

Métabolisme du Glutathion dans le grain de blé tendre / G. Fadel et T. Aussenac. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 3 (2001), pp. 177-186.

Bibliographie. Figures.

I. Blé tendre. II. Glutathion. III. Nutriments — Interaction.

Aussenac, T.

PER L1049 / FA125713P

MÉTABOLISME DU GLUTATHION DANS LE GRAIN DE BLÉ TENDRE

G. FADEL¹ et T. AUSSENAC²

¹ Université Saint Esprit de
Kaslik-Liban, Faculté des Sciences
Agronomiques. B.P. 446 Jounieh-Liban.

² Ecole Supérieure d'Agriculture Purpan,
Laboratoire d'Agrophysiologie Toulouse-France.

E-mail : aussenac@esa-purpan.fr.

RÉSUMÉ

Le blé se caractérise des autres céréales, par sa capacité d'être panifié, grâce à la présence du gluten dans sa farine. De nombreuses études ont montré l'importance des polymères gluténines et surtout la fraction gluténique insoluble (Fi) au Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 2% dans l'acquisition de la valeur boulangère.

Le glutathion est un tripeptide (γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine). Il est le thiol le plus fréquent dans la plante et fait un équilibre d'oxydo-réduction pour protéger les protéines contre l'oxydation irréversible causée par les stress (déshydratation).

Dans le but de mieux comprendre le phénomène de polymérisation des protéines, une méthode d'analyse chromatographique (HPLC) a été utilisée pour doser le glutathion libre réduit (GSH), le glutathion libre oxydé (GSSG) et le glutathion lié aux protéines (GSSP). Cette analyse a été réalisée depuis le stade 8 jours après floraison (JAF) jusqu'au stade 51 jours après floraison sur la variété française « Soissons » de blé tendre, en 1999, dans le laboratoire d'agro-physiologie végétal de l'ESAP-France.

Le rapport GSH/GSSG a diminué clairement durant la phase d'élongation cellulaire (16-30 JAF), ce qui témoigne d'un phénomène d'oxydation. Le glutathion lié aux polymères gluténiques (PSSG) est apparu significativement

au début de la phase de maturation du grain (au-delà de 28 JAF), date d'apparition de la fraction gluténiques insoluble au SDS 2% (Fi). Cette liaison entre les polymères gluténiques et le GSSG s'est traduit par une augmentation du rapport PSSG/GSH total. Les résultats obtenus ont montré l'intervention des thiols dans la polymérisation des gluténines.

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité et jusqu'à nos jours, le blé a occupé la première place mondiale dans l'alimentation grâce à sa haute valeur énergétique (Clavel, 1990) et à ses propriétés panifiables. Ces propriétés sont représentées par la capacité de la farine à donner des pâtes capables de se développer en retenant le gaz carbonique dégagé durant la fermentation pour donner du beau et du bon pain.

Ses valeurs boulangères sont liées à la présence du gluten qui forme durant le pétrissage un réseau viscoélastique unique dans le règne végétal. Le gluten est un composé macromoléculaire complexe formé de 75% de protéines de réserve (gliadines et gluténines), de 5 à 7% de lipides, de 5 à 8 % d'eau (Finney, 1943) et d'amidon qui est peu impliqué dans la qualité boulangère (Eliasson et Tjerneld, 1990). Ce sont les protéines du gluten qui s'associent entre elles et évoluent au cours du pétrissage pour conférer à la pâte ses propriétés technologiques. En effet, dans la littérature, beaucoup des chercheurs ont mis en évidence la relation entre la quantité de polymères protéiques et la qualité technologique (Hubner et Wall, 1976 ; Field *et al.*, 1983 ; Dachkevitch et Autran, 1989 ; Singh *et al.*, 1990 ; Carceller et Aussenac, 1999). La qualité et la quantité des protéines influencent donc la valeur boulangère (Finney et Baramore, 1948 ; Jia, 1995).

La qualité technologique est plus particulièrement en relation avec la quantité des protéines insoluble au SDS 2% (Fi) (Kurowska et Bushuk, 1988 ; Gupta *et al.*, 1993 ; Jia 1995 ; Carceller et Aussenac, 1999).

La qualité boulangère montre parfois une variabilité d'une année sur l'autre et d'une région à l'autre. Ceci rend difficile les transformations automatisées de farine. Ainsi, les variations des conditions climatiques durant la maturation modifient l'accumulation des protéines et leur cinétique d'agrégation (Kasarda, 1989 ; Randall et Moss, 1990). De même, Jia (1995) a montré que la nature du génotype et les facteurs pédoclimatiques agissent sur le mode de polymérisation des gluténines ainsi que sur les propriétés rhéologiques de la farine. Une des

hypothèses qui peut être faite pour expliquer ces variations de polymérisation réside dans le fait que des groupements thiols libres, comme le glutathion présente dans le grain de blé, modifient l'association des polymères protéiques entre eux.

L'objectif de cette étude était de mettre au point un protocole de quantification et de séparation des différentes formes de glutathion (GSH, GSSG et PSSG) dans le grain de blé tendre au cours de son développement et de sa maturation. Ce travail a donné l'occasion de tester à la fois des techniques enzymatiques (glutathion transférase notamment) ainsi que des techniques chromatographiques (HPLC). On se limite au cours de la présente investigation à la description de la technique chromatographique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

La variété de blé utilisée dans cette étude est Soissons (Glu-D1 sous unités 5+ 10). Cette variété a été cultivée à la ferme de l'ESAP Toulouse-France durant l'année 1998. Les échantillons ont été prélevés au hasard sur une parcelle de 900 m². Le premier jour de floraison chaque épi a été bagué et daté. Tous les deux jours, 50 épis ont été récoltés du 8^{ème} jour après floraison jusqu'à la maturité totale (51 jours après floraison). Le poids frais de 50 grains a été mesuré, puis ils ont été séchés à 80°C jusqu'à un poids stable. Le poids sec de 50 grains a été mesuré. La différence entre les deux poids donne la quantité d'eau contenue en mg dans 1000 grains.

Pour le dosage du glutathion, les grains sont lyophilisés et conservés à -20°C et broyés (Broyeur IKA LABORTECHNIK STAUFEN de laboratoire Janke et Kunkel GmbH et CO. kg).

L'appareil chromatographique est du type Thermo Separation Products, muni d'une pompe P 4000, d'un dégazeur SCM 400, d'un passeur automatique d'échantillon AS3000 et d'un détecteur UV 2000.

Le glutathion a été dosé par une méthode chromatographique liquide de haute performance (HPLC) (Schofield et Chen, 1995). Cette méthode, facile et rapide, permet de séparer et de quantifier les différentes formes de glutathion (GSH et GSSG) en une seule étape. Elle est basée sur la formation de dérivé S-

Carboxymethyl à partir des groupements thiols libres par alkylation avec l'acide iodo-acétique suivie d'une dinitrophénylation des fonctions aminées par le 1-Fluoro-2,4 dinitrobenzène (FDNB). Après dérivatisation, les produits sont séparés par une colonne amine (Spherisorb NH de porosité 5 μ m de longueur 250 mm et de diamètre 4.6 mm) et détectés en UV 365 nm (Schofield et Chen 1995 ; Fariss et Reed 1987).

Solvant de l'HPLC

Solvant A : méthanol /eau déminéralisée 4/1 (v/v).

Solvant B : 272g de sodium acétate trihydrate.

122ml d'eau.

378ml d'acide acétique glacial (soit 396,9g).

Un volume de 200ml de cette solution a été diluée dans 800ml de la solution A pour obtenir le solvant B (Schofield et Chen-1995).

Le méthanol est utilisé pour éluer rapidement l'excès de N-2,4 dinitrophenol (DNP) des acides aminés neutres et acides et l'excès de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (Reed *et al.*, 1980). L'acide acétique maintient quant à lui les groupes aminés de la phase stationnaire sous forme positive pour permettre une bonne sélection des dérivés DNP acides en augmentant la concentration du sodium et d'acétate d'ammonium (Reed *et al.*, 1980). Après l'injection de 100 μ l de l'échantillon et pendant 10 minutes, le gradient est de 85% de solvant A et 15% de solvant B. Ensuite, un gradient linéaire est appliqué en faisant varier la proportion du solvant B de 15% à 100% en 15 minutes. Après 3 minutes d'élution avec 100% de solvant B, les conditions initiales sont obtenues en 2 minutes et stabilisées pendant 17 minutes. (Schofield et Chen-1995). Dans ces conditions d'analyse le temps de rétention est de minutes pour le GSH et de minutes pour le GSSG

Méthode d'extraction du glutathion libre dans la farine

Un volume de 2 ml d'acide perchlorique (Chen et Schofield 1995) (Reed *et al.*, 1980) est ajouté à 0,2 g de farine dans un tube de Téflon de 10 ml. L'extraction a duré 1h à 4°C en vortexant toutes les dix minutes. Enfin, les échantillons ont été centrifugés à 26000g, pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contient les formes libres du glutathion (GSH et GSSG) et le culot contient les formes de glutathion liées aux protéines (PSSG).

Méthode d'extraction du glutathion lié aux polymères gluténiques

Le culot, déjà obtenu dans l'extraction précédente est rincé et centrifugé deux fois avec de l'acide perchlorique 5% (v/v) pour le nettoyer de toutes traces de formes libres. L'extraction des polymères gluténiques se fait pendant 1h à température ambiante en ajoutant 4 ml de NaI (0,3M) préparé dans du propanol-1 7,5% (v/v) (Fu et Kovacs 1999) et en vortexant toutes les 10 minutes. Les échantillons sont, ensuite, centrifugés à 15900g pendant 10 minutes à température ambiante.

Le culot obtenu est rincé et centrifugé 2 fois avec la solution d'extraction pour éliminer les traces de monomères. 2 ml de tampon phosphate de sodium (0,1M) pH=7,5 contenant 24 mM du réducteur dithioerytreitol (DTE) sont, ensuite, ajoutés pour extraire le glutathion. L'extraction s'effectue durant 1h à 60°C en vortexant toutes les dix minutes. Les échantillons sont, ensuite, refroidis à 4°C pendant 10 minutes, et 154µl d'acide perchlorique 70% (v/v) (à 4°C) ont été ajoutés pour précipiter les protéines. Enfin les échantillons sont centrifugés à 26000g pendant 15 minutes à 4°C (Schofield et Chen, 1995).

Le surnageant obtenu contient le glutathion qui était lié aux polymères gluténiques (GSSP).

Alkylation et dérivation du glutathion

Un volume de 1 ml de surnageant déjà obtenu est ajouté dans un tube contenant :

0,09g de bicarbonate de sodium, 100µl de 3- [N- morpholino] propanesulfonic acide (MOPS) 0,05M pH 8,5 et 100µl d'acide iodoacétique (IAA) 0,01M.

Les échantillons subissent alors une incubation pendant 1h à 40°C sous agitation à l'obscurité. Puis, 500µl de cet échantillon sont recueillis dans un tube eppendorf et sont ajoutés à 500µl de FDNB 1% (v/v) dans l'éthanol absolu. Les échantillons sont incubés pendant 4h à 40°C à l'obscurité et centrifugés à 7000g à 20°C pendant 10 minutes. Enfin, les échantillons sont filtrés (0,45µm) et injectés en HPLC pour l'analyse qualitative et quantitative.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin de valider la méthode de quantification des formes GSH et GSSG par la technique HPLC, plusieurs gammes d'étalonnage ont été réalisées à partir de mélanges standards préparés en solution avec de l'acide perchlorique.

Quelque soit la forme de glutathion utilisée (forme réduite et/ou oxydée), les réponses obtenues (exprimées en surface de pic chromatographique) sont totalement linéaires et ceci pour une gamme de concentration comprise entre 0 et 5 nmol/ml et 0 et 20 nm/ml de GSSG et GSH respectivement. De plus, les différents coefficients de corrélation (r^2) sont hautement significatifs (probabilité < 0,01). Ces résultats démontrent donc la faisabilité complète de cette technique ainsi que son haut niveau de sensibilité. En tout état de cause, cette méthodologie HPLC répond parfaitement aux objectifs poursuivis.

Accumulation des différentes formes de glutathion

Les résultats ont montré que les formes libres du glutathion subissent, dans le même temps, d'importantes évolutions au cours de toutes les phases de développement du grain. Ainsi, le glutathion réduit (GSH), qui représente la forme majoritaire quelque soit le stade physiologique, voit sa quantité évoluer de 3 nmol/grain à 20 nmol/grain au cours des étapes de remplissage du grain (phases de division d'élongation cellulaire : 0-33 JAF). De la même façon, le glutathion oxydé (GSSG) voit sa quantité évoluer de 0,5 nmol/grain à 5 nmol/grain. Ces évolutions traduisent une très forte accumulation des formes libres du glutathion durant la croissance du grain. Ces observations sont en accord avec le métabolisme de l'azote et du soufre. Contrairement aux formes libres, le glutathion lié aux polymères gluténiques n'apparaît significativement qu'au-delà de la phase d'élongation cellulaire (au-delà de 28 JAF).

La figure 2 montre clairement que le rapport GSH/GSSG évolue beaucoup notamment durant la phase d'élongation cellulaire (16-30 JAF). En effet, quelques

jours après la floraison, le GSH représente la forme majoritaire des formes libres alors qu'au-delà de 16 JAF, sa présence relative diminue au profit de GSSG. Ces résultats témoignent donc d'un phénomène d'oxydation au sein même des cellules de l'albumen du grain au cours de la phase d'élongation cellulaire. N'ayant pas étudié lors de ce travail les différentes activités enzymatiques responsables du métabolisme du glutathion, il est toutefois difficile de statuer sur l'origine précise de ce phénomène : s'agit-il d'une

réduction de l'activité de la glutathion réductase (GR) limitant la conversion enzymatique du GSSG en GSH ou d'une augmentation de l'activité glutathion peroxydase (GP) accélérant la conversion enzymatique du GSH en GSSG ? Une étude métabolique plus fine devrait permettre de répondre ultérieurement à cette question.

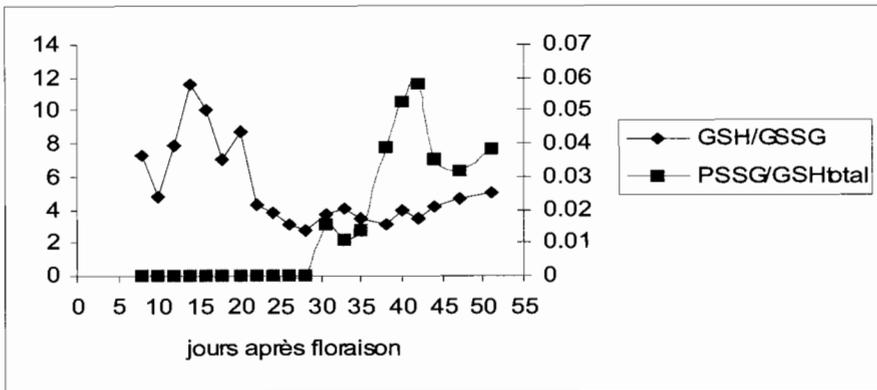


Fig. 2: comparaison entre le rapport GSH/GSSG et le rapport PSSG/GSHtotal. Cette figure montre que l'apparition de PSSG intervient dans le même temps que le rapport GSH/GSSG atteint sa valeur minimale.

La figure 2 présente encore l'évolution du rapport PSSG/glutathion total. Ce rapport permet de suivre l'évolution de la fixation du glutathion aux niveaux des polymères gluténiques à partir du pool de glutathion libre. Une fois de plus, ces résultats démontrent une fixation tardive de glutathion sur les polymères gluténiques du grain au cours de la phase de déshydratation (après 30 JAF). Il est intéressant de remarquer que l'apparition de formes liées de glutathion intervient alors que dans le même temps le rapport GSH/GSSG aux niveaux des formes libres atteint sa valeur minimale (fig.2). Ces observations tendent à confirmer l'hypothèse de la littérature (Kranner and Gill, 1996) selon laquelle au cours d'un phénomène de déshydratation de tissus végétaux le glutathion réduit (GSH) est oxydé enzymatiquement via l'activité glutathion peroxydase (GP) pour donner le glutathion oxydé (GSSG) lequel se fixe aux protéines par réaction d'échange (SH-SS). Dans cette hypothèse, la forme libre oxydée (GSSG) ne représente qu'un intermédiaire métabolique transitoire et donc par conséquent n'est pas accumulé.

CONCLUSION

Ce travail a permis de démontrer l'inadaptation des approches enzymatiques en raison notamment des problèmes liés à l'emploi de solutions acides lors des extractions. A l'inverse, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) a permis d'atteindre une dimension qualitative ainsi que quantitative à partir d'échantillons de blé. Même si, quelques progrès doivent être réalisés afin de réduire notamment la variabilité des résultats obtenus, cette technique a permis d'atteindre l'objectif de départ.

Ainsi, l'étude a mis en évidence plusieurs phénomènes : L'accumulation des formes libres du glutathion (GSH et GSSG) subit de profondes modifications au cours des phases de division et d'élongation cellulaire. Ces modifications se traduisant par la baisse du rapport GSH/GSSG au cours de ces phases de croissance et témoignant d'un phénomène d'oxydation au niveau cellulaire. Au cours de la phase de maturation du grain (déshydratation) un certain nombre de liaisons apparaissent entre les polymères gluténiques et le GSSG accumulé se traduisant par une augmentation du rapport PSSG/GSH total. Enfin, il apparaît que la perte en eau du grain au cours de la phase de maturation initie la formation de ces liaisons polymères-GSSG par réaction d'échange de groupements sulfhydryls.

L'ensemble de ces résultats originaux mènent à penser que le glutathion joue un rôle déterminant pour le contrôle de l'insolubilisation des gluténines du grain. En effet, la fixation de la forme oxydée du glutathion (GSSG) sur les polymères gluténiques en cours de la déshydratation du grain limite théoriquement ce phénomène d'insolubilisation. Or, ce dernier est capital pour l'acquisition de propriétés technologiques de la farine du blé. Même si beaucoup de travaux restent à faire, les résultats qui ont été acquis au cours de ces diverses expériences permettent d'ores et déjà de confirmer que le glutathion intervient dans la polymérisation gluténique.

BIBLIOGRAPHIE

- CARCELLER J. L., AUSSENAC T., 1999. Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in the developing of hexaploid wheats : role of the desiccation phase. *Aus. J. Plant Physiol.*, 26 : 301-310.
- CLAVEL R., 1969. Le pain et la panification. Deuxième édition, France. 125 p.
- DACHKEVITCH T., AUTRAN J. C., 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size- exclusion high performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, 66: 448-456.
- ELIASSON A. C., TJERNELD E., 1990. Adsorption of wheat protein on Wheat starch granules. *Cereal Chem.*, 67 : 366- 372.
- FARISS M.W., REED D. J., 1987. High performance liquid chromatography of thiols and disulfides : Dinitrophenol Derivatives. *Methods Enzymol.*, 143 : 101-109.
- FIELD J. M., SHEWRY P. R., MIFLIN B. J., 1983. Solubilisation and characterisation of wheat gluten proteins : correlations between the amount of aggregated proteins and baking quality. *J. Sci. Food Agri.*, 34 : 370-377.
- FINNEY K. F., 1943. Fractionating and reconstituting techniques as tools in wheat flour research., *Cereal Foods World*, 30 : 794-801.
- FINNEY K. F., BARMORE M. A., 1948. Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chem.*, 25: 291-295.
- FU B. X., KOVACS N. I. P., 1999. Rapid single- step procedure for isolating total glutenin proteins of wheat flours. *J. Cereal Sci.*, 29 : 113-116.
- GUPTA R. B., KHAN K., MacRITCHIE F., 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats.I. Effects of variation in the quality and size distribution of polymeric protein. *J. Cereal Sci.*, 18 : 23-41.
- HUEBNER F. R. et WALL J. S., 1976. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality. *Cereal Chem.*, 53 : 258-269.
- JIA Y. Q., 1995. Mise en évidence d'une polymérisation différentielle des protéines de réserve chez Soissons, variété de blé tendre (*Aestivum triticum L.*) : approches agronomique, technologique et biochimique. Thèse de doctorat. Toulouse. 115 p.

- KRANNER I., GILL D., 1996. Significance of thiol-disulfide exchange in resting stages of plant development. *Bot. Acta.*, 109 : 8-14
- KASARDA D. D., 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In *Wheat is unique*. Y. POMERANZ, ed. American Association of Cereal Chemist. St Paul, Minnesota, USA, 277-302.
- KUROWSKA E., BUSHUK W., 1988. Solubility of flour and gluten protein in a solvent of acetic acid, urea, and cetyltrimethylammonium bromide, and its relationship to dough strength. *Cereal Chem.*, 65 : 156-158.
- RANDALL P. J. MOSS H. J., 1990. some effects of temperature regime during grain filling on wheat quality. *Aust. J. Agric. Res.*, 41 : 603-617.
- REED D. J., BABSON J. R., BEATTY P. W., BRODIE A. E., ELLIS W. W., POTTER D. W., 1980. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.*, 106 : 55-62.
- SCHOFIELD J. D., CHEN X., 1995. Analysis of free reduced and free oxidised glutathione in wheat flour. *J. Cereal Sci.*, 21 : 127-136.
- SINGH N. K., DONOVAN R. and MacRITCHIE F., 1990. Use of sonication and size- exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. Tome II. Relative quantity of glutenin as a measure of breadmaking quality. *Cereal Chem.*, 67 : 161-170.