HAL open science

Quels leviers génétiques mobilisables afin d'améliorer l'équilibre en acides aminés des graines de légumineuses ?

Karine Gallardo, Christine Le Signor, Gérard Duc, Richard Thompson, Judith Burstin

▶ **To cite this version:**

Karine Gallardo, Christine Le Signor, Gérard Duc, Richard Thompson, Judith Burstin. Quels leviers génétiques mobilisables afin d'améliorer l'équilibre en acides aminés des graines de légumineuses ?. Innovations Agronomiques, 2017, 60, pp.43-57. 10.15454/1.5138508996277556E12 . hal-01685937

HAL Id: hal-01685937

https://hal.science/hal-01685937v1

Submitted on 16 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Quels leviers génétiques mobilisables afin d'améliorer l'équilibre en acides aminés des graines de légumineuses ?

Gallardo K.[1], Le Signor C.[1], Duc G.[1], Thompson R.[1], Burstin J.[1]

[1] Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000, Dijon

Correspondance : karine.gallardo-guerrero@inra.fr

Résumé

Bien que certains constituants réputés « antinutritionnels » en alimentation animale aient été réduits dans les graines des différentes variétés de légumineuses, et que la qualité nutritionnelle soit globalement bonne, certains éléments de la composition protéique des graines restent à améliorer et à stabiliser pour d'avantage d'équilibre en acides aminés. Les régions génomiques contrôlant la composition protéique des graines ont été identifiées chez le pois et l'identification des gènes impliqués a été accélérée par une approche translationnelle entre cette espèce et la légumineuse modèle *M. truncatula*. Ces données offrent la possibilité de définir des marqueurs moléculaires pour aider à la sélection de variétés améliorées dans leur valeur nutritionnelle en alimentation animale ou humaine. Une large diversité génétique naturelle ou induite pour la composition protéique et en acides aminés existe chez les légumineuses cultivées en France (par exemple, pois et féverole) qui permet d'obtenir de nouveaux profils protéiques. Les outils moléculaires et la diversité génétique mobilisables pour mieux adapter les matières premières à différents usages alimentaires sont présentés.

Mots-clés : *Pisum sativum*, *M. truncatula*, Protéines, Protéomique, Protein Quantity Loci, Génétique d'association à l'échelle du génome entier (GWAS), Approche translationnelle

Abstract: Which genetic levers for an improved amino acid balance in grain legume seeds?

Although some factors called "anti-nutritional factors" for feeds have been reduced in seeds of the different varieties of legume crops, and although nutritional quality is globally good, some elements of seed protein composition remains to be improved and stabilized for a better amino acid balance. The genomic regions controlling seed protein composition have been identified in pea and the identification of the underlying genes accelerated using a translational approach between this species and the model legume *M. truncatula*. These data offer the opportunity of defining molecular markers to assist in the selection of varieties improved in their nutritional value for animal or human nutrition. A large natural or induced genetic diversity for protein and amino acid composition exists in the legume species cultivated in France (*e.g.* pea and faba bean) which makes possible to obtain new protein profiles. The molecular tools and genetic diversity that can be mobilized to better adapt raw materials to different food uses are presented.

Keywords: *Pisum sativum*, *M. truncatula*, Proteins, Proteomics, Protein Quantity Loci, Genome-wide association studies (GWAS), Translational approach

Introduction

Les légumineuses accumulent des quantités importantes de protéines dans leurs graines même en l'absence de fertilisation azotée. Ceci est permis grâce aux symbioses racinaires qu'elles établissent avec des bactéries fixatrices d'azote de l'air et à leur capacité à remobiliser l'azote mis en réserve dans

les organes vers les graines (Schiltz et al., 2005). Ainsi, la culture de légumineuses comme le pois (*Pisum sativum* L.), la féverole (*Vicia faba* L.) et les lupins (*Lupinus sp.*) répond au double enjeu d'augmenter l'autonomie européenne en protéines végétales et de diminuer l'apport d'intrants azotés. Riches en lysine, leurs graines sont majoritairement utilisées en alimentation animale en complément des grains de céréales plus pauvres en protéines et en cet acide aminé essentiel. Par ailleurs, leur valeur nutritionnelle et santé remet à la mode leur utilisation dans l'alimentation humaine, où de nouveaux produits simplifiant leur utilisation sont proposés, comme des pâtes ou steaks incorporant des ingrédients issus de graines de légumineuses ou des yaourts enrichis en protéines de légumineuses. Pourtant, en Europe, la culture des légumineuses à graines représente moins de 3% des surfaces agricoles, ce qui est bien inférieur à d'autres continents comme les Etats-Unis et le Canada (Source UNIP). Un frein à leur culture est l'instabilité des rendements, en raison de la sensibilité de ces espèces à différents stress biotiques et abiotiques, et de la teneur en protéines des graines, un critère important en nutrition humaine et animale. Il est aussi à noter la faible proportion d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) et de tryptophane dans les graines de légumineuses, chacun représentant entre 2 et 4% de la teneur totale en acides aminés (Burstin et al., 2011). La méthionine et le tryptophane sont des acides aminés essentiels que l'homme et les animaux sont incapables de synthétiser et qu'ils doivent donc obligatoirement trouver dans leur alimentation, d'où l'importance d'augmenter leur abondance dans les graines de légumineuses comme gage de qualité. Si certains facteurs réputés « antinutritionnels » en alimentation animale (ex. inhibiteurs de la trypsine) présents dans les graines ont été réduits dans les différentes variétés de légumineuses cultivées (Page et al., 2003 ; Clemente et al., 2015), la composition protéique reste à améliorer au regard de l'équilibre en acides aminés.

Les déterminants majeurs de la composition en acides aminés des graines de légumineuses sont les globulines, qui représentent jusqu'à 70-80% des protéines totales. Communément appelées protéines de réserve, elles sont codées par des familles multigéniques et ont été classées en deux sous-groupes selon leur coefficient de sédimentation après ultracentrifugation : 7S et 11S (Osborne, 1924). Les globulines 11S sont plus avantageuses que les 7S du point de vue nutritionnel, étant plus riches en acides aminés soufrés. Les graines de légumineuses contiennent d'autres protéines de réserve plus minoritaires que sont les albumines 2S. Comme ces protéines sont riches en méthionine, leur abondance a été augmentée par transgénèse chez le soja (*Glycine max* L.) et le lupin (*Lupinus angustifolius* L.) (Altenbach et al., 1989 ; Molvig et al., 1997). Bien que les graines produites sont plus riches en méthionine, elles s'accumulent au détriment d'autres composés soufrés comme le glutathion bien connu pour son rôle antioxydant dans les processus de défense (Tabe et Droux 2002). Le développement de la production de protéines végétales en France et en Europe pour atteindre l'indépendance protéique nécessite d'amplifier les recherches dans ce domaine afin de fournir des outils d'aide à la sélection de variétés de légumineuses produisant des graines de meilleure valeur nutritionnelle possible. L'identification des gènes permettant de maintenir sous contrainte environnementale le niveau des protéines les plus avantageuses aux niveaux nutritionnel et technologique est donc un enjeu majeur. Ainsi, les objectifs de cet article sont (i) de faire le bilan de l'état des connaissances sur le contrôle génétique et environnemental de l'accumulation des protéines des graines de légumineuses, avec un focus sur le pois, la légumineuse à graine la plus cultivée en France, (ii) de relater les avancées réalisées chez les espèces modèles dans la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant la composition protéique ou la teneur en acides aminés des graines, et (iii) de proposer des pistes pour utiliser les avancées obtenues comme leviers afin d'optimiser et de stabiliser la composition protéique des graines de légumineuses.

1. Stabiliser la composition protéique des graines

Il existe une grande diversité de teneur en protéines des graines (20% à 40%) entre les différentes espèces légumineuses, ainsi qu'entre génotypes d'une même espèce (18 à 32% pour le pois)

(Gueguen et Lemarié, 1996). Cette variabilité est suffisante pour permettre différentes applications exploitant les fractions amidon ou protéique, la teneur en protéines des graines étant inversement corrélée à la teneur en amidon (Wang et Daun, 2004). Toutefois, quel que soit l'espèce, les fractions protéiques sont complexes et la proportion d'acides aminés soufrés et de tryptophane reste faible. Chez le pois, les albumines, vicilines et légumines peuvent être quantifiées après séparation par chromatographie échangeuse d'ions (Figure 1). Pour disséquer plus finement la composition protéique des graines de pois, la méthode d'électrophorèse bi-dimensionnelle a été utilisée. Elle a permis d'établir une carte de référence du protéome des graines de pois, avec 156 polypeptides annotées dont 104 sont des globulines (Bourgeois et al., 2009). Seulement 13 gènes de globulines de pois sont recensés dans les bases de données publiques, montrant l'importante contribution des modifications post-traductionnelles à la maturation des globulines. Cette carte de référence a été utilisée pour étudier la plasticité de la composition protéique des graines de trois génotypes de pois cultivés trois années successives. Les résultats ont révélé des variations significatives de la composition protéique entre génotypes et entre années qui peuvent influencer à la fois l'équilibre en acides aminés et la digestibilité. Une augmentation de l'abondance relative des vicilines, les premières protéines de réserve synthétisées lors du développement de la graine de pois (Chandler et al., 1984), est observée l'année 2003. Cette année étant caractérisée par de fortes températures, il est probable que le remplissage des graines se soit arrêté prématurément, limitant l'accumulation des protéines de réserve plus tardives (Larmure et al., 2005).

Parmi les facteurs environnementaux contribuant aux variations de composition protéique est un déficit en sulfate disponible, qui chez le pois réduit drastiquement l'accumulation des protéines riches an acides aminés soufrés (Chandler et al., 1983). La régulation du niveau de ces protéines par la nutrition soufrée est principalement transcriptionnelle (Chandler et al., 1984) et deux métabolites soufrés, l'O-acétylsérine et la méthionine, agissent comme signal pour réguler l'expression des gènes codant les protéines de réserve les plus riches en soufre (Tabe et al., 2010). Depuis les années 1980, les mesures d'épuration des fumées industrielles ont conduit à une baisse progressive des retombées de soufre sur les sols français. Ces mesures ont réduit la disponibilité en sulfate, précurseur de la synthèse des acides aminés soufrés et de nombreuses autres molécules nécessaires à la croissance et au développement des plantes, d'où l'importance de prendre en compte la nutrition soufrée lors de la conception de systèmes de cultures agroécologiques. En utilisant la légumineuse modèle *Medicago truncatula (M. truncatula)*, nous avons comparé les stratégies d'allocation des nutriments en réponse à une carence en soufre avec les caractéristiques de rendement et de qualité des graines (Zuber et al., 2013). Ces travaux ont montré qu'en plus de diminuer la production de graines, une carence en soufre à un stade végétatif réduit l'allocation de soufre, de carbone et d'azote vers les graines en formation, qui, à maturité, sont affectées dans leur vigueur germinative. Privées de soufre plus tardivement au moment de la floraison, les plantes remobilisent les nutriments stockés dans les organes sources pour produire leurs graines qui apparaissent peu affectées dans leur vigueur germinative et contiennent des quantités normales de carbone et d'azote. Toutefois, les graines ont majoritairement accumulé des protéines de réserve pauvres en acides aminés soufrés. L'identification de mécanismes ou de partenaires symbiotiques permettant de maintenir la nutrition soufrée ou l'allocation de soufre vers les graines revêt un intérêt particulier au regard de stabiliser la composition protéique des graines. De manière intéressante, des études ont révélé un effet bénéfique de la symbiose mycorhizienne à arbuscules dans la nutrition soufrée des légumineuses (Allen et Shachar-Hill 2009 ; Casieri et al., 2012), suggérant que cette symbiose puisse contribuer à stabiliser l'accumulation des protéines de réserve relativement riches en acides aminés soufrés dans les graines.

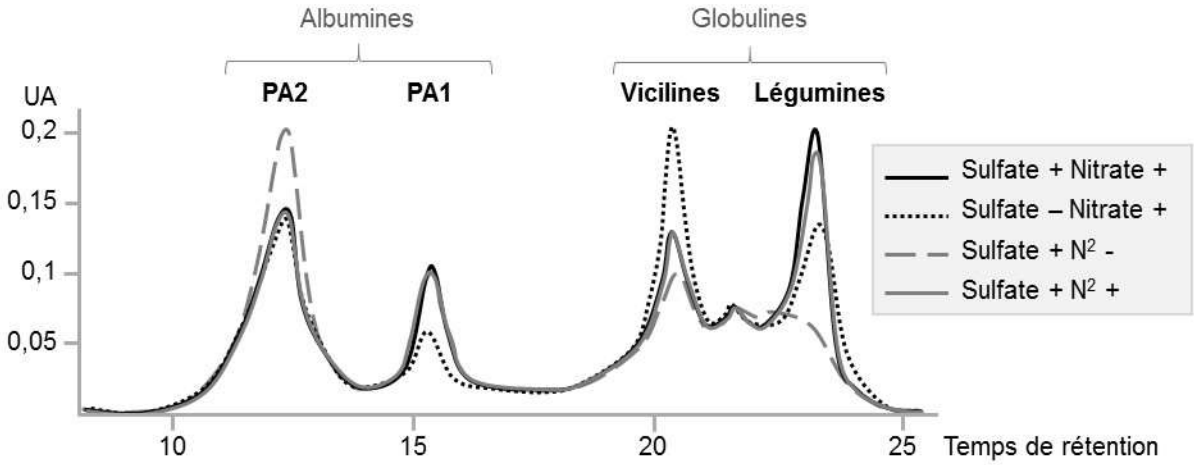

Figure 1 : Représentation schématique des profils protéiques types, révélés par chromatographe liquide FPLC (fast protein liquid chromatography), des graines de pois soumis à une carence en soufre ou incapables de noduler. Une carence en soufre appliquée à la fin de la phase végétative (Sulfate - Nitrate +) diminue l'accumulation des albumines et globulines les plus riches en soufre (PA1 et légumines) comparé à la condition témoin (Sulfate + Nitrate +). Des mutants de pois non nodulants développés en présence d'une faible concentration en nitrate (50N, Sulfate + N^2 -) produisent des graines pauvres en légumines et plus riches en albumine PA2, comparé au génotype sauvage fixateur d'azote développé dans les mêmes conditions (Sulfate + Fixation N^2 +).

Par ailleurs, des études ont montré que des mutants de pois incapables d'établir des symbioses avec les bactéries fixatrices d'azote de l'air et fertilisés avec peu ou pas de nitrate (0 à 50 kg N ha^{-1}) ont un rendement en graines et une teneur en protéines totales très fortement réduits, avec notamment un appauvrissement en légumines (10% de la quantité de protéines, comparé à 35% chez le génotype sauvage cv. Frisson (Duc et al., 1997). Le potentiel de fixation de l'azote de l'air, qui détermine la quantité et la qualité des protéines au sein de la graine, varie en fonction des souches de rhizobium, des génotypes de plantes, et des conditions environnementales (Miklas et al., 2006 ; Bourion et al., 2010 ; Abi-Ghanem et al., 2013). De nombreux travaux ont montré l'importance de la nutrition soufrée pour l'établissement de ce potentiel, y compris chez le pois (Scherer et Lange 1996 ; Scherer et al., 2006), et des études plus récentes indiquent que le transport de l'ion sulfate au sein des nodosités est requis pour la fixation d'azote. En effet, les nodules de mutants incapables de transporter le sulfate dans les nodosités (mutants *sst1*, *symbiotic sulfate transporter 1)* sont blanchâtres, caractéristique d'un défaut d'accumulation de leghémoglobine essentielle au fonctionnement de la nitrogénase (Krusell et al., 2005). De manière intéressante, la différentiation des nodosités fait intervenir d'importants processus épigénétiques de déméthylation récemment étudiés chez *M. truncatula* (Satgé et al., 2016), et l'homologue du transporteur de sulfate SST1 fait partie des gènes hypométhylés susceptibles de participer au contrôle de la différenciation des bactéroïdes..

Ainsi, pour maitriser/stabiliser la valeur nutritionnelle des graines de légumineuses, il s'agit non seulement de sélectionner des variétés améliorées en qualité et quantité de produits, mais aussi de choisir des conduites de culture et zones pédoclimatiques adaptées aux objectifs d'usage des graines. Par exemple, pour maintenir, voire augmenter, l'accumulation des légumines, il conviendra d'optimiser le pouvoir fixateur d'azote et la nutrition soufrée. Par ailleurs, les profils protéiques contrastés, présentés Figure 1, peuvent être testés pour leurs qualités nutritionnelles afin d'orienter les recherches vers la sélection de profils mieux adaptés aux différentes alimentations (humaines, animales).

2. Comprendre les mécanismes pour améliorer et stabiliser la qualité des graines

Un aspect à considérer en vue d'augmenter l'accumulation des acides aminés essentiels comme le tryptophane et la méthionine est la présence de boucles de rétrocontrôle dans les voies de biosynthèse de ces acides aminés (Jander et Joshi, 2010). La *S*-adénosylméthionine, un métabolite dérivé de la méthionine, régule négativement la cystathionine gamma synthase, qui conduit à la synthèse de méthionine (Hacham et al., 2007), et le tryptophane inhibe sa propre synthèse en régulant négativement la première enzyme de sa voie, l'anthranilate synthase (Ufaz et Galili, 2008). Il est à noter que la lysine régule négativement l'activité de la première enzyme de sa voie de biosynthèse, la dihydropicolinate synthase (Galili, 2002), mais aussi la quantité de *S*-adénosylméthionine (Hacham et al., 2007). La levée du rétrocontrôle de ces voies a permis d'augmenter par transgenèse la synthèse de certains acides aminés. Chez Arabidopsis, les graines de lignées transgéniques exprimant une dihydrodipicolinate synthase insensible à l'inhibition par la lysine ont des teneurs plus élevées en lysine et en méthionine (Zhu et Galili, 2003). Des lignées d'Arabidopsis qui expriment spécifiquement dans la graine une forme de cystathionine gamma synthase insensible à l'inhibition ont d'avantage de méthionine et de protéines dans leurs graines (Cohen et al., 2014). Enfin, chez le soja, l'introduction de gènes codant des formes d'anthranilate synthase insensibles à l'inhibition par le tryptophane augmente l'abondance du tryptophane dans les graines (Inaba et al., 2007 ; Ufaz et Galili, 2008 ; Ishimoto et al., 2010). Toutefois, la vigueur germinative des graines est généralement réduite (Zhu et Galili, 2003 ; Wakasa et al., 2006). Ceci pourrait s'expliquer par l'effet toxique des acides aminés libres augmentés dans ces lignées transgéniques et/ou par des défauts d'accumulation d'autres composés nécessaires à la germination. Il convient donc d'augmenter non seulement la synthèse des acides aminés essentiels mais aussi leur incorporation dans les protéines de réserve au sein de l'embryon, en veillant à maintenir le niveau des autres métabolites nécessaires à la germination. Cet enjeu nécessite de connaitre les mécanismes moléculaires concourant à l'accumulation des protéines de réserve et des autres métabolites dérivés des acides aminés essentiels pendant le développement de la graine.

La phase de développement de la graine sur la plante mère a fait l'objet de nombreuses études chez la légumineuse modèle *M. truncatula*, visant à identifier les voies métaboliques impliquées (Gallardo et al., 2007 ; Benedito et al., 2008 ; Thompson et al., 2009). Une étude simultanée du protéome et du transcriptome des graines de *M. truncatula* en développement a révélé l'accumulation de transcrits et de protéines impliqués dans les voies de réduction du sulfate et du métabolisme des acides aminés soufrés lors du remplissage des graines, suggérant une utilisation du sulfate pour la synthèse de cystéine et de méthionine lors de l'accumulation des protéines de réserve. Ces données corroborent des observations précédentes montrant que les graines de lupin sont capables de réduire et d'assimiler le sulfate en quantité suffisante pour combler leurs besoins (Tabe et Droux 2001). De plus, les résultats obtenus par Sexton et Shibles (1999) indiquent que chez le soja, les graines en développement sont le site principal de réduction du sulfate au cours de la phase reproductive et que la majorité des acides aminés soufrés est synthétisée dans les graines plutôt qu'importée des autres tissus. Ces données montrent l'importance du transport de sulfate jusqu'à la graine pour l'accumulation des acides aminés soufrés et leur incorporation dans les protéines de réserve.

L'étude de la distribution des différents transcrits et protéines du métabolisme du soufre dans les trois tissus majeurs de la graine (téguments, albumen et embryon) au début du remplissage (14 jours après pollinisation, Figure 2), a mis en évidence une importante spécialisation métabolique tissulaire (Gallardo et al., 2007). Les gènes impliqués dans la réduction du sulfate s'expriment dans les trois tissus de la graine, tandis que les gènes codant l'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) kinase, qui oriente le métabolisme du soufre vers la synthèse de métabolites secondaires, et la glutathion synthétase, s'expriment préférentiellement dans les enveloppes de la graine. D'autre part, les données « omiques » associées aux voies de biosynthèse de la méthionine suggèrent l'importance du cycle de méthylation, faisant intervenir la S-adénosylhomocystéine hydrolase, au sein de l'embryon (Gallardo et al., 2007). Ce

travail permet de proposer un modèle selon lequel les téguments et l'albumen ont un métabolisme soufré orienté vers la synthèse de glutathion et de métabolites secondaires, tandis que l'embryon utilise la majorité du sulfate pour la synthèse des acides aminés soufrés et le maintien du cycle de méthylation. Ce cycle, qui régénère la méthionine, est probablement requis pour le fonctionnement des cellules embryonnaires puisqu'il conduit, *via* la *S*-adénosylméthionine, à la méthylation des acides nucléiques, des protéines, des lipides et de divers métabolites. Ce modèle implique un échange de sulfate entre les tissus de la graine et donc l'existence de systèmes de transport de sulfate dans la graine. La disponibilité de mutants d'Arabidopsis pour les gènes codant des transporteurs de sulfate exprimés dans la graine a permis de tester cette hypothèse. Les résultats ont mis en évidence un rôle des transporteurs de sulfate du groupe 3 (SULTR3) dans les échanges de sulfate à l'intérieur de la graine d'Arabidopsis, affectant la maturation des globulines et la teneur en cystéine libre des graines matures (Zuber et al., 2010). Il est à noter que le mutant *sultr3;5* d'Arabidopsis est le plus affecté dans la maturation des protéines de réserve. Cet effet, similaire à celui d'une carence en soufre sur le protéome des graines (Higashi et al., 2006), résulte probablement d'un défaut de chargement en sulfate de l'embryon. Nous avons plus récemment montré la capacité qu'ont les légumineuses d'accumuler des quantités élevées de sulfate dans leurs vacuoles lorsque la nutrition soufrée est suffisante (Zuber et al., 2013). L'établissement de ce puits de sulfate et sa remobilisation vers les graines sont probablement des leviers d'action pour stabiliser la composition protéique des graines lorsque les sols s'appauvrissent en nutriments et/ou en eau.

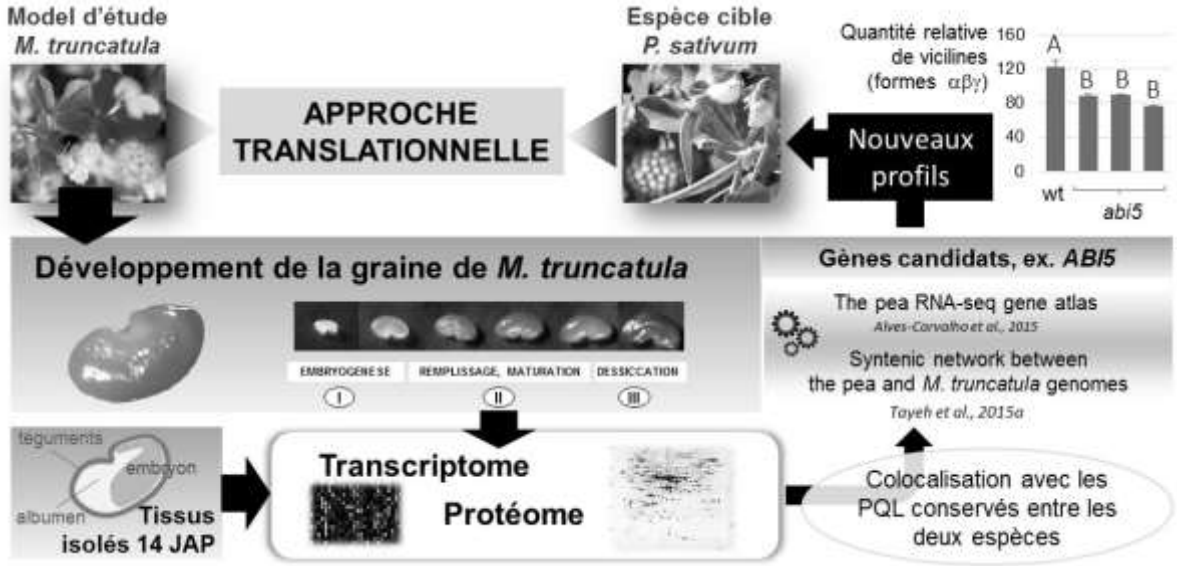

Figure 2 : Approche utilisée pour l'identification de gènes candidats pour la qualité de la graine et le transfert des connaissances vers le pois. Les graines de l'espèce modèle *M. truncatula* ont été soumises à des études post-génomiques dans l'objectif de révéler les voies métaboliques associées à la phase de remplissage et d'identifier des gènes susceptibles de contribuer à l'accumulation des protéines de réserve (Gallardo et al., 2007 ; Benedito et al., 2008 ; Verdier et al., 2008). Les gènes retenus colocalisent avec des QTL de composition protéique des graines matures (Protein Quantity Loci, PQL). Les gènes de pois orthologues sont identifiés dans les bases de données récemment développées chez cette espèce (Alves-Carvalho et al., 2015 ; Tayeh et al., 2015a) et de nouveaux profils protéiques sont obtenus en recherchant des variants alléliques de ces gènes. Le graphique montre une diminution de la quantité de vicilines dans les graines de trois lignées porteuses de mutations ponctuelles dans le gène *abscisic acid-insensitive 5* (mutants *abi5*, données extraites de Le Signor et al., 2017), comparé au génotype sauvage (wt).

3. Apport des recherches translationnelles entre espèces modèles et cultivées

3.1 Gènes candidats aux QTL de composition protéique des graines

Les régions génomiques contrôlant la composition protéique des graines ont été identifiées chez le pois en vue de définir des marqueurs utilisables en sélection (Bourgeois et al., 2011). Pour accélérer l'identification des gènes impliqués, le même travail a été conduit chez la légumineuse modèle M. truncatula (Le Signor et al., 2017). Pour ces deux espèces, l'approche PQL (Protein Quantity Loci) développée par Damerval et al. (1994) a été appliquée aux graines d'une population de lignées recombinantes issue d'un croisement entre deux génotypes parentaux contrastés pour la composition protéique des graines. Les différents polypeptides des graines ont été quantifiés après séparation par électrophorèse bidimensionnelle et les régions chromosomiques responsables des variations d'abondance ont été cartographiées. Les résultats ont révélé des groupes de PQL, contrôlant l'accumulation d'une ou de plusieurs familles de protéines de réserve, avec en moyenne deux PQL détectés par polypeptide. Pour chaque espèce, une analyse approfondie des caractéristiques expérimentales des polypeptides (points isoélectriques, poids moléculaires et séquences révélées par spectrométrie de masse) a mis en lumière les PQL contrôlant les processus de maturation des globulines 7S et 11S, c'est-à-dire l'accumulation des différentes formes : résiduelles non clivées (formes précurseurs, 5% des spots de globulines), abondantes (formes $\alpha\beta\gamma$ pour les vicilines et α et β pour les légumines, 34% des spots), ou faiblement abondantes (formes protéolysées, 61% des spots). Ce travail a permis d'identifier les régions régulatrices de la synthèse ou du clivage des protéines de réserve.

Les marqueurs ponts entre les cartes génétiques de pois et de *M. truncatula* (Bordat et al., 2011) ont permis de comparer la position des PQL entre les deux espèces. Environ 50% des groupes de PQL sont conservés (Le Signor et al., 2017). Un exemple est montré Figure 3 où six des 13 groupes de PQL détectés pour les différentes formes de vicilines sont conservés avec le pois. Pour identifier les gènes impliqués, une carte consensus génétique-expressionnelle a été construite chez *M. truncatula*, représentant 15 495 gènes dont le profil était disponible dans l'atlas de données transcriptomiques (Benedito *et al.,* 2008). La classification fonctionnelle selon AgriGO (Tian et al., 2017) des gènes sous-jacents aux PQLs conservés entre les deux espèces et spécifiquement exprimés dans la graine a révélé la surreprésentation de facteurs de transcription. Cinq de ces gènes s'expriment lors de la phase de remplissage des graines (16-24 jours après la pollinisation), dont deux localisés en bas du chromosome 7 (Figure 3), une région PQL expliquant jusqu'à 70% de la variabilité observée pour les quantités de légumines et de vicilines. Le premier code le facteur de transcription FUSCA3 déjà connu chez Arabidopsis pour son rôle dans l'accumulation des protéines de réserve (Kroj et al., 2003). Le second code le facteur de transcription ABI5 (abscisic acid-insensitive 5) impliqué dans la longévité des graines (Zinsmeister et al., 2016). En caractérisant des mutants de pois porteurs de mutations ponctuelles dans le gène *ABI5*, son rôle dans le contrôle de la composition protéique de la graine de pois a été vérifié, attestant de la pertinence de notre approche translationnelle (Le Signor et al., 2017). Les graines des mutants sont pauvres en vicilines (Figure 2) et le rapport légumine/viciline est augmenté dans les graines des mutants de pois pour *ABI5*, ce qui est avantageux du point de vue nutritionnel. Il n'est toutefois pas à négliger le rôle d'ABI5 dans l'acquisition de la tolérance à la conservation (Zinsmeister et al., 2016), nécessaire à la survie des graines.

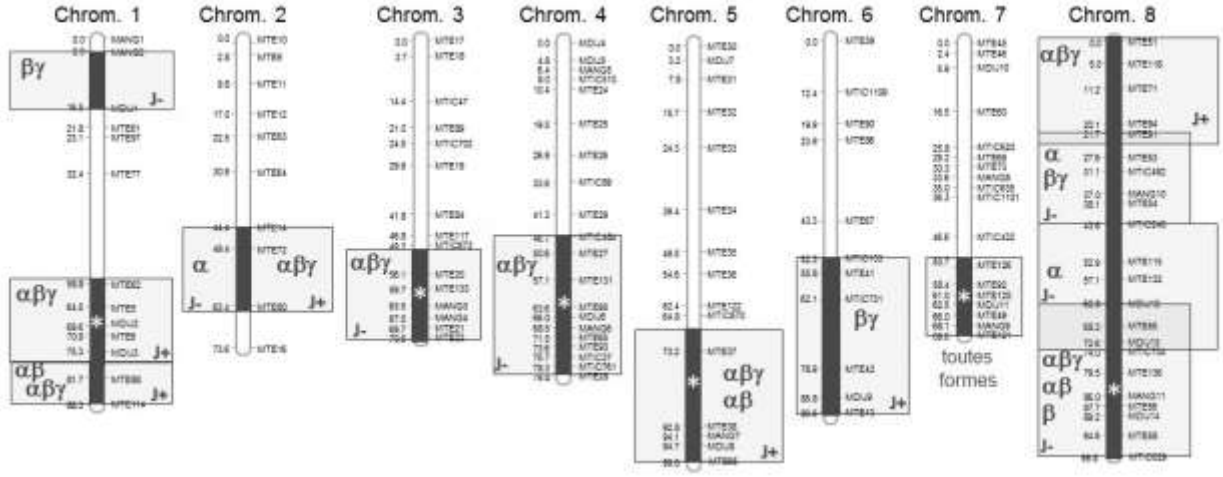

Figure 3 : Régions PQL (Protein Quantity Loci) détectées pour les vicilines chez *M. truncatula*. La carte génétique a été obtenue à partir de la population de lignées recombinantes issue du croisement entre les génotypes parentaux Jemalong 6 et DZA 315.16 (carte initialement développée par Thierry Huguet, ENSAT Toulouse; puis complétée par Vandecasteele et al., 2011). Les rectangles montrent les régions PQL réparties sur les 8 chromosomes (Chrom.) contrôlant l'accumulation des polypeptides de vicilines quantifiés dans les gels d'électrophorèse bi-dimensionnelle. L'effet de l'allèle du parent Jemalong est indiqué : J+, effet positif sur les quantités de vicilines ; J-, effet négatif. Les astérisques indiquent les régions PQL conservées avec le pois. Ces données sont extraites de Le Signor et al. (2017).

3.2 Génétique d'association à l'échelle du génome

Les nouvelles technologies de séquençage des génomes et de génotypage à haut débit offrent des perspectives d'identification directe de marqueurs utilisables en sélection et de gènes contrôlant la synthèse ou le clivage/la structure des protéines de réserve. Chez le pois, une carte génétique dense en marqueurs a été développée qui permettra de préciser la localisation des régions PQL (Tayeh et al., 2015b, a). Pour aller jusqu'à l'identification des gènes causaux, il est dorénavant possible d'explorer les variations alléliques à l'échelle du génome pour des centaines d'écotypes. Des millions de polymorphismes de séquences sont identifiés et ceux associés statistiquement aux variations de caractères de qualité des graines au sein d'une collection d'écotypes sont recherchés par génétique d'association à l'échelle du génome entier (GWAS). L'identification des gènes porteurs de ces polymorphismes est facilitée par l'annotation des séquences d'un génome de référence, dont l'obtention est en cours pour plusieurs légumineuses, y compris le pois, dans le cadre de consortiums internationaux.

Nous avons récemment utilisé l'approche GWAS chez *M. truncatula* dans l'objectif d'établir une liste de gènes contrôlant la synthèse ou la maturation des différentes protéines de réserve. Cette étude est partie du constat que la majorité des connaissances dans ce domaine provient d'approches ciblées chez Arabidopsis (Santos-Mendoza et al., 2008). Les rares gènes décrits chez les légumineuses codent des récepteurs d'adressage vacuolaire et des protéases impliquées dans la maturation des protéines de réserve (Jung et al., 1998; Paris et Neuhaus, 2002 ; Robinson et al., 2005). La composition protéique des graines de 175 accessions de *M. truncatula* a été évaluée par électrophorèse mono- et bi-dimensionnelle et les données quantitatives obtenues pour chaque polypeptide ont été mises en relation avec la variabilité allélique à l'échelle du génome de ces 175 écotypes (Branca et al., 2011 ; Stanton-Geddes et al., 2013). Ce travail a permis d'établir une liste de gènes intervenant au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel dans le contrôle de la composition protéique des graines (Le Signor et al., 2017). Ces gènes, dont plusieurs sont présentés ci-après, participent aux différentes étapes de la synthèse, du transport et de la maturation des protéines de réserve depuis le noyau jusqu'aux vésicules de stockage.

3.2.1 Synthèse des globulines et modifications post-traductionnelles

Quatorze facteurs de transcription susceptibles de contrôler l'accumulation des globulines ont été identifiés par GWAS chez *M. truncatula* et un réseau de régulation a été développé à partir des données d'expression disponibles pour ces gènes (Le Signor et al., 2017). Les études de co-expression entre ces gènes et ceux codant les globulines suggèrent un rôle de plusieurs de ces gènes dans l'activation (ex. MYB#2, Growth Regulating Factor 5, ABI5 et FUSCA3) ou la répression (ex. WRKY, basic helix-loop-helix, HDG2) de la synthèse des globulines. Il est à noter que l'expression du gène *MYB#2* identifié est directement corrélée à l'expression de deux gènes de vicilines, suggérant que ce facteur de transcription agit de concert avec ABI5 pour réguler l'accumulation des vicilines. Au contraire, l'expression du gène *WRKY* est négativement corrélée à l'expression des vicilines et d'*ABI5*, suggérant que la synthèse des vicilines *via* ABI5 est régulée par un rétrocontrôle négatif impliquant ce facteur de transcription WRKY. Un gène codant un autre facteur de transcription, JUMONJI, a été identifié par GWAS. Chez Arabidopsis, JUMONJI est impliqué dans le remodelage de la chromatine en relation avec la floraison chez Arabidopsis (Noh et al., 2004). Le rôle du remodelage de la chromatine dans le remplissage des graines a récemment émergé avec l'identification du facteur de remodelage de la chromatine CHD1 (chromodomain, hélicase/ATPase et domaine de liaison à l'ADN 1) qui active l'expression des régulateurs maîtres du développement embryonnaire, y compris FUSCA3 (Shen et al., 2015). La découverte de huit variants alléliques pour le gène *JUMONJI*, y compris un faux-sens (Ala153Thr), tous liés à des variations d'accumulation de légumines majeures, et la forte expression de ce gène pendant le remplissage des graines, suggèrent qu'il pourrait être impliqué dans la régulation épigénétique de l'accumulation des globulines 11S.

Cette étude a également révélé 111 gènes susceptibles de moduler les modifications post-traductionnelles (ex. glycosylation, phosphorylation) qui pourraient se produire au niveau des globulines et influencer leurs propriétés fonctionnelles (Casanova et al., 2008) ou réguler les processus conduisant à leur accumulation. Une protéine kinase fortement exprimée lors du remplissage des graines a été identifiée. Sa séquence est très proche de la protéine BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2) décrite chez Arabidopsis comme phosphorylant et stabilisant ABI5 lors de la germination des graines (Hu and Yu 2014). En supposant une homologie fonctionnelle entre la kinase identifiée chez *M. truncatula* et BIN2, il serait intéressant d'étudier son rôle possible dans la régulation d'ABI5 lors de la synthèse des globulines 7S.

3.2.2 Activités protéolytiques

Une liste de 77 gènes révélés par GWAS chez *M. truncatula*, dont la classification fonctionnelle suggère un rôle dans la maturation ou le transport des protéines, a été établie (Le Signor et al., 2017). Une analyse systématique de leurs séquences (domaines et homologies) et profils d'expression au cours du développement de la graine a permis de mieux situer le rôle de 38 gène, dont 10 codent des protéases (Tableau 1). Les données d'expression disponibles (https://mtgea.noble.org/v3/) indiquent que les gènes codant ces protéases s'expriment pendant le remplissage ou la maturation des graines. La plupart interviendraient dans le contrôle de la quantité de légumines et trois protéases contrôleraient également la quantité de convicilines. De façon intéressante, cinq gènes présentés dans le tableau 1 sont proches des gènes de structure des légumines (chromosome 1, 30 Mb) et convicilines (chromosome 1, 45 Mb). Autre fait intéressant, quatre gènes co-localisent avec des PQL de formes protéolysées des légumines sur les groupes de liaison 1 et 2. Ils codent des carboxypeptidases susceptibles d'hydrolyser de manière ménagée les légumines en C-terminal, un processus de prédigestion bien décrit chez Arabidopsis (Higashi et al., 2006) et susceptible de rendre les chaines des globulines plus accessible aux attaques protéolytiques lors des étapes ultérieures de germination.

Un gène nommé ici *Mtβ-VPE* par homologie avec le gène AT1G62710, codant une β-VPE (béta-Vacuolar Processing Enzyme) impliquée dans la maturation des légumines chez Arabidopsis, a aussi été révélé par GWAS (Tableau 1). Chez Arabidopsis, cette β-VPE clive les légumines spécifiquement

après l'asparagine (liaison peptide Asn-Gly) pour libérer les chaînes alpha et béta et permettre ainsi la formation d'hexamères (Gruis et al., 2004). De façon similaire à la *β-VPE* d'Arabidopsis, *Mtβ-VPE* possède un profil d'expression lors du développement de la graine calqué sur celui des protéines de réserve et la plus forte abondance de transcrits est trouvée dans la graine. Les mutants *β-vpe* d'Arabidopsis montrent une accumulation des précurseurs des protéines de réserve mais aussi d'autres polypeptides non présents dans les graines matures du génotype sauvage. Ces résultats indiquent l'émergence d'évènements de protéolyses alternatives chez ces mutants aboutissant à l'obtention de nouveaux profils protéiques. Un orthologue a été identifié dans les bases de données du pois (Alves-Carvalho et al., 2015 ; Tayeh et al., 2015a) pour quatre des gènes présentés dans le tableau 1, dont *Mtβ-VPE*. L'obtention de variants alléliques de ces gènes chez le pois permettrait de faire varier la composition protéique de la graine et d'en analyser les conséquences sur la qualité nutritionnelle.

Tableau 1 : Liste de gènes révélés par GWAS chez *M. truncatula* codant des protéases susceptibles de participer à la maturation des protéines de réserve (données extraites de Le Signor et al., 2017). La position en Mb sur les chromosomes (CHR) est indiquée. L'identité des polypeptides révélés en gels d'électrophorèse mono-dimensionnelle (1D) et/ou bi-dimensionnelle (2D) ayant permis d'identifier les gènes causaux est indiquée (Leg, légumines, Conc, convicilines). Un numéro d'accession sur puce affymetrix (Affy_id) est disponible pour 6 gènes (Benedito et al., 2008). Le code couleur reflète le profil d'expression du gène lors du développement de la graine, de 10 à 36 jours après pollinisation (rouge/noir, forte expression ; blanc, faible expression). *, indique qu'un orthologue a été identifié chez le pois (Alves-Carvalho et al., 2015; Tayeh et al., 2015a).

ID	annot	CHR	Mb	2D	1D	Affy_id	Expression relative lors du développement de la graine (jours après pollinisation)					
							10	12	16	20	24	36
Medtr1g051175	serine carboxypeptidase-like protein	1	20		Leg							
Medtr1g069870	peptidase S24/S26A/S26B/S26C family	1	30,5	Leg								
Medtr1g069890	peptidase S24/S26A/S26B/S26C family	1	30,5	Leg	Leg							
Medtr1g073130*	carboxy-terminal processing peptidase-like	1	32,4	Leg	Leg+Conv	Mtr.50308.1.S1_at						
Medtr1g100980*	signal peptide peptidase-like protein	1	45,3	Leg	Conv	Mtr.37941.1.S1_s_at						
Medtr1g101030*	tripeptidyl peptidase II	1	45,4	Leg	Conv	Mtr.22279.1.S1_at						
Medtr2g449850	serine carboxypeptidase-like protein	2	22		Leg							
Medtr2g081620	serine carboxypeptidase-like protein	2	34,2	Leg		Mtr.16862.1.S1_at						
Medtr4g101730*	vacuolar processing enzyme	4	42	Leg		Mtr.19934.1.S1_at						
Medtr4g130550	S49 protease IV family peptidase	4	54,4	Leg		Mtr.26059.1.S1_s_at						

Conclusions

La variabilité existante pour la composition des graines entre espèces légumineuses ou variétés au sein d'une même espèce est suffisante pour permettre un large éventail d'applications, mais quel que soit l'espèce, il convient d'optimiser et de stabiliser la qualité des produits. La teneur en protéines et l'équilibre en acides aminés sont deux critères importants en nutrition humaine et animale. Les gènes candidats pour la composition protéique des graines, récemment identifiés en combinant des approches génétiques et moléculaires, offrent des perspectives directes de modification des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines, et d'étude de l'impact sur la digestibilité et les risques d'allergénicité. Nous avons observé que pour 80% des gènes candidats identifiés chez *M. truncatula*, il existe une séquence orthologue chez le pois (Le Signor et al., 2017), rendant possible la recherche de variants alléliques pour ces gènes chez cette espèce d'intérêt agronomique. Les multiples données

génomiques et post-génomiques en cours d'obtention chez d'autres espèces légumineuses comme la féverole (projet Investissement d'Avenir PeaMust) sont un tremplin vers le transfert d'informations multi-espèces. Des collections d'écotypes sont disponibles chez le pois, la féverole et les lupins (CRB protéagineux Dijon (Burstin et al., 2015) pour rechercher des variants alléliques de ces gènes. Par ailleurs, une variabilité génétique a été induite chez le pois par mutagenèse chimique qui ouvre des perspectives directes d'étude, dans un même génotype, de la valeur nutritionnelle de graines modifiées dans leur composition protéique (Dalmais et al., 2008). La méthode de criblage nommée TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes, (McCallum et al., 2000) permet d'identifier rapidement les plantes porteuses de mutations ponctuelles dans les gènes d'intérêt. Des rétrocroisements successifs des lignées TILLING avec le génotype sauvage sont ensuite nécessaires. Ils permettent d'éliminer les mutations résiduelles en vue de sélectionner les allèles favorables à combiner dans un même génotype pour améliorer les matières premières en fonction des différents usages alimentaires. Une autre approche intéressante permettant de modifier plusieurs gènes de façon simultanée est la technique CRISPR/Cpf1 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats from *Prevoltella* and *Francisella*) d'édition des gènes, récemment appliquée chez le soja (Kim et al., 2017).

Références bibliographiques

Abi-Ghanem R., Bodah E.T., Wood M., Braunwart K., 2013. Potential Breeding for High Nitrogen Fixation in *Pisum sativum* L.: Germplasm Phenotypic Characterization and Genetic Investigation. American Journal of Plant Sciences 04, 1597.

Allen J.W., Shachar-Hill Y., 2009. Sulfur transfer through an arbuscular mycorrhiza. Plant Physiology 149, 549–560.

Altenbach S.B., Pearson K.W., Meeker G., Staraci L.C., Sun S.M., 1989. Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. Plant Molecular Biology 13, 513–522.

Alves-Carvalho S., Aubert G., Carrère S., Cruaud C., Brochot A.-L., Jacquin F., Klein A., Martin C., Boucherot K., Kreplak J., da Silva C., Moreau S., Gamas P., Wincker P., Gouzy J., Burstin J., 2015. Full-length *de novo* assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. The Plant Journal 84, 1–19.

Benedito V.A., Torres-Jerez I., Murray J.D., Andriankaja A., Allen S., Kakar K., Wandrey M., Verdier J., Zuber H., Ott T., Moreau S., Niebel A., Frickey T., Weiller G., He J., Dai X., Zhao P.X., Tang Y., Udvardi M.K., 2008. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. The Plant Journal 55, 504–513.

Bordat A., Savois V., Nicolas M., Salse J., Chauveau A., Bourgeois M., Potier J., Houtin H., Rond C., Murat F., Marget P., Aubert G., Burstin J., 2011. Translational Genomics in Legumes Allowed Placing *In Silico* 5460 Unigenes on the Pea Functional Map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. G3 (Bethesda, Md.) 1, 93–103.

Bourgeois M., Jacquin F., Cassecuelle F., Savois V., Belghazi M., Aubert G., Quillien L., Huart M., Marget P., Burstin J., 2011. A PQL (protein quantity loci) analysis of mature pea seed proteins identifies loci determining seed protein composition. Proteomics 11, 1581–1594.

Bourgeois M., Jacquin F., Savois V., Sommerer N., Labas V., Henry C., Burstin J., 2009. Dissecting the proteome of pea mature seeds reveals the phenotypic plasticity of seed protein composition. Proteomics 9, 254–271.

Bourion V., Rizvi S.M.H., Fournier S., Larambergue H. de, Galmiche F., Marget P., Duc G., Burstin J., 2010. Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach of root, nodule, and shoot variability. Theoretical and Applied Genetics. 121, 71–86.

Branca A., Paape T.D., Zhou P., Briskine R., Farmer A.D., Mudge J., Bharti A.K., Woodward J.E., May G.D., Gentzbittel L., Ben C., Denny R., Sadowsky M.J., Ronfort J., Bataillon T., Young N.D., Tiffin P., 2011. Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model legume *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, E864-870.

Burstin J., Gallardo K., Mir R.R., Varshney R.K., Duc G., 2011. Improving protein content and nutrition quality. In: Pratap A. & Kumar J. (eds.), Biology and Breeding of Food Legumes, CAB International, Wallingford, UK, pp. 314–328.

Burstin J., Salloignon P., Chabert-Martinello M., Magnin-Robert J.-B., Siol M., Jacquin F., Chauveau A., Pont C., Aubert G., Delaitre C., Truntzer C., Duc G., 2015. Genetic diversity and trait genomic prediction in a pea diversity panel. BMC genomics 16, 105.

Casanova F., Nakamura A., Masuda H., Lima L., Fialho E., 2008. Functionality of phosphorylated vicilin exposed to chemical and physical agents. Food Chemistry 107, 1138–1143.

Casieri L., Gallardo K., Wipf D., 2012. Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulphate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. Planta 235, 1431–1447.

Chandler P.M., Higgins T.J., Randall P.J., Spencer D., 1983. Regulation of Legumin Levels in Developing Pea Seeds under Conditions of Sulfur Deficiency: Rates of Legumin Synthesis and Levels of Legumin mRNA. Plant Physiology 71, 47–54.

Chandler P.M., Spencer D., Randall P.J., Higgins T.J., 1984. Influence of Sulfur Nutrition on Developmental Patterns of Some Major Pea Seed Proteins and Their mRNAs. Plant Physiology 75, 651–657.

Clemente A., Arques M.C., Dalmais M., Signor C.L., Chinoy C., Olias R., Rayner T., Isaac P.G., Lawson D.M., Bendahmane A., Domoney C., 2015. Eliminating Anti-Nutritional Plant Food Proteins: The Case of Seed Protease Inhibitors in Pea. PLOS ONE 10, e0134634.

Cohen H., Israeli H., Matityahu I., Amir R., 2014. Seed-specific expression of a feedback-insensitive form of CYSTATHIONINE-γ-SYNTHASE in Arabidopsis stimulates metabolic and transcriptomic responses associated with desiccation stress. Plant Physiology 166, 1575–1592.

Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Moussy F., Burstin J., Savois V., Aubert G., Brunaud V., Oliveira Y. de, Guichard C., Thompson R., Bendahmane A., 2008. UTILLdb, a *Pisum sativum in silico* forward and reverse genetics tool. Genome Biology 9, R43.

Damerval C., Maurice A., Josse J.M., Vienne D. de., 1994. Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. Genetics 137, 289–301.

Duc G., Page D., Sagan M., Viroben G., Gueguen J., 1997. Effect of nitrogen nutrition pathways on the quality of nitrogen storage compounds in legumes. In: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 275–278.

Gallardo K., Firnhaber C., Zuber H., Héricher D., Belghazi M., Henry C., Küster H., Thompson R., 2007. A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds, evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues. Molecular & Cellular Proteomics 6, 2165–2179.

Gruis D., Schulze J., Jung R., 2004. Storage protein accumulation in the absence of the vacuolar processing enzyme family of cysteine proteases. The Plant Cell 16, 270–290.

Gueguen J., Lemarié J., 1996. Composition, structure et propriétés physicochimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In: Protéines végétales, B. Godon, pp. 80–119.

Hacham Y., Song L., Schuster G., Amir R., 2007. Lysine enhances methionine content by modulating the expression of *S*-adenosylmethionine synthase. The Plant Journal 51, 850–861.

Higashi Y., Hirai M.Y., Fujiwara T., Naito S., Noji M., Saito K., 2006. Proteomic and transcriptomic analysis of Arabidopsis seeds: molecular evidence for successive processing of seed proteins and its implication in the stress response to sulfur nutrition. The Plant Journal 48, 557–571.

Hu Y., Yu D., 2014. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in Arabidopsis. The Plant Cell 26, 4394–4408.

Inaba Y., Brotherton J.E., Ulanov A., Widholm J.M., 2007. Expression of a feedback insensitive anthranilate synthase gene from tobacco increases free tryptophan in soybean plants. Plant Cell Reports 26, 1763–1771.

Ishimoto M., Rahman S.M., Hanafy M.S., Khalafalla M.M., El-Shemy H.A., Nakamoto Y., Kita Y., Takanashi K., Matsuda F., Murano Y., Funabashi T., Miyagawa H., Wakasa K., 2010. Evaluation of amino acid content and nutritional quality of transgenic soybean seeds with high-level tryptophan accumulation. Molecular Breeding 25, 313–326.

Jander G., Joshi V., 2010. Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants. Molecular Plant 3, 54–65.

Jung R., Scott M.P., Nam Y.W., Beaman T.W., Bassüner R., Saalbach I., Müntz K., Nielsen N.C., 1998. The role of proteolysis in the processing and assembly of 11S seed globulins. The Plant Cell 10, 343–357.

Kim H., Kim S.-T., Ryu J., Kang B.-C., Kim J.-S., Kim S.-G., 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nature Communications 8, 14406.

Kroj T., Savino G., Valon C., Giraudat J., Parcy F., 2003. Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. Development 130, 6065–6073.

Krusell L., Krause K., Ott T., Desbrosses G., Krämer U., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., James E.K., Sandal N., Stougaard J., Kawaguchi M., Miyamoto A., Suganuma N., Udvardi M.K., 2005. The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. The Plant Cell 17, 1625–1636.

Larmure A., Salon C., Munier-Jolain N.G., 2005. How does temperature affect C and N allocation to the seeds during the seed-filling period in pea? Effect on seed nitrogen concentration. Functional Plant Biology 32, 1009–1017.

Le Signor C., Aimé D., Bordat A., Belghazi M., Labas V., Gouzy J., Young N.D., Prosperi J.-M., Leprince O., Thompson R.D., Buitink J., Burstin J., Gallardo K., 2017. Genome-wide association studies with proteomics data reveal genes important for synthesis, transport and packaging of globulins in legume seeds. The New Phytologist 214, sous presse.

McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S., 2000. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiology 123, 439–442.

Miklas P.N., Kelly J.D., Beebe S.E., Blair M.W., 2006. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. Euphytica 147, 105–131.

Molvig L., Tabe L.M., Eggum B.O., Moore A.E., Craig S., Spencer D., Higgins T.J., 1997. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 8393–8398.

Noh B., Lee S.-H., Kim H.-J., Yi G., Shin E.-A., Lee M., Jung K.-J., Doyle M.R., Amasino R.M., Noh Y.-S., 2004. Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. The Plant Cell 16, 2601–2613.

Osborne T.B., 1924. The vegetable proteins. Longmans, Green and Co., London.

Page D., Duc G., Isabelle L.-H., Domoney C., 2003. Marker-assisted selection of genetic variants for seed trypsin inhibitor content in peas. Pisum Genetics 35, 19–21.

Paris N., Neuhaus J.-M., 2002. BP-80 as a vacuolar sorting receptor. Plant Molecular Biology 50, 903–914.

Robinson D.G., Oliviusson P., Hinz G. 2005. Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. Traffic 6, 615–625.

Santos-Mendoza M., Dubreucq B., Baud S., Parcy F., Caboche M., Lepiniec L., 2008. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. The Plant Journal 54, 608–620.

Satgé C., Moreau S., Sallet E., Lefort G., Auriac M.-C., Remblière C., Cottret L., Gallardo K., Noirot C., Jardinaud M.-F., Gamas P., 2016. Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula*. Nature Plants 2, 16166.

Scherer H.W., Lange A., 1996. N2 fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. Biology and Fertility of Soils 23, 449–453.

Scherer H.W., Pacyna S., Manthey N., Schulz M., 2006. Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influences symbiotic N2 fixation. Plant, Soil and Environment 52, 72–77.

Schiltz S., Munier-Jolain N., Jeudy C., Burstin J., Salon C., 2005. Dynamics of Exogenous Nitrogen Partitioning and Nitrogen Remobilization from Vegetative Organs in Pea Revealed by 15N in Vivo Labeling throughout Seed Filling. Plant Physiology 137, 1463–1473.

Sexton P.J., Shibles R.M., 1999. Activity of ATP sulfurylase in reproductive soybean. Crop science 39, 131–135.

Shen Y., Devic M., Lepiniec L., Zhou D.-X., 2015. Chromodomain, Helicase and DNA-binding CHD1 protein, CHR5, are involved in establishing active chromatin state of seed maturation genes. Plant Biotechnology Journal 13, 811–820.

Stanton-Geddes J., Paape T., Epstein B., Briskine R., Yoder J., Mudge J., Bharti A.K., Farmer A.D., Zhou P., Denny R., May G.D., Erlandson S., Yakub M., Sugawara M., Sadowsky M.J., Young N.D., Tiffin P., 2013. Candidate genes and genetic architecture of symbiotic and agronomic traits revealed by whole-genome, sequence-based association genetics in *Medicago truncatula*. PloS One 8, e65688.

Tabe L.M., Droux M., 2001. Sulfur assimilation in developing lupin cotyledons could contribute significantly to the accumulation of organic sulfur reserves in the seed. Plant Physiology 126, 176-187.

Tabe L.M., Droux M. 2002. Limits to sulfur accumulation in transgenic lupin seeds expressing a foreign sulfur-rich protein. Plant Physiology 128, 1137–1148.

Tabe L., Wirtz M., Molvig L., Droux M., Hell R., 2010. Overexpression of serine acetlytransferase produced large increases in O-acetylserine and free cysteine in developing seeds of a grain legume. Journal of Experimental Botany 61, 721–733.

Tayeh N., Aluome C., Falque M., Jacquin F., Klein A., Chauveau A., Bérard A., Houtin H., Rond C., Kreplak J., Boucherot K., Martin C., Baranger A., Pilet-Nayel M.-L., Warkentin T.D., Brunel D., Marget P., Le Paslier M.-C., Aubert G., Burstin J., 2015a. Development of two major resources for pea genomics: the GenoPea 13.2K SNP Array and a high-density, high-resolution consensus genetic map. The Plant Journal 84, 1257–1273.

Tayeh N., Aubert G., Pilet-Nayel M.-L., Lejeune-Hénaut I., Warkentin T.D., Burstin J., 2015b. Genomic Tools in Pea Breeding Programs: Status and Perspectives. Frontiers in Plant Science 6, 1037.

Thompson R., Burstin J., Gallardo K., 2009. Post-genomics studies of developmental processes in legume seeds. Plant Physiology 151, 1023–1029.

Tian T., Liu Y., Yan H., You Q., Yi X., Du Z., Xu W., Su Z., 2017. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. Nucleic Acids Research. sous presse

Ufaz S., Galili G., 2008. Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities. Plant Physiology 147, 954–961.

Vandecasteele C., Teulat-Merah B., Morère-Le Paven M.-C., Leprince O., Ly Vu B., Viau L., Ledroit L., Pelletier S., Payet N., Satour P., Lebras C., Gallardo K., Huguet T., Limami A.M., Prosperi J.-M., Buitink J., 2011. Quantitative trait loci analysis reveals a correlation between the ratio of sucrose/raffinose family oligosaccharides and seed vigour in *Medicago truncatula*. Plant, Cell and Environment 34, 1473–1487.

Verdier J., Kakar K., Gallardo K., Le Signor C., Aubert G., Schlereth A., Town C.D., Udvardi M.K., Thompson R.D., 2008. Gene expression profiling of *M. truncatula* transcription factors identifies putative regulators of grain legume seed filling. Plant Molecular Biology 67, 567-80.

Wakasa K., Hasegawa H., Nemoto H., Matsuda F., Miyazawa H., Tozawa Y., Morino K., Komatsu A., Yamada T., Terakawa T., Miyagawa H., 2006. High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. Journal of Experimental Botany 57, 3069–3078.

Wang N., Daun J.K. 2004. Effect of variety and crude protein content on nutrients and certain antinutrients in field peas (*Pisum sativum*). Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 1021-1029.

Zhu X., Galili G. 2003. Increased lysine synthesis coupled with a knockout of its catabolism synergistically boosts lysine content and also transregulates the metabolism of other amino acids in Arabidopsis seeds. The Plant Cell 15, 845–853.

Zinsmeister J., Lalanne D., Terrasson E., Chatelain E., Vandecasteele C., Vu B.L., Dubois-Laurent C., Geoffriau E., Signor C.L., Dalmais M., Gutbrod K., Dörmann P., Gallardo K., Bendahmane A., Buitink J., Leprince O., 2016. ABI5 Is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes. The Plant Cell 28, 2735–2754.

Zuber H., Davidian J.-C., Aubert G., Aimé D., Belghazi M., Lugan R., Heintz D., Wirtz M., Hell R., Thompson R., Gallardo K., 2010. The seed composition of Arabidopsis mutants for the group 3 sulfate transporters indicates a role in sulfate translocation within developing seeds. Plant Physiology 154, 913–926.

Zuber H., Poignavent G., Le Signor C., Aimé D., Vieren E., Tadla C., Lugan R., Belghazi M., Labas V., Santoni A.-L., Wipf D., Buitink J., Avice J.-C., Salon C., Gallardo K., 2013. Legume adaptation to sulfur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. The Plant Journal 76, 982–996.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).