiée chez le lupin jaune (résultats non publiés).

Les conglutines des lupins sont synthétisées sous la forme de polypeptides précurseurs, de masses moléculaires supérieures à celle des polypeptides de la protéine mature. Le processus de maturation comporte d'abord l'élimination de la séquence signal, mise en évidence chez le lupin à feuilles étroites (Gayler *et al*, 1984) et le lupin jaune (Deckert et Gwozdz, 1991) pour les conglutines α , β et γ . Les précurseurs subissent ensuite des modifications post-traductionnelles semblables à celles décrites pour les protéines de réserve des légumineuses (Johnson *et al*, 1985). Ainsi, le précurseur de la conglutine γ de 51 kDa chez *L. angustifolius* (Johnson *et al*, 1985) et *L. luteus* (Deckert et Gwozdz, 1991) et de 45 kDa chez *L. albus* (Citharel et Delamarre, 1989) est graduellement modifié pour aboutir aux polypeptides présents dans la graine mûre. Le précurseur de la conglutine $\delta 2$ de *L. angustifolius* subit des modifications post-traductionnelles similaires se traduisant par la perte d'un peptide signal de 22 puis d'un fragment de 13 acides aminés, libérant ainsi les 2 polypeptides de la protéine (Gayler *et al*, 1990).

Les protéines de réserve sont déposées dans des organites cellulaires spécialisés, les corps protéiques, dans lesquels sont effectuées les dernières étapes de leur maturation (Johnson *et al*, 1985). Chez les Légumineuses, les corps protéiques contiennent des globulides cristallins inclus dans une matrice de type protéique (Lott et Buttrose, 1978; Lott, 1981). Chez certaines Papilionacées, ils se distinguent par une dualité très marquée au niveau de la structure et de la localisation dans le cotylédon : les uns, à matrice homogène, sont présents sur la face adaxiale; les autres, avec une matrice hétérogène contenant de nombreuses alvéoles et des globulides cristal-

lins, sont situés sur la face abaxiale. Ils ont été décrits chez le lupin jaune (Sobolev *et al*, 1976; Mlodzianowski, 1978), chez *Cytisus scoparius* (Citharel et Citharel, 1985) et dans une grande majorité d'espèces de la tribu des Génistées (Citharel et Citharel, 1986). La formation des corps protéiques a été étudiée chez le lupin jaune par Wozny *et al* (1984), et chez le lupin blanc par Davey et Van Staden (1978) et Le Gal et Rey (1986).

Les mécanismes de synthèse des protéines de réserve et leur dépôt dans les corps protéiques au cours de la maturation de la graine des Légumineuses sont connus chez certaines espèces (pois, soja, fève...). Toutefois, si le schéma général semble commun, des spécificités peuvent exister chez certaines espèces, ou pour des protéines particulières. Pour le lupin jaune, ces connaissances demeurent fragmentaires et incomplètes. Comparé aux autres protéagineux, celui-ci présente le double intérêt de posséder des graines parmi les plus riches en protéines (44%) et de très bien se développer sur les sols pauvres et sableux, difficiles à exploiter. Ce travail a donc pour but de compléter l'étude des protéines de réserve du lupin jaune, et en particulier, celle portant sur leur biosynthèse, et de leur dépôt dans les corps protéiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude concerne les graines de lupin jaune de la variété Sulfa, sélectionnées par la station d'amélioration des plantes fourragères (INRA) de Lusignan pour leur basse teneur en alcaloïdes.

Extraction des globulines totales aux différents stades de maturation

Les graines immatures (tableau I) sont congelées dans l'azote liquide puis conservées à -20°C . Elles sont broyées dans un mortier, dans l'azote liquide. Les protéines sont extraites en agitant le broyat dans un tampon Tris-HCl 50 mmol.l^{-1} , pH 8,3 contenant du NaCl $1,5\text{ mol.l}^{-1}$ à 4°C , pendant 2 h (1/10; p/v). L'extrait est mélangé avec de l'acide trichloro-acétique à 20% (v/v). Après un repos de 2 h à 4°C , les protéines précipitées sont isolées par une centrifugation de 20 min à $17\ 000\text{ g}$ et 4°C , puis lavées 3 fois avec un volume du mélange éther-alcool (1/1; v/v) identique au volume du tampon d'extraction. Les protéines sont ensuite solubilisées dans un tampon Tris-HCl $0,5\text{ mol.l}^{-1}$ pH 6,8 pour l'analyse électrophorétique.

Purification des globulines

Les différentes fractions de globulines sont extraites à partir de graines immatures (stade 6) ou mûres, puis fractionnées par chromatographie d'échange d'ions et de filtration sur gel selon le protocole décrit précédemment par Esnault *et al* (1991). Le monomère de 41 kDa de la conglutine γ , est isolé par électrophorèse préparative sur gel contenant 10% d'acrylamide et 2% de SDS (150 x 140 x 1,5 mm) selon la technique de Laemmli (1970). Les dépôts protéiques sont de 500 μ g par puits. La migration est réalisée sous un courant constant de 30 mA par gel (tension de 150 volt), dans un tampon Tris 25 mmol.l⁻¹-glycine 192 mmol.l⁻¹, de pH 8,6 pendant 4–5 h. A la fin de la migration, le polypeptide est localisé sur le gel par une coloration rapide des 2 pistes adjacentes, au bleu de Coomassie R250. Il est désorbé en laissant la portion centrale du gel le contenant en contact avec un tampon Tris-HCl 0,5 mmol.l⁻¹, pH 6,8, à 4 °C, pendant une nuit. L'extrait, après centrifugation, est alors dialysé contre de l'eau distillée, à 4 °C, pendant 24 h puis lyophilisé. La pureté de la fraction est contrôlée après chaque isolement par électrophorèse monodimensionnelle.

Electrophorèses monodimensionnelles

Les extraits protéiques sont analysés sur des gels (150 x 120 x 1 mm) d'acrylamide soit en gradient de 5–13% sans SDS pour les protéines natives, soit à concentration constante (12,5%) et 2% en SDS pour les protéines dénaturées. Les dépôts sont d'environ 40 μ g par puits. Les électrophorèses sont réalisées sous une intensité constante de 30 mA par gel. Les polypeptides sont révélés au bleu de Coomassie R250. Chaque gel est étalonné par des protéines de référence : lysozyme (14,4 kDa), inhibiteur de trypsine de soja (21,5 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), albumine d'œuf (42,7 kDa), albumine de sérum de bœuf (66,2 kDa) et phosphorylase B (97,4 kDa).

Préparation des sérums et technique d'immuno-empreinte sur membrane de nitrocellulose

Des sérums sont obtenus à partir du monomère de 41 kDa de la conglutine γ et la conglutine α purifiée (Esnault *et al*, 1991). Quatre injections sous-cutanées de 1 mg de protéines dans 0,5 ml d'adjuvant de Freund (complet à la première injection puis incomplet) et 0,5 ml d'eau sont effectuées sur des lapins, à raison d'une par semaine. La spécificité des sérums est vérifiée par la technique d'immuno-empreinte. Les protéines, séparées par électrophorèse en gel d'acrylamide à 12,5% et en présence de SDS, sont transférées pendant 30 min sur une membrane de nitrocellulose (nitroplus, Bioblock) dans une cuve Semiphor TE70 (Hoefer Scientific Instruments). Le tampon Tris (25 mmol.l⁻¹)-glycine(192 mmol.l⁻¹), pH 8,6 contient du méthanol à 20% (v/v) à l'anode et du SDS à 0,1% (v/v) à la cathode. La révélation est effectuée avec les sérums dilués au 1/1000^e dans du tampon phosphate pH 7,5 (Na₂HPO₄ 8 mmol.l⁻¹, KH₂PO₄ 1,5 mmol.l⁻¹, NaCl 137 mmol.l⁻¹, KCl 2,7 mmol.l⁻¹) et un immunoconjugué, le GAR (GAR/IgG(H+L)/PO, TEBU) portant une peroxydase. La conglutine α est visualisée par incubation de la membrane dans un mélange contenant 50 μ l d'H₂O₂ à 30%, 75 ml du tampon phosphate et 15 ml de chloronaphtol à 3% dans le méthanol, la conglutine γ à l'aide du luminol selon le protocole préconisé par le fabricant (Amersham). L'absence de réaction des 2 sérums avec les autres globulines du lupin jaune a été vérifiée dans ces conditions.

Préparations microscopiques

Des fragments de cotylédons de 1 mm³ sont prélevés à partir de graines immatures (tableau I). Ils sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un

Tableau I. Caractérisation des différents stades de maturation de la graine de lupin jaune.

	1	2	3	Stades 4	5	6	7	Graines mûres
JAA	14	17	20	22	27	31	33	70
Graine (mg)*	<60	70–90	100–140	150–160	200–220	270–310	320–350	140 ± 20
Masse d'un cotylédon (mg)**	non formé	7	12	24	54	84	86	54

* Les valeurs des masses de matières fraîches sont établies sur 100 graines pour chaque stade. ** La masse moyenne d'un cotylédon est établie sur 20 cotylédons.

tampon caccodylate de sodium-HCl 0,2 mmol.l⁻¹ (pH 7,2), pendant 2 h à 4 °C. Après rinçage dans le même tampon mais 0,1 mol.l⁻¹, ils sont incubés dans le tétraxide d'osmium à 1% dans le tampon caccodylate 0,2 mmol.l⁻¹ pH 7,2 (1/1; v/v), à 4 °C, pendant 2 h à l'obscurité. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains successifs d'alcool à 70°, 90°, 100° puis d'oxyde de propylène. Ils sont alors inclus dans de l'Epon (résine époxy). Les coupes semi-fines de 1 à 2 µm sont réalisées par un microtome Reichert puis colorées au bleu de toluidine à 1%. Les observations et photographies sont effectuées en microscopie photographique.

RÉSULTATS

Caractérisation des stades de maturation

Les divers stades immatures sont caractérisés par la durée du développement de la graine (JAA) et les masses de matière fraîche de la graine et des cotylédons (tableau I). Ces bases nous ont permis d'obtenir des résultats reproductibles pour 3 cycles de végétation.

Fig 1. Coupes semi-fines de cotylédons de *L. luteus*, à différents stades de la séminogénèse. **A.** Stade 4 (x 1200), m : méat réduit, N : noyau, nu : nucléole, p : paroi cellulaire, mince et sinueuse, v : vacuole. **B, C.** Stade 5, B (x 300) et C (x 1200), cp : corps protéique de taille variable, sur le pourtour de la vacuole, cv : faisceau criblo-vasculaire, fg : fragmentaire de la vacuole. **D.** Stade 6, vues de la membrane et des corps protéiques (x 1200), al : alvéole, cpt : corps protéiques hétérogènes, gl : globules cristallins, pe : épaississement de la paroi interne, pl : emplacement des plasmodesmes. **E, F.** Stade 7, E (x 400) et F (x 1200), cpm : corps protéiques homogènes, M : méat important, pe : épaississement de la paroi interne.

Dépôt des protéines et formation des corps protéiques

Aux stades 2 et 4 de l'ontogenèse, les cellules des parenchymes des faces adaxiale et abaxiale des cotylédons présentent :

- des parois fines avec un contour très sinueux;
- une grande vacuole centrale, entourée par un cytoplasme réduit occupant la majeure partie du volume cellulaire;
- un noyau lobé, placé latéralement avec un nucléole bien visible et quelques chromocentres périphériques (fig 1A). Aucun dépôt protéique n'est décelable.

Au stade 5, on observe une fragmentation du vacuome (fig 1B, C). De petits dépôts protéiques fortement colorés au bleu de toluidine sont identifiables sur le pourtour des vacuoles. Le noyau et le nucléole sont encore bien visibles dans le cytoplasme périphérique. La paroi cellulaire est plus épaisse qu'aux stades précédents et les invaginations ont pratiquement disparu.

Aux stades 6 et 7, d'importants changements interviennent (fig 1D, E, F). Les corps protéiques, bien formés, sont répartis en 2 zones avec des structures différentes. Ceux de la face adaxiale du cotylédon, lieu du futur parenchyme palissadique ont une matrice homogène. Ceux de la face abaxiale, lieu du futur parenchyme lacuneux, sont hétérogènes, ayant une matrice contenant des globoides cristallins et des «alvéoles» claires, de taille variable. En microscopie optique, les globoides cristallins présentent une réfringence rouge caractéristique. La paroi cellulaire est alors très épaisse surtout au niveau des espaces intercellulaires, méats et petites lacunes. Ailleurs, elle est moins épaisse et présente de nombreux plasmodesmes.

Dans la graine mûre, les corps protéiques occupent la totalité de la cellule.

Biosynthèse des polypeptides au cours de la maturation de la graine

Les graines les plus immatures (stades 1–5) contiennent un grand nombre de polypeptides (fig 2) avec des masses s'échelonnant entre 97 et 20 kDa. Ceux de 52, 40, 32 et 20 kDa prédominent. La présence de 2-mercaptoéthanol ne modifie la masse d'aucun polypeptide (données non montrées). A partir du stade 6, des changements notables apparaissent. Cinq nouveaux po-

lypeptides de 85, 76, 65, 50 et 44 kDa sont révélés. La bande de 20 kDa visible dans les stades précédents a disparu alors que 2 autres de 18 et 13,5 kDa apparaissent. Dans la graine mûre, celles-ci disparaissent au profit de 2 autres de 14,5 et 10 kDa, caractéristiques de la conglutine δ (Esnault *et al*, 1992) tandis que les bandes de 85, 76 et 65 kDa sont toujours mises en évidence. Celles de 50 et 44 kDa ne sont plus décelées mais 2 nouvelles de 48 et 41 kDa sont visibles en forte concentration.

La technique d'immuno-empreinte montre que la conglutine γ mature est révélée faiblement à partir du stade 4 (22 JAA) mais surtout à partir du stade 5 (27 JAA). Dès ces stades, le monomère de 41 kDa, caractéristique de cette protéine, est visible (fig 3). Il est scindé par le 2-mercaptoéthanol en fragments de 33 et 17 kDa. Un polypeptide de 45 kDa est aussi révélé dans ces conditions. Sa présence occasionnelle avec la conglutine γ purifiée suggère qu'il proviendrait de la dissociation incomplète de la sous-unité de 41 kDa. Aucun précurseur ne peut être mis en évidence par la technique d'immuno-empreinte.

La conglutine α mature est représentée par des bandes de masses comprises entre 43 et 66 kDa (Esnault *et al*, 1991). Les bandes majeures de 62, 60, 51 et 43 kDa sont bien reconnues par le sérum anti-conglutine α (fig 4). Ces sous-unités sont décelées à partir du stade 5. Une bande de 84 kDa (a) n'est visible qu'au stade 5. Un polypeptide de 62 kDa (c) est reconnu par le

Fig 2. Electrophorèse en présence de SDS et en l'absence de ME, des protéines extraites à partir de graines immatures (stades 1–7) et mûres (GM). Les polypeptides faisant l'objet d'un commentaire dans le texte sont signalés par des flèches.

Fig 3. Révélation, après immuno-empreinte, des protéines extraites à partir de graines immatures et mûres, par le sérum anti-conglutine γ (γ : conglutine γ révélée par le bleu de Coomassie).

sérum dès les premiers stades jusqu'à la graine mûre, un autre de 74 kDa (b) à partir du stade 5. Ils pourraient correspondre à des sous-unités matures ou à des précurseurs de masse moléculaire très proche.

Purification des protéines au stade 6 de la maturation

Le stade 6 est caractérisé par une modification importante de la composition en sous-unités des globulines et de l'aspect des corps protéiques.

Les globulines présentes à ce stade ont donc été fractionnées par chromatographie d'échange d'ions selon un protocole identique à celui utilisé pour la graine mature (Esnault *et al*, 1991). Dans ces conditions, 4 fractions sont isolées : une non retenue (F_1) et 3 fractions éluées à des concentrations de 0,1 (F_2) 0,15 (F_3) et 0,25 mol.l⁻¹ (F_4) de NaCl. Ces fractions ont été comparées aux fractions homologues isolées à partir de la graine mûre, par électrophorèses en absence ou en présence de SDS ou de ME.

La fraction F_1 donne par électrophorèse, en l'absence de SDS et de ME, une seule bande si-

Fig 4. Révélation, après immuno-empreinte, des protéines extraites à partir de graines immatures et mûres, par le sérum anti-conglutine α (α : conglutine α révélée par le bleu de Coomassie).

miltaire à celle de la conglutine γ (fig 5). En présence de SDS, elle est caractérisée comme la conglutine γ par une bande majeure de 41 kDa et des bandes mineures dont une de 43,5 kDa. La bande majeure est réduite par le 2-mercaptoéthanol en 2 polypeptides de 33 et 17 kDa. Dans la fraction F_1 , ce dernier, proportionnellement en plus faible concentration, est accompagné d'un polypeptide de 15 kDa.

La fraction F_2 , pauvre en protéines, donne en l'absence de SDS une bande migrant à la même vitesse que la bande la plus mobile de la conglutine δ (fig 6). En présence de SDS, elle renferme 2 sous-unités de 14,5 et 10 kDa, réduites par le ME en trois polypeptides majeurs de 12 kDa, 5 kDa et 3,5 kDa, confirmant les similitudes avec la conglutine δ .

La fraction F_3 est constituée, en l'absence de SDS, d'une seule bande ne correspondant à aucune des conglutines matures et, en présence de SDS, de sous-unités de masses comprises entre 88 et 45 kDa et qui ne se scindent pas sous l'action du 2-mercaptoéthanol (fig 6). Elles sont différentes de celles de la conglutine β (56 à 43 kDa) que l'on pourrait s'attendre à trouver dans cette fraction. Par ailleurs, les polypeptides de la conglutine δ y sont faiblement révélés.

Quelles que soient les conditions, les profils électrophorétiques de la fraction F_4 sont similaires à ceux de la conglutine α , montrant ainsi que celle-ci est déjà sous sa forme mature au

Fig 5. Électrophorèses de la conglutine γ purifiée (γ) et de la fraction chromatographique F_1 des globulines isolées au stade 6, en l'absence ou en présence de SDS, en absence (-) et en présence (+) de ME.

stade 6 (fig 7). En présence de SDS, une différence majeure est toutefois à noter. Elle concerne l'existence de sous-unités de 88 à 70 kDa, non modifiées par le 2-mercapto-éthanol et similaires à celles de la fraction F_3 , suggérant une contamination.

Fig 6. Électrophorèse des conglutines β et δ purifiées (β , δ) et des fractions chromatographiques F_2 et F_3 isolées au stade 6, en l'absence et en présence de SDS et de ME.

DISCUSSION

L'étude de la biosynthèse des globulines des lupins a montré que la cong lutine γ est l'une des premières synthétisées au cours du développement de la graine. Citharel et Delamarre (1989) décèlent le monomère de 43 kDa dès le 25^e JAA dans le lupin blanc. Chez le lupin jaune, nous montrons son apparition au 22^e JAA sous forme mature (41 kDa) avant que les dépôts de protéines ne soient nettement visibles dans les vacuoles. Ceux-ci sont décelés au 27^e JAA, période correspondant au stade II décrit par Wozny *et al* (1984) qui les ont observés au moyen de la microscopie électronique à transmission. Chez le lupin à feuilles étroites, seuls les précurseurs de la cong lutine γ ont été mis en évidence au stade correspondant (Johnson *et al*, 1985).

La période comprise entre le 27 et le 33^e JAA est cruciale pour la biosynthèse des globulines des lupins. Il a été montré, dans le lupin à feuilles étroites, qu'avant ce stade seuls les précurseurs des protéines sont marqués lors de synthèse *in vitro* ou *in vivo*. À partir du 33^e JAA, les cong lutines γ et α achèvent leur maturation et les polypeptides apparaissent sous leur forme définitive (Duranti *et al*, 1991; Gayler *et al*, 1984; Blagrove *et al*, 1984; Johnson *et al*, 1985; Gayler *et al*, 1989). Dans le lupin jaune, le fractionnement des globulines présentes au 31^e JAA (stade 6) confirme l'existence de formes matures pour les cong lutines α , δ et γ . La structure quaternaire est donc déjà acquise à ce stade. L'électrophorèse en l'absence de SDS permet, en effet, d'obtenir des profils tout à fait semblables aux protéines matures. Toutefois, la cong lutine δ ne semble pas organisée sous sa forme mature définitive, bien que ses polypeptides caractéristiques semblent déjà synthétisés. Les cong lutines β 1 et β 2 achèvent leur maturation plus tardivement et n'ont pas encore acquis leur composition en sous-unités finales. En ce qui concerne l'organisation cellulaire pour cette période, les corps protéiques sont déjà bien formés et possèdent des goboïdes. C'est, en effet, une période d'accumulation intense de protéines (Gayler *et al*, 1984). On reconnaît déjà les 2 types de corps protéiques décrits par Sobolev *et al* (1976) avec leur localisation caractéristique. Cette période correspond au stade III de Wozny *et al* (1984).

Les sous-unités majeures de 45 à 88 kDa, présentent dans les fractions F_2 , F_3 et F_4 pourraient être des précurseurs des vicilines et légumineuses. Decker et Gwozdz (1991) ont en effet dé-

Fig 7. Electrophorèse de la cong lutine α purifiée et de la fraction chromatographique F_4 isolée au stade 6, en l'absence et en présence de SDS et de ME.

crit chez le lupin jaune des précurseurs de la cong lutine β compris entre 74 et 43 kDa. Le polypeptide de 84 kDa reconnu par le sérum anti-cong lutine α au 27^e JAA pourrait être l'homologue du précurseur de 83 kDa décelé chez le lupin à feuilles étroites par la même technique (Gayler *et al*, 1984). Ceux de 74 et 62 kDa, visibles essentiellement à ce stade, ont des masses très proches de celles des précurseurs de 72 et 64 kDa décelés par Johnson *et al* (1985) chez *L. angustifolius* et de celles de 71 et 60 kDa observées par Decker et Gwozdz (1991) chez *L. luteus*.

La bande de 20 kDa révélée aux stades 1–5 lors de l'analyse électrophorétique de l'ensemble des globulines, puis celles de 18 et 13,5 kDa mises en évidence aux stades 6 et 7 présentent des ressemblances avec un précurseur décrit de la cong lutine δ chez le lupin à feuilles étroites, à savoir une préprotéine de 17 765 Da perdant un peptide signal pour donner une préprotéine de 15 538 Da (Gayler *et al*, 1990). La perte d'une séquence de 13 acides aminés conduit ensuite à la formation des sous-unités de la protéine mature (9 558 et 4 520 Da).

Johnson *et al* (1985) ont montré chez le lupin à feuilles étroites que la biosynthèse d'une protéine et ses modifications post-traductionnelles sont programmées pour être réalisées au cours

du développement de la graine. Chez les lupins, le temps exceptionnellement long entre la période de biosynthèse des conglutines α et β notamment et l'apparition de leurs formes matures serait dû à l'absence d'exo- ou endoprotéases nécessaires aux clivages des précurseurs. L'em-

bryon ne synthétiserait ces enzymes que plus tardivement. Les périodes de maturation successives des précurseurs des différentes globulines conduiraient donc à émettre l'hypothèse de l'intervention de protéases différentes pour les 4 globulines majeures du lupin.

Fig 8. Aperçu global des différents événements intervenant au cours de la séminogenèse chez *L. luteus* en rapport avec la morphologie de la graine (grossissement x 1,5), l'apparition des corps protéiques et les principales étapes de la biosynthèse des globulines.

RÉFÉRENCES

- Blagrove RJ, Lilley GG, Gayler KR, Johnson ED (1984) Biosynthesis and structure of lupin storage proteins. In: *3^e congrès int lupin*. La Rochelle, 312-324
- Citharel L, Citharel J (1985) Protein bodies from the cotyledons of *Cytisus scoparius* L (Link). Ultrastructure, isolation and subunit composition of albumin, legumin and vicilin. *Planta* 166, 39-45
- Citharel L, Citharel J (1986) Dualité des corps protéiques du mésophylle adaxial et abaxial des cotylédons de quelques espèces de la tribu des légumineuses (légumineuses). *Can J Bot* 65, 1870-1875
- Citharel J, Delamarre D (1989) Synthesis of γ -conglutin during seed maturation in *Lupinus albus*. *Plant Physiol Biochem* 27, 211-218
- Davey JE, Van Staden J (1978) Ultrastructural aspects of reserve protein deposition during cotyledonary cell development in *Lupinus albus*. *Z Pflanzenphysiol* 89, 259-271
- Deckert JE, Gwozdz EA (1991) Storage globulins synthesised *in vitro* by polyribosomes and mRNA from developing seeds of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* 29, 269-280
- Duranti M, Faoro F, Harris N (1991) Immunocytochemical localization of conglutin γ and legumin-like globulin in developing and mature seeds of *Lupinus albus* L. *Protoplasma* 161, 104-110
- Esnault MA, Klingler J, Citharel J (1992) Étude de la fraction conglutine δ de la graine de lupin jaune. In: *1^{er} congrès eur protéagineux, Angers* (AEP, organisateur). *Recueil de communications*. Soft Publicité, Reims, 183-184
- Esnault MA, Merceur A, Citharel J (1991) Characterization of yellow lupin seeds. *Plant Physiol Biochem* 29, 573-583
- Gayler KR, Boadle BG, Snook M, Johnson ED (1984) Precursors of storage proteins in *Lupinus angustifolius*. *Biochem J* 221, 333-341
- Gayler KR, Kolivas S, Macfarlane AJ, Lilley GG, Baldi M, Blagrove RJ, Johnson ED (1990) Biosynthesis, cDNA and amino acid sequences of a precursor of conglutin δ , a sulphur-rich protein from *Lupinus angustifolius*. *Plant Mol Biol* 15, 879-893
- Gayler KR, Wachsmann K, Kolivas S, Nott R, Johnson ED (1989) Isolation and characterization of protein bodies in *Lupinus angustifolius*. *Plant Physiol* 91, 1425-1431
- Johnson ED, Knight J, Gayler KR (1985) Biosynthesis and processing of legumin-like storage proteins in *Lupinus angustifolius* (lupin). *Biochem J* 232, 673-679
- Joubert FJ (1955) Lupin seed proteins. II. A physicochemical study of the proteins from yellow lupin seed (*Lupinus luteus*). *Biochim Biophys Acta* 17, 444-445
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Le Gal MF, Rey L (1986) The reserve proteins in the cells of mature cotyledons of *Lupinus albus* var Lucky. I. Quantitative ultrastructural study of the protein bodies. *Protoplasma* 130, 120-127
- Lilley GG (1986) Isolation of conglutin δ , a sulphur-rich protein from the seeds of *Lupinus angustifolius* L. *J Sci Food Agric* 37, 1-11
- Lilley GG, Inglis AS (1986) Amino acid sequence of conglutin δ , a sulphur-rich seed protein of *Lupinus angustifolius* L. *FEBS* 195, 235-241
- Lott JNA (1981) Protein bodies in seeds. *Nord J Bot* 1, 421-432
- Lott JNA, Buttrose MS (1978) Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. *Aust J Plant Physiol* 5, 89-111
- Młodzianowski F (1978) The fine structure of protein bodies in lupine cotyledons during the course of seed germination. *Z Pflanzenphysiol* 86, 1-13
- Restani P, Duranti M, Cerletti P, Simonetti P (1981) Subunit composition of the seed globulins of *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 20, 2077-2083
- Sato K, Yamagishi T, Kamata Y, Yamauchi F (1987) Subunit structure and immunological properties of a basic 7S globulin from soybean seeds. *Phytochemistry* 26, 903-908
- Sobolev AM, Buzulukova NP, Dimitrievam I, Barbasheva AK (1976) Structural-biochemical organization of aleurone grains in seeds of yellow lupin. *Soviet Pl Physiol* 23, 621-628
- Wozny A, Młodzianowski F, Stefaniak B (1984) Protein bodies formation in yellow lupin seeds. *Acta Soc Bot Pol* 53, 3-9