L'UTILISATION DE L'ELECTROPHORESE ET DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PRESSION DANS L'IDENTIFICATION DES VARIETES DE BLE

M. BAKHELLA*
G.L. LOOKHART**
R.C. HOSENEY***

INTRODUCTION

Au sein d'une espèce céréalière donnée, il importe de déterminer ou vérifier l'identité des différents cultivars. Pour le blé, ce besoins se fait sentir à tous les niveaux de production et d'utilisation des grains. Ceci vient du fait que les cultivars de blé différent considérablement les uns des autres quant à leurs caractéristiques agronomiques et technologiques. Actuellement, le blé est la céréale la plus étudiée, et ce pour plusieurs raisons :

1 - Le blé vient au premier rang des plantes cultivées par l'homme (Bushuk, 1986).

---

* Maître de conférence à l'Institut Agronomique et Vétérinaire HASSAN II, B.P. 6202, Rabat, Maroc.
** Chercheur chimiste, USDA-ARS, Grain Marketing Research Laboratory, Manhattan, KS 66502.
*** Professeur, Kansas State University, Department of Grain Science and Industry, Manhattan, KS 66506.

2 - Il existe, dans le marché international, certaines variétés à haut rendement mais qui sont indésirables à cause de leurs qualités boulangères insuffisantes.

3 - Les meuniers et les boulangers deviennent de plus en plus sensibles à l'importance du facteur variétal car celui-ci affecte significativement la qualité du blé transformé.

4 - Dans certains pays, les prix payés pour acquérir du blé varient à cause des différences qualitatives entre variétés.

Par conséquent, des méthodes efficaces d'identification des variétés de blé sont très demandées. De telles méthodes doivent être rapides, sélectives, sensibles, indépendantes des facteurs environnementaux, et sans équivoque. Plusieurs observations morphologiques ont été utilisées pour distinguer entre les variétés de blé. Le problème majeur de ces méthodes est leur non spécificité et l'importance de la durée requise pour leur exécution.

Certaines de ces observations ne peuvent se faire que si la plante atteint un certain niveau de développement comme c'est le cas pour la coloration du coléoptile en lumière artificielle (Autran, 1973). De plus, on doit parfois essayer de reconnaître les variétés en ne disposant que de grains. A cet égard, certains tests chimiques rapides ont été mis au point pour écourter le temps de réponse. Ils incluent le test à l'acide phénique (Autran, 1973; Beaux, 1975), l'essai à l'hydroxyde de sodium (Wrigley et al., 1982), et le test au papier imprégné de catéchol ou catéchine (Wrigley, 1976).

Bien que ces différents tests chimiques et examens morphologiques, mis ensemble, donnent des renseignements intéressants, ils présentent néanmoins plusieurs inconvénients. Ils sont soit lents et laborieux, ou non spécifiques et dépendant des conditions environnementales, ou alors présentent tous ces inconvénients à la fois. Les méthodes basées sur l'électrophorèse et la chromatographie liquide à haute pression des protéines de réserve ont été récemment utilisées avec grand succès (Wrigley et al., 1982; Bietz & Cobb, 1985). Leur très haut pouvoir de résolution fait qu'elles permettent aisément d'identifier un grand nombre de variétés de blé. Ceci vient aussi du fait que les

protéines séparées par ces techniques sont synthétisées sous le contrôle direct du génome variétal. Ces techniques ont également l'avantage d'être rapides, sensibles, requièrent des quantités d'échantillon très faibles, et leurs résultats ne sont pas affectés par les conditions environnementales de culture du blé.

Les protéines solubles dans l'eau et dans les solutions salines (nommées albumines et globulines respectivement) ne sont pas spécifiques et efficaces pour l'identification variétale (Wrigley et al., 1982). Les protéines de réserve, par contre, conviennent mieux à cause de leur polymorphisme génétique très élevé résultant en un nombre important de polypeptides séparables par les méthodes électrophorétiques et chromatographiques. Ces dernières incluent les gliadines (prolamines du blé) solubilisées par des solutions alcooliques et les gluténines (glutélines du blé) solubilisées par des solutions diluées d'acides ou d'alcalis. La synthèse des gliadines est sous le contrôle de gènes situés sur les bras courts des chromosones 1A, 1B, 1D, et 6A, 6B, et 6D (Wrigley, 1970; Brown & Flavel, 1982 ; Novoselskaya et al., 1983). Les gluténines quant à elles se synthétisent sous le contrôle des gènes localisés sur les bras longs des chromosomes 1A, 1B, et 1D (Payne et al., 1980). En utilisant l'électrophorèse à deux dimensions appliquée aux protéines totales de l'endosperme, Brown et al. (1981) ont rapporté que tous les polypeptides dont le poids moléculaire est situé entre 55.000 et 140.000 daltons sont synthétisés sous le contrôle des chromosomes 1A, 1B, et 1D, alors que ceux dont le poids moléculaire est compris entre 30.000 et 45.000 daltons sont codés par les chromosomes 1A, 1B, ET 1D, alors que ceux dont le poids moléculaire est compris entre 30.000 et 45.000 daltons sont codés par les chromosomes 6A, 6B, et 6D. Les différentes sous-unités protéiques codées par chromosomes homologues peuvent, d'une variété de blé à l'autre, différer entre elles par leur point iso-électrique et/ou leur poids moléculaire. Ce contrôle multigénique des protéines de réserve explique leur très haute hétérogénéité qui les rend tout à fait convenables pour l'identification d'un nombre maximum de variétés. D'autres classes protéiques (iso-enzymes, protéines de feuillage,...) se sont révélées utiles, mais leur polymorphisme est nettement moins important.

Les méthodes électrophorétiques exploitent un champ électrique pour séparer les protéines à travers un gel de porosité contrôlable, selon leur taille apparente,

Tableau I : **Comparaison des gels d'acrylamide et d'amidon pour l'électrophorèse des gliadines de blé**

Gel d'acrylamide	Gel d'amidon
Coulage et manipulation aisés	Coulage difficile
Manipulation courte	Manipulation longue
Facile de préparer des gels à consistance uniforme et reproductible. Produit commercial de qualité quasi-uniforme	Difficile d'avoir des gels de consistance uniforme et reproductible. Produit commercial de qualité variable
Toxique avant polymérisation	Support non toxique
Détection facile de bandes	Détection moins aisée
Insensible aux enzymes	Hydrolysable par les amylases
Coloration du gel facile	Coloration moins aisée
Précourant facultatif	Précourant nécessaire
Densitométrie facile	Densitométrie douteuse
Bonne résolution pour toutes les classes de gliadines	Résolution moyenne, mais très bonne pour les w-gliadines
Extraits protéiques très concentrés non indispensables	Extraits très concentrés indispensables
Coloration moyennement stable	Coloration stable
Pouvoir de différenciation des cultivars très élevé.	Pouvoir de différenciation moins élevé

leur charge, ou leurs points iso-éléctriques. Bien que le gel d'amidon fût le premier support utilisé, il semble n'être pratiquement plus exploité à cet égard. Il est remplacé pour bon nombre de raisons, indiquées au Tableau 1, par l'acrylamide. Le gel d'acrylamide consiste en une polymérisation d'une molécule monomère appelée acrylamide de formule chimique : CH2=CH-CO-NH2, et d'un comonomère jouant le rôle d'agent réticulant et ayant la formule : H2C=CH-CO-NH-CH2-NH-CO-CH=CH2. Cette polymérisation n'est possible que via l'usage d'agents catalyseurs dont la nature varie en fonction des conditions de pH adoptées. Les trois procédures électrophorétiques majeures utilisées dans ce domaine sont énumérées par Lookhart (1980) comme étant :

1 - Celles où l'on utilise un tampon acide pour séparer des protéines extraites sans agents dénaturants ni réducteurs. Dans ce milieu, les protéines solubilisées s'ionisent et restent en solution. Cette méthode est appelée A-PAGE ou lactate-PAGE (A-PAGE : Acid-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) et sépare les protéines selon leurs poids moléculaires apparents et leurs charges. Par conséquent à charges identiques, une protéine de petite taille migre plus vite, qu'une grande molécule. Si ces protéines se trouvent dans un milieu rendant leurs charges plus importantes, ses dernières migreront encore plus vite. C'est la technique la plus utilisée pour identifier les variétés du blé.

2 - Celles où l'on travaille en présence de Sulfate de Dodécyl de Sodium (SDS) pour solubiliser les protéines et les entourer d'une manière uniforme par des charges négatives. Cette méthode s'appelle SDS-PAGE et sépare les protéines sur la base de leurs poids moléculaires. La charge des protéines n'intervient pas puisqu'elle est masquée par la charge négative des molécules de SDS. Cette technique est utilisée pour l'identification variétale, la prédiction de la qualité technologique des variétés, et la détermination des poids moléculaires.

3 - La troisième technique dénomée Iso-Focalisation (IEF : Iso-Electric Focusing) exploite un gradient de pH pour faire migrer les polypeptides vers des points iso-potentiels correspondant à leurs points iso-électriques. C'est une méthode très sensible et de haute résolution. Elle est généralement utilisée quand les autres techniques s'avèrent inefficaces pour départager des variétés données.

C'est une technique surtout utilisée pour séparer les protéines de maïs. Elle implique l'utilisation des ampholines pour réaliser les gradients de pH. Ces produits coûtent très chers et sont difficiles à préparer. La technique est donc onéreuse et n'est utilisée que pour complémenter, en cas de besoin, les deux autres procédures précédemment décrites.

Concernant les techniques chromatographiques, plusieurs procédures, telles que : la filtration sur gel et la chromatographie à échange d'ions, avaient été utilisées pour séparer les protéines de réserve du grain de blé, et les résultats obtenus semblaient dépendre du critère variétal. Actuellement, la technique chromatographique de choix, utilissée pour identifier les cultivars de blé, s'appelle Chromatographie Liquide à haute pression dite en phase inversée (Lookhart & Bietz, 1990) : <RP-HPLC> (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography). Avec cette technique, les protéines sont séparées sur la base des forces hydrophobes entre les acides aminés se trouvant à la surface des polypeptides et les supports chromatographiques apolaires (Bietz, 1985), et ce, à des conditions d'élution bien déterminées. Les supports chromatographiques sont complètement poreux, faits à base de silice, et chimiquement liés à des groupements alkyl. Hearn et al. (1982) ont indiqué qu'en RP-HPLC, plus la polarité de la substance augmente, plus faible sera son interaction avec des extrémités hydrophobes de la phase stationnaire à une composition donnée du solvant d'élution. Par conséquent le poids moléculaire n'est pas un élément déterminant (Hearn et al., 1982; Biertz, 1985). Cependant le degré et l'intensité des interactions hydrophobes entre les molécules et la phase stationnaire jouent un rôle crucial dans le processus de séparation.

PROCEDURE A-PAGE OU LACTATE-PAGE :

La technique A-PAGE des gliadines est extensivement utilisée pour identifier les variétés de blé (Jones et al., 1982; Khan, 1982; Wrigley et al., 1982; Mecham et al., 1985). Les gliadines sont facilement solubilisées par l'éthanol 70% (V/V) (Khan, 1982; Lookhart et al., 1982). Le 2-chloroéthanol 25% (V/V) a été également utilisé avec succès (Autran et al., 1979; Branlard & Dardevet, 1985). Leur extraction ne nécessite pas l'usage d'un agent réducteur, du fait que les

Fig. 1

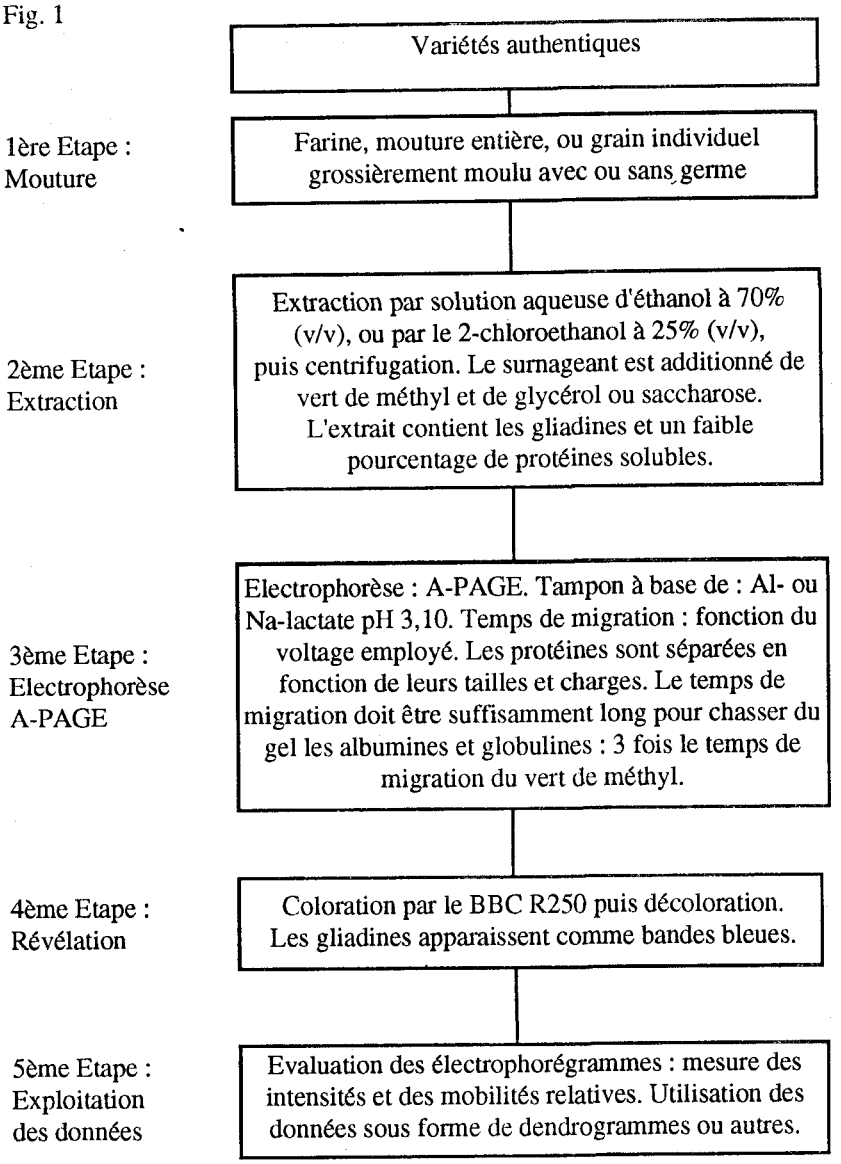

Variétés authentiques
1ère Etape :
Mouture
Farine, mouture entière, ou grain individuel grossièrement moulu avec ou sans germe
2ème Etape :
Extraction
Extraction par solution aqueuse d'éthanol à 70% (v/v), ou par le 2-chloroethanol à 25% (v/v), puis centrifugation. Le surnageant est additionné de vert de méthyl et de glycérol ou saccharose. L'extrait contient les gliadines et un faible pourcentage de protéines solubles.
3ème Etape :
Electrophorèse
A-PAGE
Electrophorèse : A-PAGE. Tampon à base de : Al- ou Na-lactate pH 3,10. Temps de migration : fonction du voltage employé. Les protéines sont séparées en fonction de leurs tailles et charges. Le temps de migration doit être suffisamment long pour chasser du gel les albumines et globulines : 3 fois le temps de migration du vert de méthyl.
4ème Etape :
Révélation
Coloration par le BBC R250 puis décoloration. Les gliadines apparaissent comme bandes bleues.
5ème Etape :
Exploitation
des données
Evaluation des électrophorégrammes : mesure des intensités et des mobilités relatives. Utilisation des données sous forme de dendrogrammes ou autres.

Tableau II : Quelques méthodes électrophorétiques utilisées pour l'identification des variétés de blé

Extraction	Composition du gel et du tampon	Conditions de Travail	Référence
* 60% éthanol * R = Solv./Ech.=3 * 2 hr., Tamb.	* Syst. SGE; 9% amidon * Lac. Al-Urée 0,5M - Ac. Lac., pH = 3,2	* Horizontal * 8 V/cm-4,75 hr. * T = amb.	AUTRAN et BOURDET 1975
* 70% éthanol * R = 3 * 1 hr., Tamb.	*PAGE; 6,3%T - 5%C * 8,5 mM Lac. Al - Ac. Lac. pH = 3,1	*Horizontal * 72/74mA-6,5 hr. * T = 21° C	BUSHUK et ZILLMAN (1978) (1)
* Urée 1 M * R = 6 * 1 hr., Tamb.	* SGE ; 12% amidon, * 17 mM Lac. Al-Urée 2 m-Ac. Lac., pH=3,1	* Horizontal * 200 V-4 hr. * T = 20° C	Du CROS et WRIGLEY (1979) (2)
Idem qu'en (2)	* IEF ; 7,75% T-3,3%C Urée 2M+Ampholines	* Horizontal * 600 v-3,5 hr.	= (2)
Idem qu'en (1)	Idem qu'en (1)	*Vertical * 1000 V-40 min. (gel de 1,5 mm)	TKACHUK et MELLISH (1980)
Idem qu'en (2)	*Gradient-PAGE; 2,5 à 13%T; 0,00425 M NaOH + Ac. Lac., pH = 3,1	* Vertical * 400 Volt-1 hr. * T = 25° C	WRIGLEY et al. (1982)
Idem qu'en (1) sauf R = 2	Idem qu'en (1) mais avec Lac. Na 22,3 mM	* Vertical * 50 mA	KHAN et al (1985)
Idem qu'en (1)	=(1); Lac. Al 8,5 mM / gel; et 4,25mM/tampon	* Vertical /500 v/ 2,25 hr./21° C.	LOOKHART et al. (1986)

ponts disulfures sont essentiellement intra-moléculaires. Les gliadines ont des poids moléculaires allant de 30.000 à plus de 100.000 daltons, et des points iso-électriques fréquemment localisés entre pH5 et pH9 (Shewry & Miflin, 1985). A cause de leurs points iso-électriques, les gliadines requièrent des pH loin des conditions neutres pour être dotées de charges nettes positives (ou négatives) et significatives leur permettant d'être convenablement analysées par PAGE. Le pH 3,10 a été très utilisé dans presque toutes les techniques PAGE et SGE (Starch Gel Electrophoresis : Electrophorèse sur gel d'amidon) décrites dans la littérature. Des pH inférieurs, bien qu'utiles, sont préjudiciables au gel lui-même. Les méthodes courantes de séparation des gliadines par A-PAGE mettent en évidence 20 à 25 bandes différentes (Mecham et al., 1985), alors que l'iso-focalisation en décèle 20 (Wrigley & Sheperd, 1973); ce qui reste, néanmoins, en deçà d'environ 40 constituants clairement révélés par l'électrophorèse à deux simensions (Wrigley, 1970). Les bandes protéiques ainsi séparées différent dans leur intensité, mobilité et nombre. Par conséquent, la probabilité de différenciation entre cultivars de blé sur la base de ces critères, est très élevée. Les différentes étapes analytiques nécessaires pour conduire une analyse PAGE sont dressées dans la Figure 1. Elles comportent une extraction, une séparation par électrophorèse, une visualisation des bandes protéiques par coloration des gels et enfin la mesure des paramètres permettant d'établir les dendrogrammes de différentiation. Plusieurs conditions d'extraction, compositions de gels, systèmes tampons, conditions électrophorétiques, et types d'équipements sont utilisés (Cook, 1984; Lookhart, 1990). Les principales informations à cet égard sont rapportées au Tableau 2. Ajoutant seulement que la coloration et la décoloration des gels d'acrylamide sont souvent réalisés par des solutions dans l'acide trichloracétique du Bleu Brillant de Coumassie (BBC R250) pour la coloration, et sans le colorant pour la décoloration (Bushuk & Zillman, 1978; Autran et al., 1979; Zillman & Bushuk, 1979a ; Tkachuk & Mellish, 1980; Lookhart et al., 1982 ; Wrigley et al., 1982 ; La fiandra & Kasarda, 1985 ; Mexham et al., 1985).

Autran & Bourdet (1975) ont été les premiers à décrire une méthode électrophorétique de référence pour séparer les gliadines et en faire une procédure puissante pour l'identification variétale. Bushuk & Zillman (1978)

mirent au point une méthode sur gel d'acrylamide horizontal. Celle-ci fut remplacée par des séparations avec un équipement vertical mais le cultivar standard (variété Marquis) ainsi que les produits chimiques essentiels utilisés sont maintenus les mêmes. Les proportions relatives des différents produits chimiques ont été légèrement modifiées par plusieurs auteurs dans le but d'améliorer la technique. Lookhart et al. (1982) ont modifié la quantité de fer dans le gel. Khan et al. (1983) avaient changé la profondeur des encoches où l'on dépose les échantillons et avaient recommandé l'usage du lactate de sodium (au lieu du lactate d'aluminium) comme un des constituants du système tampon. Ces auteurs reconnaissent néanmoins que le lactate de sodium donne généralement des gels plus sombres contenant plus de matériaux colorés au point d'origine où le dépôt a été effectué. Cependant, Lookhart et al. (1985) ont été incapables de recommander l'un ou l'autre des deux sels et ajoutent que l'abaissement de la température de 21°C à 7-10°C améliore les résultats obtenus. En quête d'une procédure rapide et économique, Tkachuk & Mellish (1980) ont utilisé des gels très fins (0,75 mm.) et un voltage de migration très élevé (1000 volts). Sous ces conditions, il a été possible d'analyser d'une manière efficace 40 échantillons en 40 minutes. La quantité des catalyseurs utilisés affecte profondément le temps de polymérisation, la taille des micropores, la fermeté et l'adhésivité du gel (Khan et al., 1985). Le Tableau 3 groupe les principales formulations de gels utilisées dans plusieurs laboratoires. Les Figures 2 et 3 montrent des exemples d'électrophorégrammes pour blés tendres et blés durs marocains (Bakhella 1988) obtenus par la méthode de Lookhart et al. (1986). On voit très clairement que les blés durs sont très différents et bien distincts des blés tendres. Les blés tendres possèdent deux ou trois bandes protéiques en plus localisées tout en haut de l'électrophorégramme. Pour distinguer les variétés de blé tendre ou de blé dur entre elles, une méthode d'évaluation des électrophorégrammes est devenue nécessaire.

Une procédure d'évaluation a été décrite par Zillman & Bushuk (1979a), Jones et al. (1982), et Wrigley et al. (1982)`. La méthode consiste en la mesure des mobilités des bandes protéiques au millimètre près. Les mobilités relatives sont alors calculées par rapport à une bande de référence du cultivar Marquis pour laquelle une mobilité relative arbitraire de 50 a été donnée. Les mobilités

Tableau III : **Comparaison des différentes formulations de gels utilisées dans la méthode "Acid-PAGE"**

Constituants du Gel	Références						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Acrylamide (% p/v)	8 et 12,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Bis-Acrylamide (% p/v)	-------	0,30	0,30	0,30	= (2) et (4)	0,30	0,25
Lactate de (% p/v)	-------	Al 0.25	Al 0.25	Al 0.25	Na/Al =(2,4)	Na 0.25	Al 0.25
Acide Lactique	Ajouté jusqu'à pH = 3.1 (sauf pour (1) : 1,45% p/v tris + Urée 3 M + acide citrique jusqu'à pH = 2.9)						
Acide Ascorbique (% p/v)	0,100	0,100	0,020	0,100	0,100	0,024	0,024
H202 à 3 % (% v/v)	0,300	0,500	0,135	0,500	0,250	0,100	0,100
FeSO4,7 H 20 (% p/v)	0,0025	0,0025	0,0025	0,0040	0,0025	0,0002	0,0002
Eau	Tout les produits chimiques sont solubilisés dans un volume d'eau déterminé selon les besoins.						

(1) : Jordan et Raymond (1959) ; (2) : Bushuk et Zillman (1978) ; (3) : Tkachuk et Mellish (1980) ; (4) : Lookhart et al., (1982) ; (5) : Khan et al., (1983); (6) : Khan et al., (1985) ; (7) : Lookhart et al., (1986).

Fig. 2 : Exemples d'électrophorégrammes pour blés tendres et durs marocains.

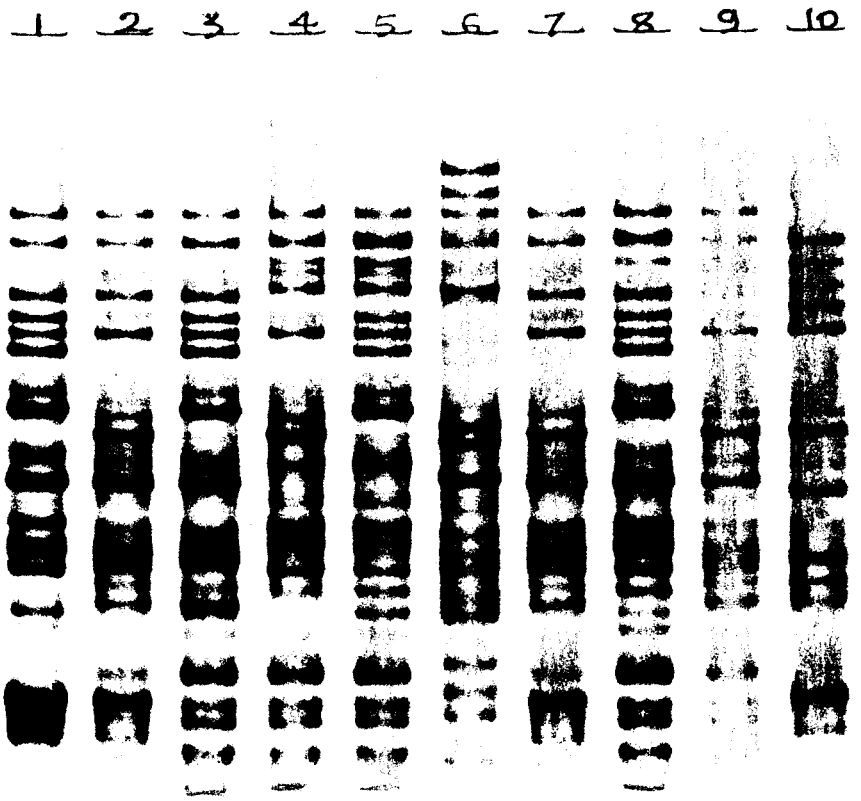
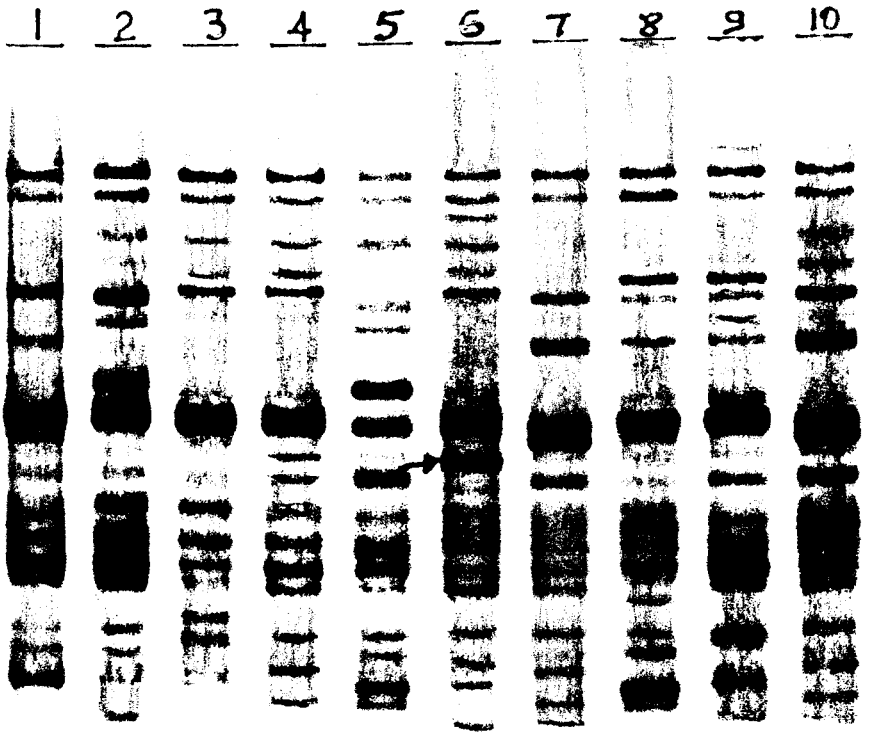


Fig. 3 : Les blés tendres se distinguent des blés durs par 2 ou 3 bandes en plus, localisées en haut de l'électrophorégramme.



relatives sont exprimées à 0,5 unités près. Les intensités sont généralement estimées par des chiffres entiers allant de 1 (bande de faible intensité mais assez visible) à 5 (bande la plus intense). Jones et al. (1982) ont noté que l'évaluation des intensités se fait avec une précision de ± 1 unité. Sur la base de ces calculs d'intensité et de mobilité, des formules variétales peuvent être élaborées et comparées entre elles. Il semblerait que l'évaluation visuelle des intensités des bandes par trois personnes soit beaucoup plus simple et correcte que les mesures densitométriques (Jones et al., 1982). Sapirstein & Bushuk (1985a, b, c) ont constaté que l'utilisation d'une seule bande de référence augmente la variation des mobilités relatives parallèlement à l'augmentation de la distance entre une bande donnée et celle de référence. Ces auteurs suggèrent l'utilisation de trois bandes de références (bandes avec des mobilités relatives de : 24, 50, et 79). Cette méthode améliore la précision des résultats en stabilisant la variabilité des mobilités relatives à des niveaux très bas sur l'ensemble des bandes constituant l'électrophorégramme. Berger et Le Brun (1986) ont également soutenu l'idée d'utiliser plusieurs bandes de référence dans l'évaluation des phérogrammes de gliadines.

Plusieurs auteurs (Lee & Ronalds, 1967; Zillman & Bushuk, 1979b) ont montré que les résultats de l'A-PAGE des gliadines ne sont pas affectés par les conditions environnementales, l'année de récolte, et l'échaudage physiologique et pathologique. La gelée et la germination semblent ne pas avoir d'effects notables sur des électrophorégrammes des gliadines (Lookhart & Finney, 1984). Cependant, Lukow & Bushuk (1984) ont remarqué que l'intensité de certaines bandes de gliadines analysées par SDS-PAGE est affectée par la germination. Enfin signalons que Lookhart & Pomeranz (1985) ont rapporté que les échantillons de blé cultivés sur des sols pauvres en soufre présentaient des différences d'intensités de bandes selon que ces sols aient été fertilisés (par l'azote ou le soufre) ou non. Toutes ces données montrent bien que les électrophorégrammes des gliadines sont essentiellement affectés par les facteurs génétiques, ce qui en fait un outil très précieux dans l'identification variétale des blés.

Il est également nécessaire de noter l'existence de quelques variations mineures entre les électrophorégrammes des grains d'une même variété analysés

individuellement. Ces différences caractérisent ce qu'on appelle les biotypes variétaux. La présence de ces biotypes a été rapportée par plusieurs auteurs (Mecham et al., 1985; Lookhart, 1985; Lookhart et al., 1986). Enfin, bien d'autres méthodes électrophorétiques pour séparer les gliadines existent, mais leur usage ne s'avère important et pratique que dans des cas très particuliers. Parmi ces méthodes, citons l'Iso-focalisation, l'Electrophorèse bidimensionnelle et en gradient de gel (Wrigley, 1970; Wrigley & Shepherd, 1973; Ducros & Wrigley, 1979; Lafiandra & Kasarda, 1975).

PROCEDURE SDS-PAGE

La méthode A-PAGE est conduite dans un milieu tampon à pH unique et bien déterminé (système tampon continu). Dans la méthode SDS-PAGE, plusieurs pH sont exploités (système tampon discontinu) et la présence des charges négatives de SDS annule l'effet de la charge nette des protéines sur leur migration qui n'est plus gouvernée que par le poids moléculaire (Hames & Rickwood, 1981). Les gluténines possèdent des ponts dis - sulfures inter - et intra-moléculaires. Dans leur état natif, elles possèdent des poids moléculaires élevés et ne peuvent être totalement extraites ni séparées par électrophorèse sans réduction et dénaturation préalables. C'est pourquoi le système SDS-PAGE convient parfaitement à leur séparation.

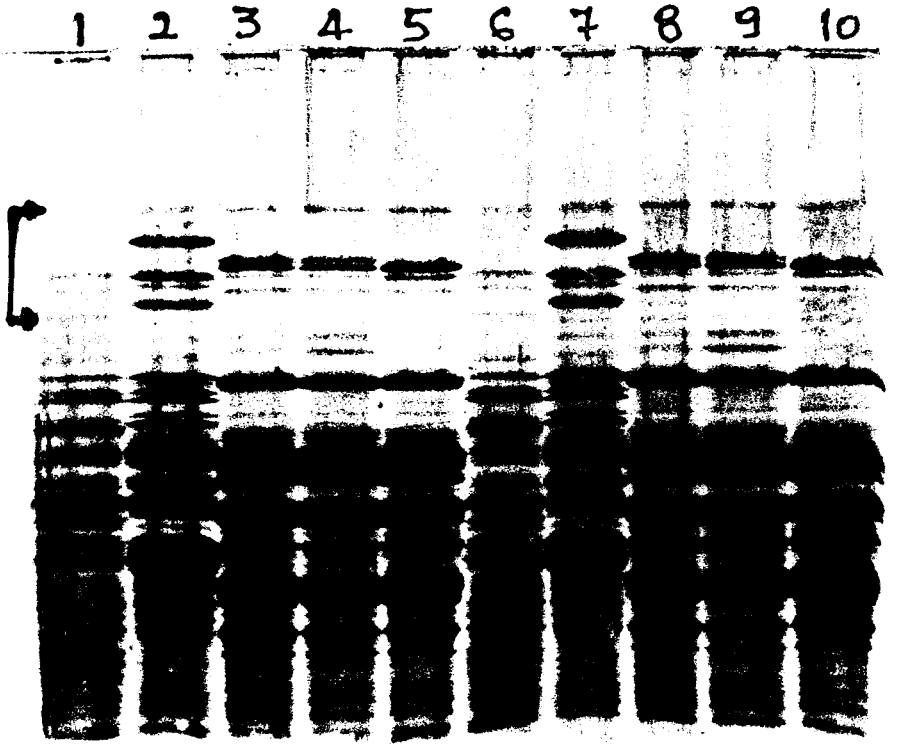
Dans certains cas, la technique A-PAGE ne permet pas toute seule de distinguer entre deux ou plusieurs variétés l'usage d'autres techniques s'impose alors. La technique SDS-PAGE s'est révélée être très utile à cet égard (Wrigley et al., 1982; Autran et al., 1981). En analysant les gluténines à haut poids moléculaire (75.000 daltons et au-dessus), Branlard et Le Blanc (1985) ont trouvé 38 et 9 diagrammes électrophorétiques différents pour respectivement 195 blés tendres et 38 blés durs français. La plupart des procédures électrophorétiques sont dérivées du système discontinu développé par Laemmli (1970). Cooke (1984) précise bien que c'est la région des gluténines à haut poids moléculaire qui est la plus utile à des fins d'identification. La même région est également très importante quant à ses corrélations avec les données qualitatives des variétés. Par conséquent, la combinaison de PAGE et SDS-PAGE est généralement suffisante pour la différentiation de la majorité des cultivars les

uns des autres (Wrigley et al., 1982). La Figure 4 illustre bien le genre de diagramme que l'on obtient par SDS-PAGE ainsi que la région de bandes exploitée à des fins d'identification.

RP-HPLC

Les protéines du blé ont été séparées avec succès par différentes méthodes chromatographiques. La technique récemment introduite est la chromatographie liquide à haute pression nommée RP-HPLC. Avec cette technique, les protéines sont séparées sur la base de l'intensité des liaisons entre les acides aminés hydrophobes et les supports chromatographiques apolaires (Bietz, 1985). Ni la charge des protéines, ni leur poids moléculaire ne semblent jouer un rôle capital dans le processus de séparation. Par contre, l'intensité des interactions hydrophobes entre la phase stationnaire et les polypeptides est d'une importance cruciale à cet égard. Les protéines sont donc éluées dans l'ordre d'hydrophobicité croissante par un mélange de solvants (système gradient) dont l'hydrophobicité augmente avec le temps (Bietz, & Burnouf, 1985; Bietz, 1984). L'optimisation de la composition des solvants d'élution a été réalisée par Bietz (1983) qui a précisé que des mélanges d'eau et d'acétonitrile contenant une petite quantité d'acide trifluoroacétique (TFA) séparent bien les gliadines. Les gluténines (après réduction) et les gliadines sont bien séparées par RP-HPLC (Bietz, 1984). L'hydrophobicité des protéines de réserve n'est pas la même d'un blé à un autre (Chung & Pomeranz, 1979). De plus, Cottenet et al. (1984) ont démontré que certains polypeptides composant les gliadines (gamma-45 et gamma-42) possèdent des hydrophobicités significativement différentes par simple comparaison de leur hydrophobicité théorique. La différence d'hydrophobicité parmi les constituants des gliadines et les agrégats de gluténines a été également démontré par Popineau (1985). Cette technique a été également utilisée pour identifier les gènes responsables de la synthèse des protéines de réserve (Bietz & Burnouf, 1985). Ces mêmes auteurs ont montré que les protéines sont éluées dans l'ordre d'hydrophobicité croissante comme suit : Albumines et Globulines ; Oméga-Gliadines ; Sous-unités Gluténines à haut poids moléculaire ; Alpha-type gliadins ; Sous-unités gluténines à bas poids moléculaire et enfin les gamma-gliadines.

Fig. 4 : Elle illustre le genre de diagramme obtenu par SDS - PAGE.



Bon nombre de rapports, donc, bibliographiques sur les gliadines démontrent l'existence d'une hétérogénéité d'hydrophobicité intra- et inter-polypeptidique. Par conséquent l'RP-HPLC des gliadines fournira des profils d'élution qui différeront d'un génotype à un autre. En effet, Bietz (1984) a bien précisé que l'RP-HPLC peut identifier les variétés de blé par l'utilisation des temps d'élution, hauteurs des pics et leurs surfaces comme paramètres discriminatoires. Cette technique est rapide, sensible reproductible, à haute résolution et automatisable (Bietz et al., 1984a; Lookhart & Bietz, 1990). 30 minutes d'extraction par l'éthanol 70% (v/v) ou le 2-propanol 55% (v/v), est suffisante pour bien extraire les gliadines (Bietz et al., 1984a). La délipidation préalable des farines ou leur extraction par une solution saline n'améliore pas les résultats obtenus. Les colonnes à pores larges (300 A) sont généralement utilisées pour séparer les gliadines et, par détection à 210 nm (détecteur UV), environ 30 à 40 constituants sont séparés (Bietz et al., 1984b). Ces auteurs ont démontré l'existence de différences significatives entre les cultivars de blé, à l'exception de ceux ayant les mêmes pédigrés. Les fractions gliadines séparées par RP-HPLC peuvent contenir plusieurs constituants comme celaz a été démontré par A-PAGE et IEF (Huebner & Bietz, 1984). Des méthodes d'amélioration de la technique peuvent être envisagées par modification du temps global d'analyse, du débit des solvents d'élution, de la température, et par utilisation de standards internes et externes (Bietz & Cobb, 1985). Avec des temps d'analyse courts et des débits élevés de solvants d'élution (gradient rapides), on obtient une pauvre résolution, bien qu'il est toujours possible de différencier les uns des autres la majorité des cultivars analysés, et l'on peut ainsi réaliser 100 analyses par jour et par instrument. Des températures élevées (70°C) améliorent la résolution par, probablement, une meilleure dissociation des constituants protéiques. Les C8-C10 alkylphénones peuvent servir comme standards afin d'éliminer la variabilité inter et intra-laboratoire (Bietz & Cobb, 1985). Ces auteurs ont également suggéré des améliorations en relation avec la méthode d'évaluation de l'hydrophobicité. A cet égard, ils recommandent d'évaluer l'hydrophobicité par rapport à des standards plutôt que par considération des temps d'élution (ou temps de rétention). Il arrive parfois que l'on soit obligé de travailler à haute sensibilité. Ceci entraïne généralement des déplacements anormaux de la ligne de base que l'on évite par diminution de la concentration du TFA (Huebner & Bietz, 1987)/ Toutes ces

améliorations, subtiles certes mais très utiles, permetteront d'avoir une technique automatisable, s'apprêtant à l'informatisation et exempte de toute évaluation subjective. Les figures 5 et 6 montrent deyx chromatogrammes de deux variétés marocaines de blé (Bakhella, 1988).

Contrairement aux analyses électrophorétiques, les procédures d'analyse des gliadines et des gluténines par RP-HPLC ne sont pas très différentes. De plus, à l'instar de PAGE (Autran et al., 1981) des corrélations entre certains composés protéiques spécifiques, appartenant aux gliadines, et des paramètres de qualité ont été mises en évidence (huebner & Bietz, 1987). En plus des performances sus)indiquées, l'RP-HPLC donne des résultatst qui sont insensibles à l'année de récolte, et au lieu de culture (Kruger & Marchylo, 1985). Certains types de sols peuvent avoir des effets sur les chromatogrammes, comme cela a été bien démontré par Lookhart et Pomeranz (1985). Tout ceci fait de cette technique un moyen analytique puissant servant à distinguer les cultivars de blé les uns des autres.

L'électrophorèse et la Chromatographie liquide à haute pression sont donc à l'heure actuelle les meilleures méthodes utilisées dans les domaines de l'identification variétale des blés. Ces techniques ont été considérablement affinés et s'apprêtent encore à d'avantage d'améliorations. Elles sont les seules méthodes capables de départager clairement des cultivars de blé dont la généalogie est de plus en plus complexe et que leurs caractéristiques agronomiques et et technologiques restent très différentes.

Remerciements : Nous tenons à remercier le Dr. Gérard Branlard de l'INRA, France (Clermont Ferrand) pour avoir bien voulu lire ce document et y apporter certaines corrections.

Fig. 5 : Deyx chromatogrammes de la variété de blé NESMA.

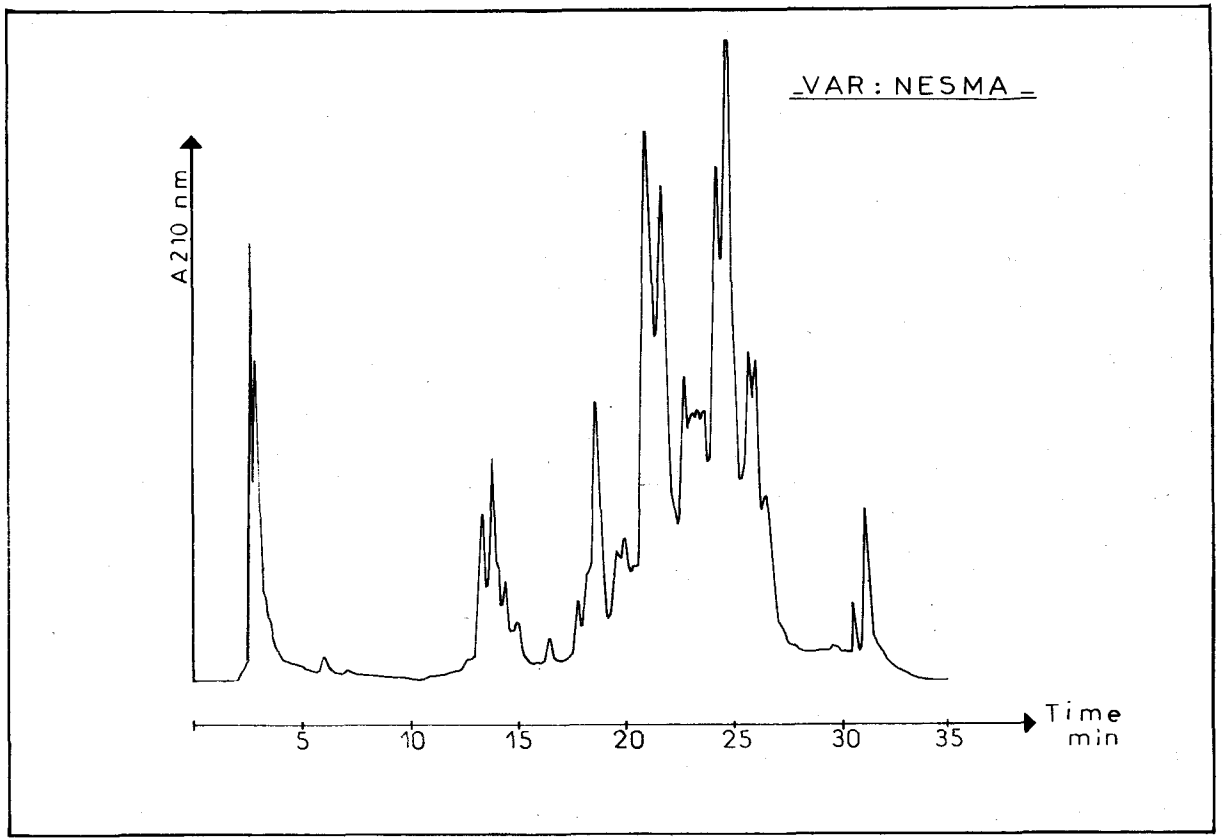
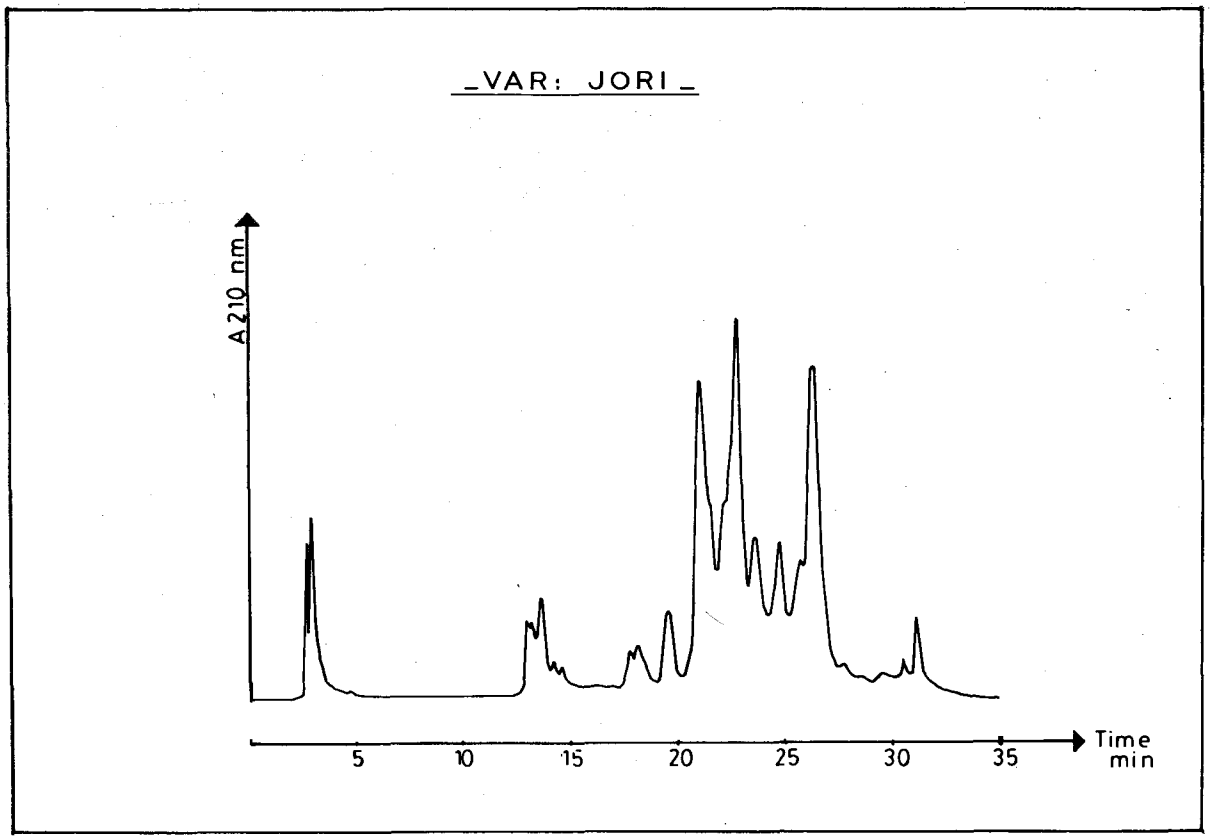


Fig. 6 : Deyx chromatogrammes de la variété de blé JORI.



RESUME

Le problème de l'identification des variétés de blé revêt une importance considérable car les cultivars de blé diffèrent les uns des autres quant à leurs caractéristiques agronomiques et technologiques. Les méthodes exploitant les critères morphologiques et les tests chimiques rapides ne sont plus d'un usage courant à cause de leur non spécificité vis-à-vis d'une multitude de variétés dont la généalogie devient de plus en plus complexe.

Les méthodes électrophorétiques et chromatographiques, appliquées aux protéines de réserve (gliadines et glutérines), se sont révélées très efficaces dans ce domaine. Dans le présent article, un tour d'horizon bibliographique sur ces deux techniques a été fait. Les conditions opératoires, les contraintes, et les modes d'exploitation des données sont discutés.

MOTS CLES

Identification; Variétés de blé; Electrophorèse; Chromatographie.

SUMMARY

The problem of identifying wheat varieties is important because wheat cultivars markedly differ in their processing qualities and agronomic characteristics. The methods using morphologic criteria and rapid chemical tests are no longer intensively used because they are unspecific towards a growing number of wheat cultivars that are genetically interrelated. Electrophoretic and chromatographic methods applied to separate storage proteins (gliadins and glutenins), have been proved to be efficient in differentiating cultivars among them. In this paper, a literature survey about the use of these two techniques was accomplished. Operating conditions, constraints, and data analysis were discussed.

KEY WORDS

Identification ; Wheat variety ; Electrophoresis ; Chromatography.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUTRAN, J.-C. 1973. L'identification de variétés de blés. Bull. anc. Elèves Ec. Fr. Meun. 256 : 163-169.

AUTRAN, J.-C., et A. BOURDET. 1975. L'identification des variétés de Blé : établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain. Ann. Amelior. Plant. 25 : 277-301.

AUTRAN, J.-C., W. BUSHUK, C.W. WRIGLEY, and R.R. ZILLMAN. 1979. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. IV. Comparison of international methods. Cereal Foods World 24 : 471, 472, 474, 475.

AUTRAN, J.-C., R. BERRIER, M.-F. JEANJEAN, P. JOUDRIER, et K. KOBREHEL. 1981. Emplois de l'électrophorèse dans la filière <Céréales>. Possibilités et limites actuelles. Industrie des Céréales, N° 8 (février) : 3-19.

BAKHELLA, M. 1988. Identification and classification of Moroccan wheats. Ph. D. thesis, Department of Grain Science and Industry, Kansas State University, Manhattan, KS, 66506, USA.

BEAUX, Y. 1975. Variétés de blé : comment les reconnaître? Bull. anc. Elèves Ec. Fr. Meun. 268 : 185-188.

BERGER, M., ET J. LE BRUN. 1986. Nouvelles d'identification variétale. Industries des Céréales N° 40 (mars-avril) : 11-17.

BIETZ, J.A. 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromato. 255 : 219-238.

BIETZ, J.A. 1984. Analysis of wheat gluten proteins by high performance liquid chromatography. Part II. Baker's Dig. 58 (2) : 22, 24.

BIETZ, J.A. 1985. High performance liquid chromatography : How proteins

look in cereals. Cereal Chem. 62 : 201-212.

BIETZ, J.A., and T. BURNOUF. 1985. Chromosomal control of wheat gliadin : Analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography. Theor. Appl. Genet. 70 : 599-609.

BIETZ, J.A., T. BURNOUF, L.A. COBB, and J.S. WALL. 1984a. Gliadin analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography : Optimization of extraction conditions. Cereal Chem. 61 : 124-129.

BIETZ, J.A., T. BURNOUF, L.A. COBB, and J.S. WALL. 1984b. Wheat varietal identification and genetic analysis by reversed-phase high performance liquid chromatography. Cereal Chem. 61 : 129-135.

BIETZ, J.A., and L.A. COBB. 1985. Improved procedures for rapid wheat varietal identification by reversed-phase high performance liquid chromatography of gliadin. Cereal Chem. 62 : 332-339.

BRANLARD, G., and M. DARDEVET. 1985. Diversity of grain protein and bread wheat quality. I. Correlation between gliadin bands and flour quality characteristics. J. Cereal Sci. 3 : 329-343.

BRANLARD, G., et A. LE BLANC. 1985. Les sous-unités gluténines de haut poids moléculaire des blés tendres et des blés durs cultivés en France. Agronomie, 5 : 467-477.

BROWN, J.W.S., and R.B. FLAVELL. 1981 Fractionation of wheat gliadin and glutenin subunit by two-dimensional electrophoresis and the role of group 6 and group 2 chromosomes in gliadin synthesis. Theor. Appl. Genet. 59 : 349-359.

BROWN, J.W.S., C.N. LAW, A.J. WORLAND, and R.B. FLAVELL. 1981. Genetic variation in wheat endosperm proteins : An analysis by two-dimensional electrophoresis using intervarietal chromosomal substitution lines. Theor. Appl. Genet. 59 : 361-371.

BURNOUF, T., and J.A. BIETZ. 1984. Reversed)phase high performance liquid chromatography of durum wheat gliadins : relationship to durum wheat quality. J. Cereal Sci. 2 : 3-14.

BUSHUK, W. 1986. Wheat : Chemistry and uses. Cereal Foods World 31 : 218-220-222-225-226.

BUSHUK, W., and R.R. ZILLMAN. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. Apparatus, method, and nomenclature. Can. J. Plant Sci. 58 : 505-515.

CHUNG, K. H., and Y. POMERANZ. 1979. Acid-soluble proteins of wheat flours. II. Binding to hydrophobic gels. Cereal Chem. 56 : 196-201.

COOKE, R.J. 1984. The characterization and identification of cultivars by electrophoresis. Electrophoresis 5 : 59-72.

COTTENET, M., K. KOBREHEL, et J.-C. AUTRAN. 1984. Hydrophobicité des gamma-gliadines 45 et 42 du blé dur (Triticum Durun DESF.). Sciences des Aliments 4 : 483-504.

DU CROS, D.L., and C.W. WRIGLEY. 1979. Improved electrophoretic methods for identifying cereal varieties. J. Sci. Food Agric. 30 : 785-794.

HAMES, B.D., and D. RICKWOOD. 1981. Gel electrophoresis of proteins; A practical approach. 1st edition, IRL Press Limited, LONDON, UK.

HEARN, T.W., F.E. REGNIER, and C.T. WeEHR. 1982. HPLC of peptides and proteins. American Laboratory 14 (october) : 18, 20, 23, 24, 27, 30, 35, 36, 38, 39.

HUEBNER, F.R., and J.A. BIETZ. 1984. Separation of wheat gliadins by preparative reversed-phase high performance liquid Chromatography. Cereal

Chem. 61 : 544-549.

HUEBNER, F.R., and J.A. BIETZ. 1987. Improvement in wheat protein analysis and quality prediction by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 64 : 15-20.

JORDAN, E.M., and S. RAYMOND. 1969. Gel electrophoresis : A new catalyst for acid systems. Analyt. Biochem. 27 : 205-211.

JONES, B.L., G.L. LOOKHART, S.B. HALL, AND K.F. FINNEY. 1982. Identification of wheat cultivars by gliadin electrophoresis : Electrophoregrams of the 88 wheat cultivars most commonly grown in the United States in 1979. Cereal Chem. 59 : 181-188.

KHAN, K. 1982. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gluten proteins. Bakers' Digest 56 : 41-19.

KHAN, K. C.E. McDONALD, and O.J. BANASIK. 1983. Polyacrylamide gel electrophoresis of gliadin proteins for wheat variety identification-procedural modifications and observations. Cereal Chem. 60 : 178-181.

KHAN, K., A.S. HAMADA, and J. PATEK. 1985. Polyacrylamide gel electrophoresis for wheat variety identification : effect of variables on gel properties. Cereal Chem. 62 : 310-313.

KRUGER, J.E., and B.A. MARCHYLO. 1985. Selection of column and operating conditions for reversed-phase high performance liquid chromatography of proteins in Canadian wheat. Can. J. Plant. Sci. 65 : 285-298.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680-685.

LAFIANDRA, D., and D.D. KASARDA. 1985. One- and two-dimentional (two-pH) plyacrylamide gel electrophoresis in a single gel : separation of wheat

proteins. Cereal Chem. 62 : 314-319.

LEE, J.W., and J.A. RONALDS. 1967. Effect of environment on wheat gliadin. Nature (London) 213 : 844-846.

LOOKHART, G.L. 1985. Gliadin electrophoretic variations in foundation Arkan grown at 16 Kansas agricultural experiment stations in 1983. Cereal Chem. 62 : 335-360.

LOOKHART, G.L. 1990. Cereal proteins : Composition of their major fractions and methods for identification. p. 441-468. In K. Lorenz and K. Kulp (ed) Handbook of cereal science and technology. Marcel Dekker Publishers, New York, NY, USA.

LOOKHART, G.L., L.D. ALBERS, and J.A. BIETZ. 1986. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis and high performance liquide chromatography analysis of gliadin polymorphism in the wheat cultival Newton. Cereal Chem. 63 : 497-500.

LOOKHART, G.L., and J.A. BIETZ. 1990. Practical Wheat Varietal Identification in the United States. Cereal Foods World 35 : 404-407.

LOOKHART, G.L., D.B. COOPER, and B.L. JONES. 1985. Effects of temperature and alternate lactate buffer systems on resolution of wheat gliadin proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Cereal Chem. 62 : 19-22.

LOOKHART, G.L., and K.F. FINNEY. 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadins. The effect of environment and germination. Cereal Chem. 61 : 496-499.

LOOKHART, G.L., B.L. JONES, S.B. HALL, and K.F. FINNEY. 1982. An improved method for standardizing polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadin proteins. Cereal Chem. 59 : 178-181.

LOOKHAART, G.L., and Y POMERANZ. 1985. Gliadin high performance

liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis patterns of wheats grown with fertilizer treatments in the United States and Australia on sulfur-deficient soils. Cereal Chem. 62 : 227-229.

LUKOW, O.M., and W. BUSHUK. 1984. Influence of germination on wheat quality. II. Modification of endosperm protein. Cereal Chem. 61 : 295-301.

MECHAM, D.K., D.D. Kasarda, and C.O. QUALSET. 1985. Identification of western U.S. wheat varieties by polyacrylamide gel electrophoresis of gliadin proteins. Hilgardia 53 (7) : 1-32.

NOVOSELSKAYA, A.Y., E.V. METAKOVSKY, and A.A. SOZINOV. 1983. The study of gliadin polymorphism of some wheat varieties by means of one and two dimensional electrophoresis. Cytol. Genet. (USSR) 17 (5) : 45-49.

PAYNE, P.I., C.N., LAW, and E.E. MUDD. 1980. Control by homologous group 1 chromosomes of the high-molecular weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. Theor. appl. Genet. 58 : 113-120.

POPINEAU, Y. 1965. Fractionation of acetic acid-Soluble proteins from wheat gluten by hydrophobic interaction chromatography : Evidence for different behaviours of gliadin and glutenin proteins. J. Cereal Sci. 3 : 29-38.

SAPIRSTEIN, H.D., and W. BUSHUK. 1985a. Computer-aided analysis of gliadin electrophoregrams. I. Improvement of precision of relative mobility determination by using a three reference hand standardization. Cereal Chem. 62 : 372-377.

SAPIRSTEIN, H.D., and W. BUSHUK. 1985b. Computer-aided analysis of gliadin electrophoregrams. II. Wheat cultivar identification and class comparisons. Cereal Chem. 62 : 377-392.

SAPIRSTEIN, H.D., and W. BUSHUK. 1985c. Computer-aided analysis of gliadin electrophoregrams. III. Characterization of the heterogeneity in gliadin

composition for a population of 98 common wheats. Cereal Chem. 62 : 392-398.

SHEWRY, P.R., and B.J. MIFLIN. 1985. Seed storage proteins of economically important cereals. p. 1-83. In Y. Pomeranz (ed) Advances in cereal science and technology, Vol. VII. Am. Assoc. of Cereal Chem. Inc;, St. Paul, MN, USA.

TKATCHUK, R., and V.J. MELLISH. 1980. Wheat cultivar identification by high voltage gel electrophoresis. Ann. Technol. Agrico. 29 : 207-212.

WRIGLEY, C.W. 1970. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis : Application to the study of genotypic variations in wheat gliadins. Biochemical Genetics 4 : 509-516.

WRIGLEY, C.W. 1976. Single-seed identification of wheat varieties : use of grain hardness testing, electrophoretic analysis and a rapid test paper for phenol reaction. J. Sci. Food Agric. 27 : 429-432.

WRIGLEY, C.W., J.-C. AUTRAN, AND W. BUSHUK. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. p. 211-259. In Y. Pomeranz (ed) Advances in cereal science and technology, vol. V. Am. Assoc. of Cereal Chem., St. Paul, MN, USA.

WRIGLEY, C.M., and K.W. SHEPHERD. 1973. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotypes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 209 : 154-162.

ZILLMAN, R.R. and W. BUSHUK. 1979b. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II. Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregram. Can. J. Plant Sci. 59 : 281-286.