

La génétique au service du goût...

...Caractérisation de mutants pour l'accumulation de saponines et l'activité lipoxygénase dans les graines de pois.

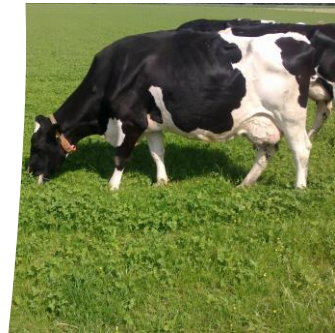
Vanessa VERNOUD



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche



INRA
SCIENCE & IMPACT



Le goût désagréable des légumineuses

- Le goût désagréable des graines de légumineuses (off-flavour) restreint leur utilisation en tant qu'ingrédients pour la fabrication de produits alimentaires élaborés.

Amertume ➔ Saponines

Odeur /note verte ("green , beany taste")

➔ Composés organiques volatiles (cov)
provenant de l'oxydation des acides gras
insaturés par des lipoxygénases

➔ Méthoxypyrazines

- Quelles solutions? traitements physico-chimiques, extraction sélective par solvant, masquage...



Exploiter la variabilité génétique pour améliorer le goût

Projet FUI LEG'UP:

le pois et la féverole comme source de protéines végétales pour l'alimentation humaine



- 1 Exploiter la **variabilité génétique naturelle** pour la teneur en saponines et l'activité lipoxygénase des graines.

Phénotypage d'environ 100 génotypes par espèce



Féverole



Pois

- 2 Exploiter la **variabilité génétique induite**: recherche d'allèles mutants pour l'accumulation de saponines ou pour l'activité lipoxygénase



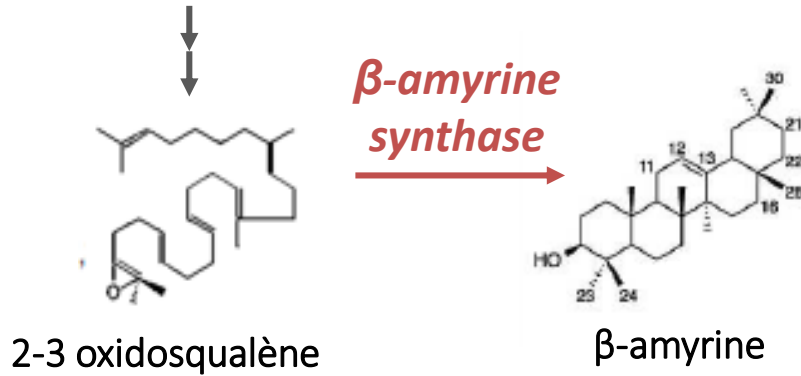
Utilisation de la population de mutants TILLING de pois (Dalmais et al., Genome Biol 2008)

TILLING = Targeting Induced Local Lesions In Genomes



Les saponines de pois, des triterpènes glycosylés au goût amer

Voie du mévalonate



Oxydations
(Cytochromes P450)

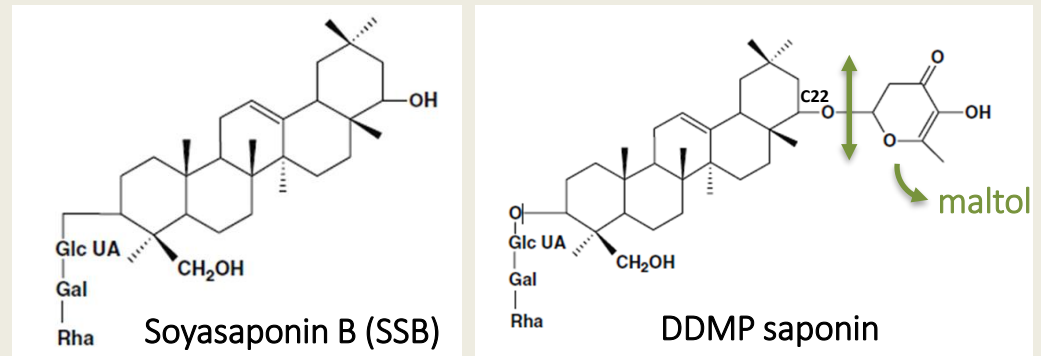


Glycosylations
(UGT-glycosyltransferases)

Triterpènes glycosylés
= SAPONINES

- ↳ Forme DDMP majoritaire
- ↳ Conversion DDMP \rightarrow SSB sous l'action de la chaleur
- ↳ Plus forte amertume de la forme DDMP (Heng *et al.*, 2005)

Saponines majoritaires des graines de pois

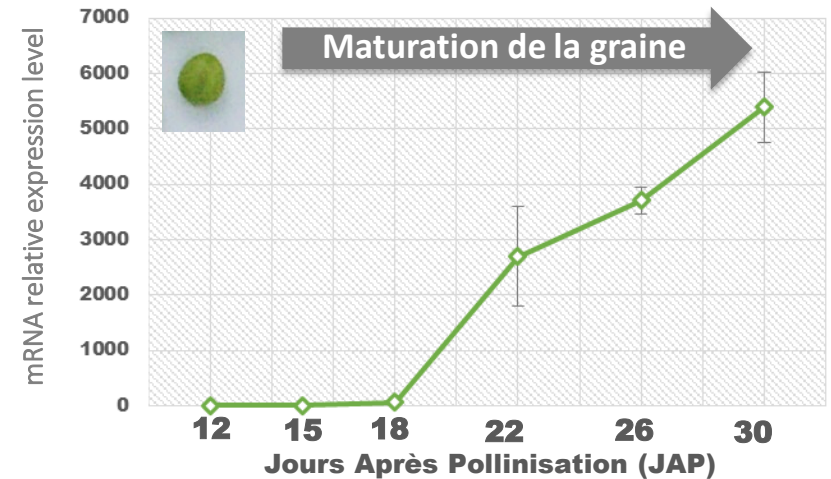
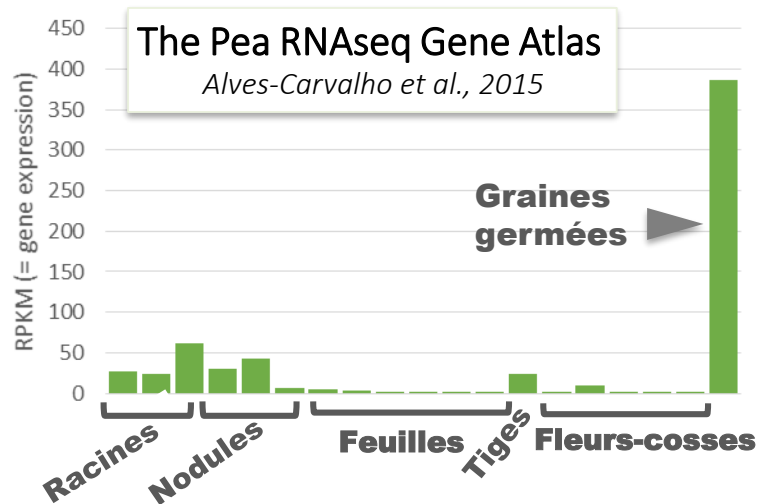


DDMP = 2,3-dyhydro-2,5-dihydroxy-6-methym-4H-pyran-4-one

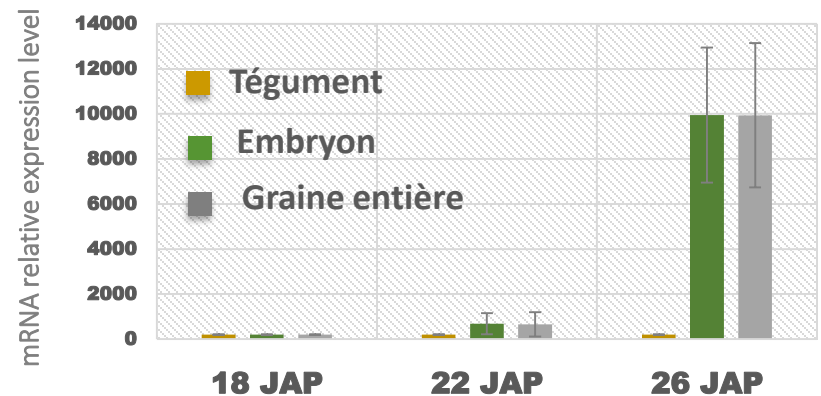


Caractérisation d'un gène codant pour la β -amyrine synthase chez le pois

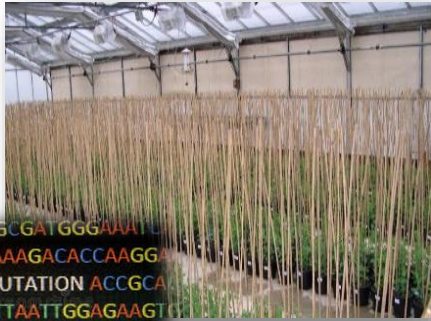
Une séquence de β -amyrine synthase de pois publiée (*PsPSY*, Morita et al., FEBS J.2004) dont l'activité enzymatique a été confirmée.



- Le gène *PsPSY* est induit lors de la maturation de la graine et s'exprime spécifiquement dans l'embryon



Recherche de mutants TILLING pour le gène PsPSY codant une β -amyrine synthase



CTTAGAGCGATGGGAAATL
GAGATAAAAGACACCAAGG
AGACC MUTATION ACCGCA
GGACAATTAATTGGAGAAGT
TAGGAGCTTTGTTCTTGGG
TGACGCTGACGGTACAGGCC

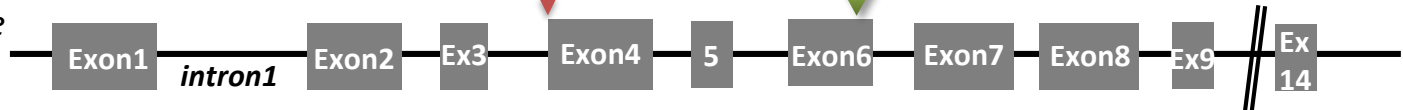
*Criblage de la Population de mutants
TILLING de pois (Cv Caméor)*



Jonction intron-exon
AG \rightarrow AA

Site actif
MWCYCR

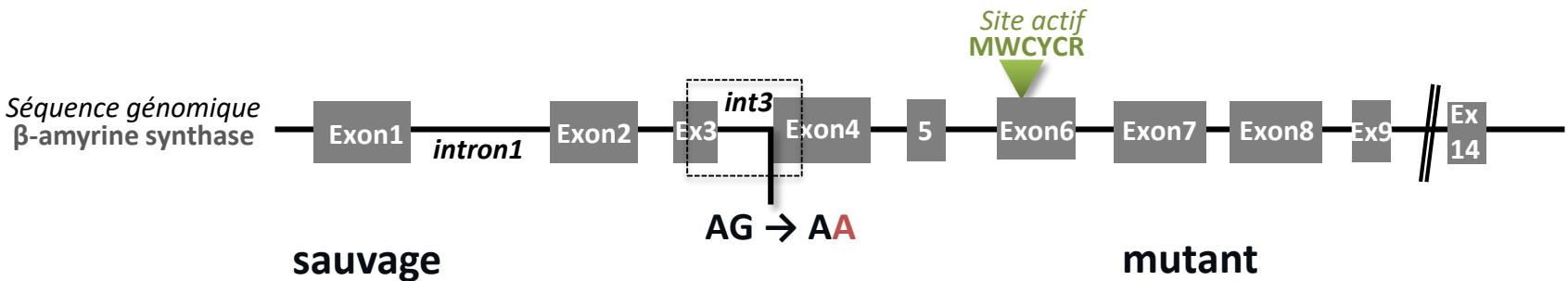
Séquence génomique
 β -amyrine synthase



➤ Effet sur la maturation de l'ARNm?



L'allèle mutant code pour une protéine tronquée et inactive



ATTACTGGACATCTTGATTCCGGTGTTCACACCAGAGCATCGC
 AAAGAGATTCTTCGTTATATATATTGCCACCAGGTACACTTG
 ATCATTCAATCTAGTCGAACCATAGAATTTGAGGGTCTTGG
 TGTTGATTATGAACAATTTGTATTAACCTTATTGTGTTTTCA
 TTTGAAGAACGAAGATGGAGGGTGGGGGCTTCACATTGAGGG
 TCATAGCACCATGTTTTGTACTGCA

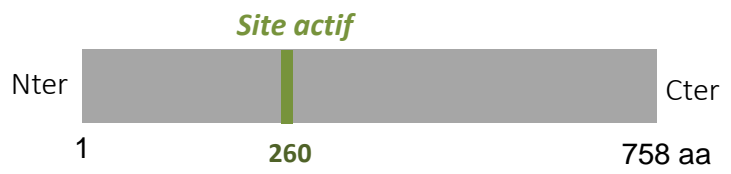
Épissage de l'intron 3 ↓

ATTACTGGACATCTTGATTCCGGTGTTCACACCAGAGCATCGC
 AAAGAGATTCTTCGTTATATATATTGCCACCAGAACGAAGAT
 GGAGGGTGGGGGCTTCACATTGAGGGTCATAGCACCATGTTT
 TGTACTGCA

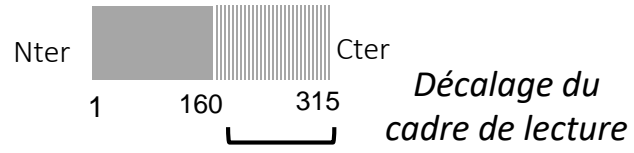
ATTACTGGACATCTTGATTCCGGTGTTCACACCAGAGCATCGC
 AAAGAGATTCTTCGTTATATATATTGCCACCAGGTACACTTG
 ATCATTCAATCTAGTCGAACCATAGAATTTGAGGGTCTTGG
 TGTTGATTATGAACAATTTGTATTAACCTTATTGTGTTTTCA
 TTTGAAAAACGAAGATGGAGGGTGGGGGCTTCACATTGAGGG
 TCATAGCACCATGTTTTGTACTGCA

Épissage de l'intron 3 ↓ et de 7bp de l'exon 4

ATTACTGGACATCTTGATTCCGGTGTTCACACCAGAGCATCGC
 AAAGAGATTCTTCGTTATATATATTGCCACCAGATGGAGGGT
 GGGGGCTTCACATTGAGGGTCATAGCACCATGTTTTGTACTG
 CA



Protéine sauvage



Protéine mutante prédite



Le mutant *psy* n'accumule plus de saponines dans les graines matures

➤ **Extraction**

Méthanol/eau

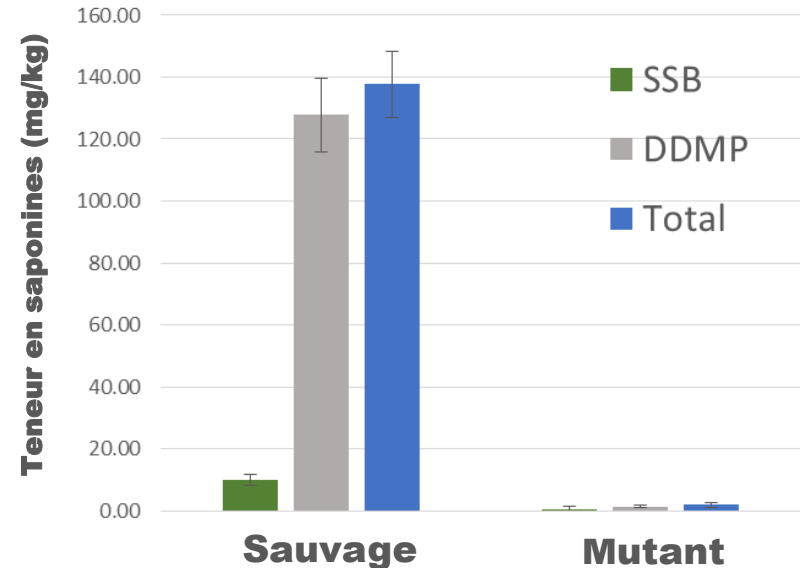
Temps court et température ambiante
(préservation de la forme DDMP)

➤ **Dosage par HPLC**

Étalonnage avec la soyasaponine B (SSB) commerciale

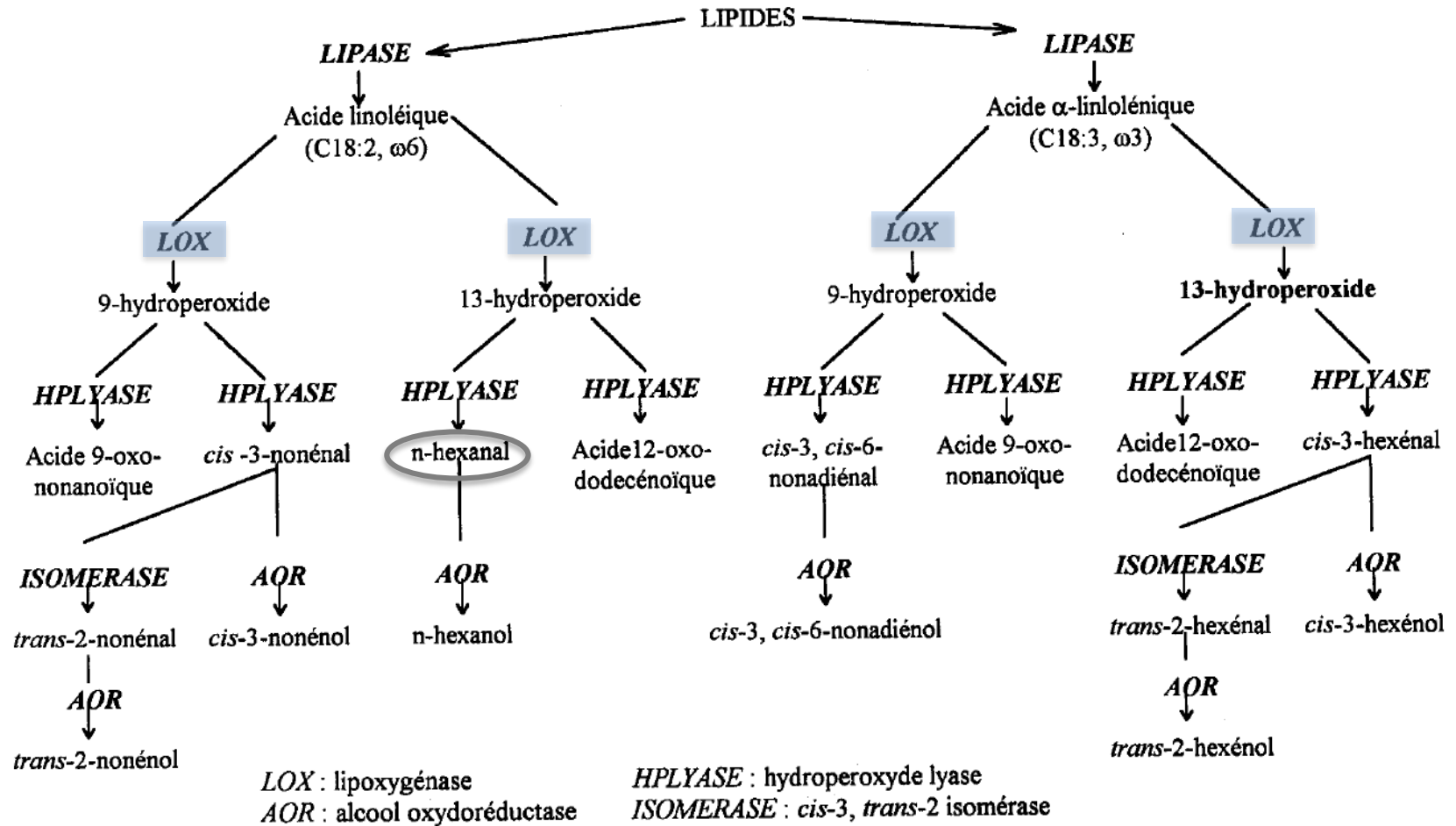
Quantification de la forme DDMP par rapport à la soyasaponine B en tenant compte du rapport des coefficients d'extinction (Hu et al., 2002)

Teneur en saponines des graines matures



- **Multiplication des plantes en cours**
- **Graines pour analyses sensorielles = amertume diminuée ?**
- **Analyse phénotypique détaillée du mutant.**

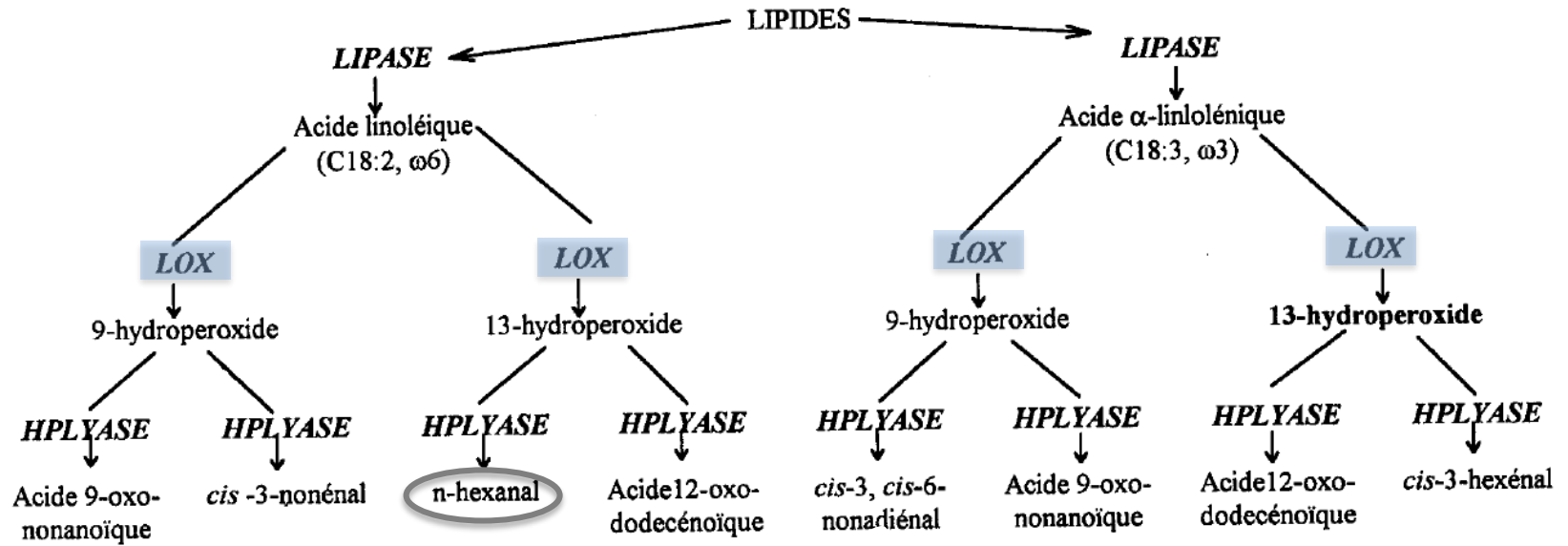
Les lipoxygénases, source de COV dans les graines



D'après Fauconnier et Marlier, 1997



Les lipoxygénases, source de COV dans les graines



5 LOX sont synthétisées dans la graine de pois dont 2 majeures, LOX2 et LOX3 ¹

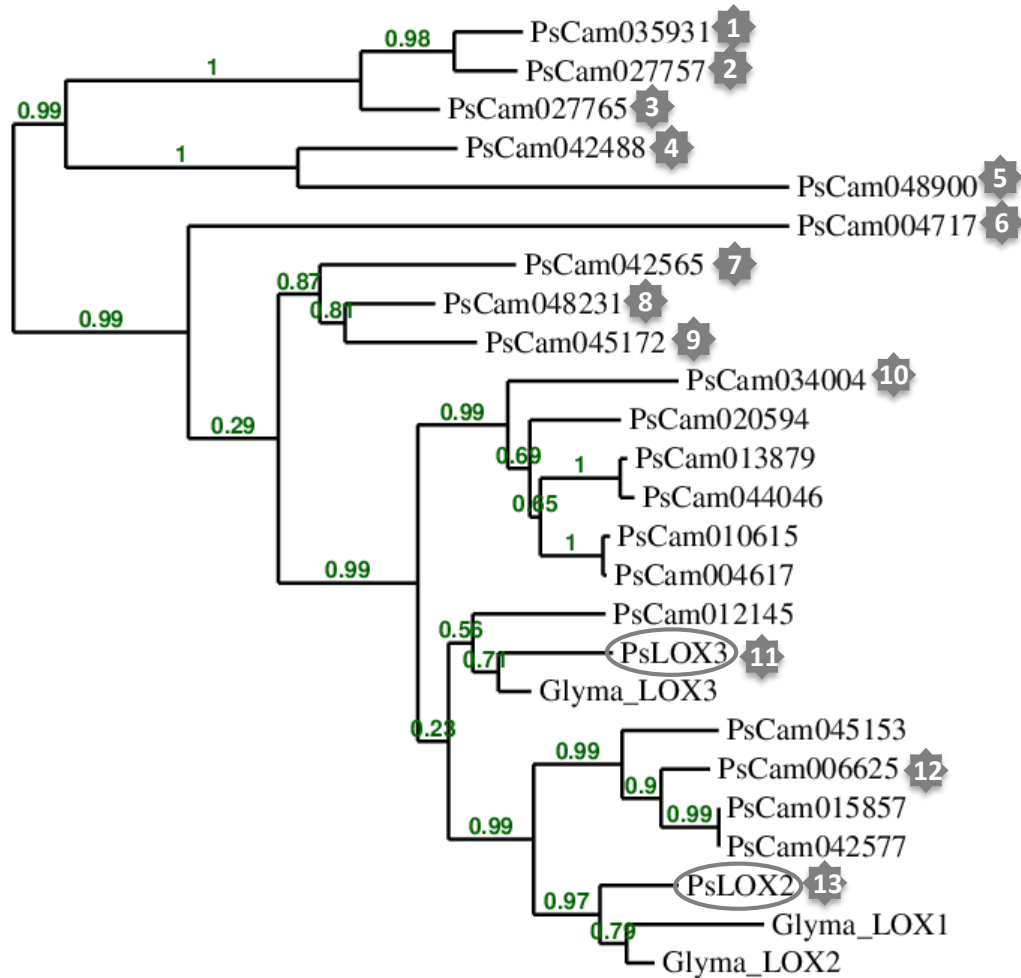
Nom	pH optimal ²	Ratio 13HPO / 9HPO ²	Substrat ²
PsLOX2	5.8- 6.4	7:1	C18:2 C18:3
PsLOX3	5.6 - 6.5	1:2	C18:2

85% d'identité entre LOX2 et LOX3

¹Domoney et al., 1990

²Hughes et al., 1998

Expression des lipoxygénases lors du développement de la graine de pois



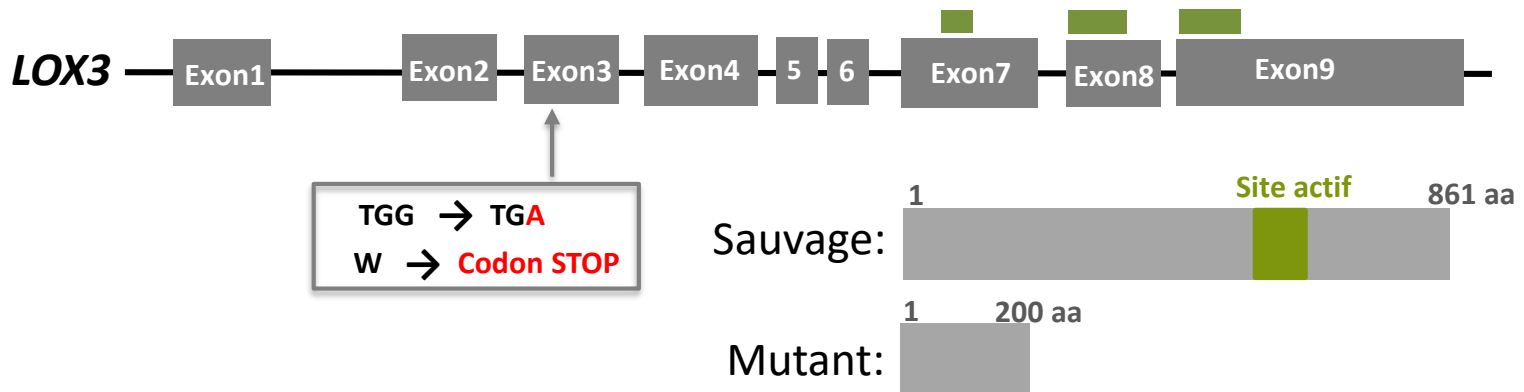
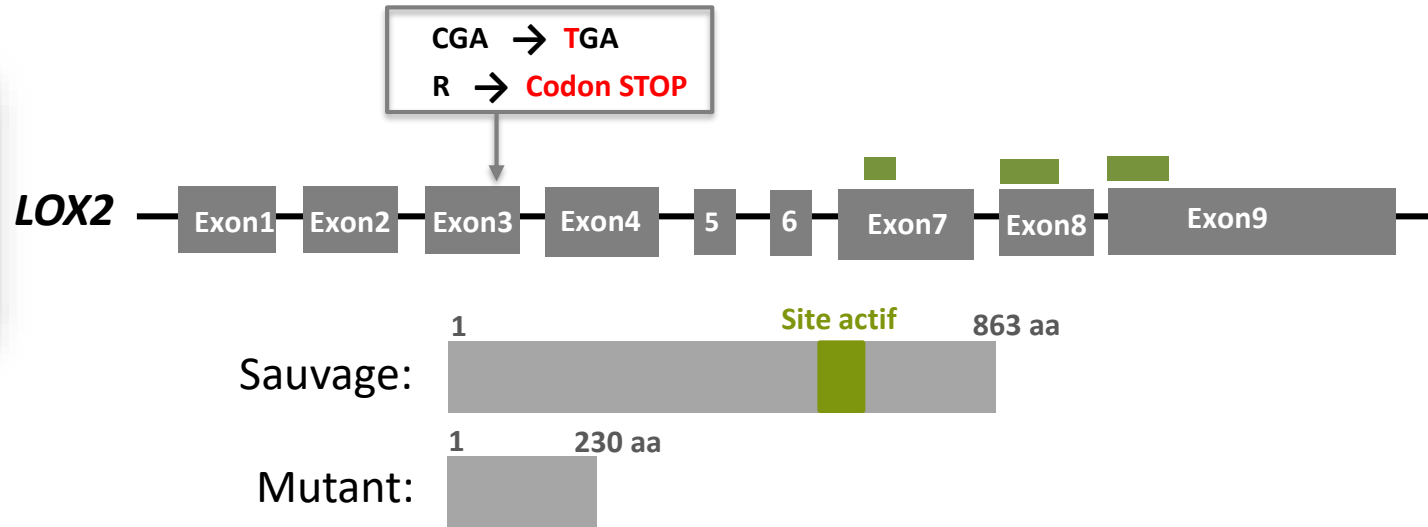
Maturation de la graine

	8 JAP	12 JAP	16 JAP	19 JAP	23 JAP	29 JAP
1	30	323	788	3947	7311	4167
2	1942	921	102	221	448	114
3	640	565	508	807	1464	366
4	1930	823	346	261	209	395
5	402	95	58	179	228	609
6	9	15	3	16	9	7
7	53	618	399	23	4	7
8	87	1083	373	271	208	38
9	1006	1331	68	97	138	525
10	0	1	4	1836	1488	3
11	52	70	13715	202404	248682	9996
12	216	11	5	8	9	3
13	39	61	16721	130260	175940	8001

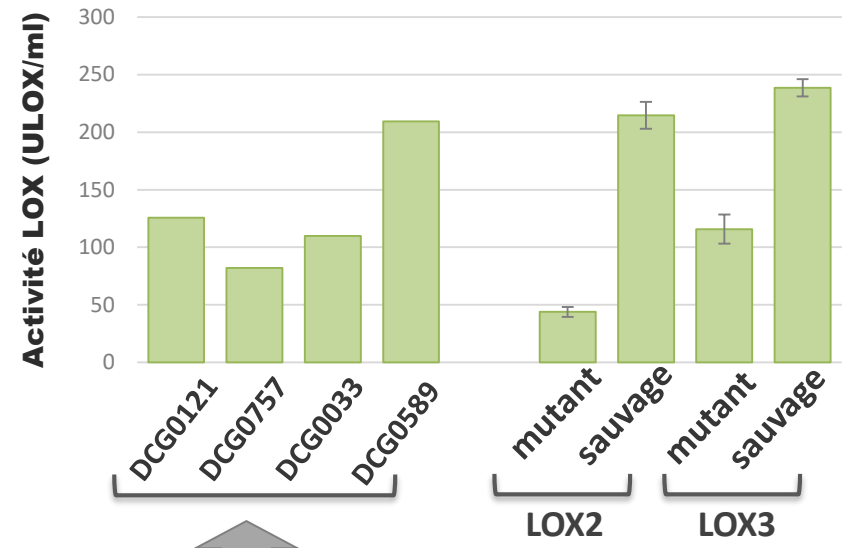
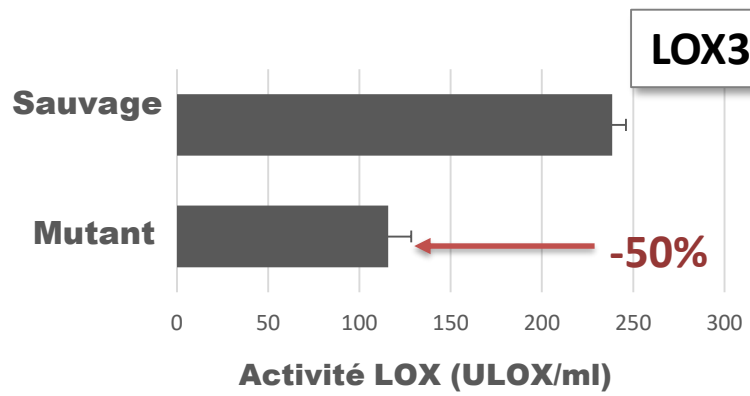
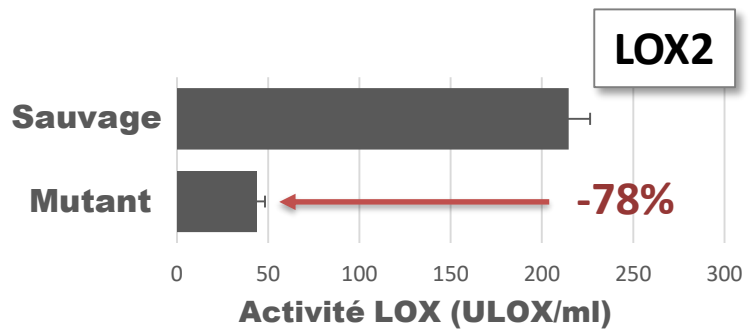
Données de RNA-seq (lectures normalisées)



Recherche de mutants TILLING pour les gènes *PsLOX2* et *PsLOX3*



Les mutants *lox2* et *lox3* montrent une réduction de l'activité LOX dans les graines



5 géotypes avec la plus faible activité

100 écotypes analysés pour leur activité LOX dans les graines matures

- Croisement *lox2* x *lox3* en cours
- **Activité LOX nulle?**
- **Production COV (hexanal, ..) affectée?**



Remerciements

Julie Marais

Ludivine Lebeigle

Myriam Sanchez

Brigitte Darchy

Christine Le Signor

Anthony Klein

Jean-Bernard Magnin-Robert

Gérard Duc

Richard Thompson

UMR1347 Agroécologie, INRA, Dijon



Marie-Aleth Lacaille-Dubois

Laboratoire de Pharmacognosie,
Faculté de Pharmacie de Dijon



Bonastre Oliete

Remi Saurel



UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques
Agro-Sup Dijon, Université de Bourgogne

