

Exposé oral de soutenance du D.E.A.

20 Novembre 1969.

Mon stage a été effectué, avec l'accord de Monsieur le Professeur ULRICH, au Laboratoire d'Etudes des Blés Français, à l'Ecole Française de Meunerie, sous la direction de Monsieur Baudet, Directeur de Recherches à l'INRA.

Le sujet du travail proposé est : « L'Etude de la répartition histologique des nucléoprotéines dans le grain de blé. De nombreux travaux ont en effet été consacrés aux nucléoprotéines animales mais, par contre, nos connaissances dans le secteur végétal et particulièrement dans le cas des tissus de réserve, demeurent très succinctes.

L'étude des nucléoprotéines du grain de blé présente alors un double intérêt :

- sur le plan de la physiologie végétale, une meilleure connaissance des nucléoprotéines du blé nous éclairerait davantage sur les phénomènes de synthèse des différents composés de réserve et sur le rôle des diverses régions du grain au cours de la maturation.
- sur le plan des problèmes qui se posent au niveau de la sélection de nouvelles variétés de blés dont les caractéristiques doivent répondre aux besoins de différents secteurs de l'utilisation

et de la transformation, les protéines du grain de blé sont à la fois les dépositaires du patrimoine génétique et de leur potentiel d'utilisation.

En conséquence, il est permis de penser qu'une connaissance plus approfondie des nucléoprotéines du blé, lesquelles joueraient un rôle fondamental dans la synthèse de chacun des types de protéines, permettrait d'expliquer selon des critères bio-physico-chimiques, les différences variétales

Nous avons donc envisagé une étude des nucléoprotéines du blé et, dans un premier temps, l'étude des possibilités de leur extraction à partir du matériel végétal.

Nous avons travaillé sur un blé tendre (*Triticum vulgare*) de variété Caffelle, ainsi que sur divers produits de sa mouture industrielle dont l'intérêt est d'offrir en quantités importantes, des fractions grossièrement représentatives des différentes régions du grain.

- Ainsi : - les "gros sons" : qui représentent les enveloppes du grain.
- la farine : qui correspond à l'albumen amyloacé
- les remoulages blancs et les remoulages bis qui sont des produits intermédiaires et dans lesquels, d'ailleurs, se retrouvent les germes.

X

D1

Pour fixer les idées voici un aperçu de la composition de ces différents produits et de leurs proportions relatives

Cependant, les travaux qui vont être exposés ne constituent qu'une phase d'approche de l'étude proposée : avant d'aborder les problèmes d'extraction et d'isolement des nucléoprotéines, il s'agissait d'abord de dresser un inventaire aussi spécifique que possible de ces constituants, fondé sur la détermination quantitative de leurs groupements prosthitiques, c'est-à-dire, les acides nucléiques.

Il convient ~~en~~ ^{ici} de bien distinguer l'extraction des acides nucléiques en vue de leur dosage, opération qui fait appel le plus souvent à des conditions brutales, de l'extraction des acides nucléiques en vue de leur étude et de leur isolement, opération qui n'est alors pratiquement jamais quantitative.

Le travail de détermination quantitative des acides nucléiques est l'objet de la 1^{re} partie de l'exposé, l'extraction des N^P faisant l'objet de la seconde

1^{re} partie : Déterminations d'acides nucléiques dans le blé et les produits de sa mouture :

Ce chapitre ne devait pas constituer l'essentiel de notre étude. Nous entendions seulement obtenir rapidement des valeurs approximatives des taux d'acides nucléiques dans les différents produits. C'est pourquoi nous n'avons pas envisagé de mettre au point de nouvelles méthodes de dosage mais nous avons cru bon d'utiliser les techniques classiques dont certaines avaient été employées au laboratoire sur des produits similaires.

Nous avons ainsi expérimenté les 3 principales techniques d'extraction visant à la détermination des acides nucléiques. Voici leur description rapide et les résultats qu'elles nous ont permis d'obtenir :

1) La technique de Schmidt et Thannhausen 1945.

X D 2 Cette technique permet d'aboutir à une détermination séparée de chacun des types d'AN.

Résultat négatif : gélification de l'amidon en milieu alcalin. Tous les essais d'adaptation ont échoué.

2) Technique de Ogar et Rosen 1949.

X D 3 Prétend également ~~se~~ déterminer séparément l'ARN et l'ADN grâce à des extractions biochimiques différentielles.

Résultat négatif : - gélification de l'amidon à 70°C en milieu HCl₂
- inefficacité de la ~~réparation~~ distinction spécifique ADN/ARN.

3) Technique de Schneider :

X D 4 La méthode est praticable avec les tissus en question, mais elle ne permet qu'une extraction globale.

En résumé : la méthode la moins défavorable semble être celle de Schneider. Cependant, nous avons cru bon de la modifier du fait qu'au cours de la préparation préalable des tissus, une partie des acides nucléiques semble être éliminée avec les composants acido-solubles à froid. Nous avons alors dosé les composés nucléiques à la fois dans les extraits à 0°C et à 30°C

Cependant, la méthode de Schneider ne réalisant qu'une extraction globale et ne permettant pas une ~~analyse~~ distinction entre les 2 types d'acides nucléiques, il est nécessaire d'opérer des déterminations spécifiques

4 méthodes
{ 2 spécifiques
 2 globales

On peut en principe déterminer l'ARN par l'intermédiaire de son ribose, selon la réaction de BIAL (sucine)
L'ADN peut également être dosé spécifiquement par l'intermédiaire du désoxyribose selon la réaction de DISCHE - BURTON.
Enfin, les acides nucléiques peuvent être déterminés globalement soit par mesure de l'absorption UV à 260 nm, soit par dosage du P - nucléique.

Or, dans le cas qui nous intéresse (ble'), il est apparu que le dosage du ribose devait être éliminé d'emblée à cause de la richesse en pentosanes des produits lesquels par hydrolyse donnent des pentoses interférant dans la réaction de BIAL.

Le dosage du désoxyribose fournit par contre de précieux résultats, de sorte que l'ADN est le seul des 2 acides à pouvoir être dosé spécifiquement. Certains tissus offrent cependant des difficultés. D 5. C'est le cas des enveloppes du grain, (cas extrême), à partir desquelles la réaction colorée est perturbée, la coloration variant du bleu au vert, ce qui correspond à un déplacement du maximum d'absorption de 660 à 670 nm.

X

* Les acides nucléiques totaux sont desalbes, en principe, grâce à l'absorption UV due à leurs bases puriques et pyrimidiques. Mais encore faut-il que le spectre ne soit pas trop contaminé par des absorptions non nucléiques.

X Ainsi D 6 voici le spectre donné par un ADN de levure purifié. C'est le cas idéal qu'il faudrait obtenir,

X et voici D 7 les spectres des extraits obtenus ^{260 - 230 320} selon la technique de Schneider (pour le blé)

- L'extrait à chaud est très contaminé et ne laisse apparaître aucune absorption nucléaire, (pourtant la réaction de Burton témoigne de la présence d'ADN en quantités importantes.)

- L'extrait à froid présente une absorption ^{maxi} vers 260-265 nm ^{son spectre} et apparaît donc plus proche du spectre d'ADN pur

X les autres produits fournissent des spectres aussi contaminés, à des degrés divers D 8 (grossiers)

* La seule méthode possible pour déterminer les acides nucléiques totaux reste alors le dosage du P-nucléique, c'est-à-dire en principe, le P total de l'extrait acide à 90°C, après élimination des P lipidiques et thyrique à 0°C.

Cependant, la présence d'amidon dans les produits analysés apporte une quantité non négligeable de P additionnel, non nucléique. Ce fait a été ^{vérifié} en travaillant comparativement sur un amidon de blé.

Finalement, les taux de P-nucléique ont été (7) calculés par différence entre le P-total de l'extrait à 90°C et le P dit "glucidique" estimé en fonction de la teneur en amidon du produit.

Les taux d'A.N totaux ont été déduits des valeurs de P-nucléique; l'ADN est dosé spécifiquement et l'ARN ne pouvant l'être, est estimé par différence.

X Voici d'ailleurs le schéma global de la méthode employée D.9

X et voici les résultats approximatifs que cette méthode nous a permis d'obtenir. D.10

Commentaire: Comme cela apparaît nettement, ce sont les remoulages, fractions contenant les germes, qui sont relativement les plus riches en acides nucléiques.

La farine, qui représente l'albumen amylocé du grain contient une faible proportion d'acides nucléiques. Cependant, en raison de l'importance quantitative de l'albumen, c'est la farine qui renferme, en quantités absolues, la majeure partie des acides nucléiques du grain.

En conclusion de cette 1^{re} partie, concernant les déterminations d'AN, il convient de souligner les difficultés rencontrées dans la réalisation de ce travail, et si nous pouvons faire aisément le bilan des nombreux problèmes rencontrés au cours de l'étude d'un matériel aussi complexe que ^{grain} de blé noir, nous ne pouvons fournir que des résultats approchés.

Néanmoins, les informations rassemblées vont nous permettre d'apprécier l'efficacité des différents traitements mis en oeuvre pour l'isolement des NP, travail qui fait l'objet de la 2^e partie.

2^e partie : Etude de l'Extraction des nucléoprotéines du blé :

Une étude plus fondamentale des NP implique avant tout leur mise en solution dans des conditions convenables à l'aide d'agents respectant l'intégrité de leur édifice moléculaire dans toute la mesure du possible.

Le travail effectué se proposait donc d'étudier " par quels moyens on pourrait solubiliser soit globalement le maximum de NP, soit sélectivement, un type donné de NP.

Comme il semble difficile de déceler la présence de NP uniquement à l'aide de la fraction holoprotéique, il nous a paru logique d'identifier la présence de NP à l'aide d'une détermination d'AN, étant entendu qu'en principe, la liaison AN-protéine ne devrait pas être rompue par les traitements utilisés.

1) Dans un 1^{er} temps, nous avons cherché à solubiliser le maximum de nucléoprotéines du blé, à l'aide de solutions salines, à l'image des procédés cités ci-dessus dans la littérature.

On sait que généralement, les RNP sont solubles dans des solutions salines isotoniques (0,14 M), tandis que les DNP sont solubles soit dans l'eau pure, soit

à des forces ioniques élevées (NaCl 1M) et présentent leur minimum de solubilité pour des cc isotoniques.

L'application de ces méthodes au cas du grain de blé est un échec relatif puisqu'il n'a pas été possible de solubiliser plus de 25% des A.N totaux. (supposés être sous forme de nucléoprotéines). Même des solvants déjà dénaturants comme NaCl 2M sont incapables d'extraire davantage d'acides nucléiques.



Le grain de blé semble donc ici se distinguer des tissus animaux et des tissus végétaux à métabolisme actif, par la difficulté qu'il y a à solubiliser ses composés nucléiques.

2) Nous avons alors essayé de solubiliser les nucléoprotéines avec d'autres solvants lesquels sont en principe peu dénaturants pour les protéines du blé. Ainsi le protocole d'extraction et de fractionnement du type OSBORN, précisé par Baudet et Feillet nous a permis de classer les protéines en la catégorie Alb, Glob - Gliad, Glut.

Dans chacune de ces fractions, nous avons dosé les AN ce qui nous a donné une idée (dans l'hypothèse où la liaison AN-protéine n'est pas brisée) des propriétés de solubilité des NP du blé.

Tableau comparatif D 11 { - salines
- osborne.

X

Nous avons ainsi vérifié que les fractions globulines et glutélines seraient celles qui renfermeraient l'essentiel des NP du grain de blé.

Cela apparaît plus nettement si l'on calcule les quantités d'AN par rapport au poids de protéine de la préparation

X

D 12

Cela apparaît aussi lors de l'examen des spectres UV des extraits pecheriques des préparations protéiques.

X

D 13

Mais le bilan de ces dernières extractions n'est pas quantitatif ce qui est vraisemblablement la conséquence des pertes intervenant au cours des dialyses et lyophilisations mais peut-être aussi d'une estimation par excès des acides nucléiques totaux.

Le résultat semble cependant montrer que les NP du ~~glu~~ blé (tjs dans l'hypothèse où elles ne seraient pas dénaturées par les différents traitements) appartiennent à deux types, au moins.

- les unes seraient facilement extractibles par des solutions salines et s'affranchiraient aux globulines.

- les autres seraient très difficiles à solubiliser et seraient semblables à des protéines de réserve du type gluténine.

Cela montre aussi que si l'étude des NP du type "globuline" peut être envisagée, la connaissance approfondie des NP du type "gluténine" reste très difficile, faute de moyens permettant une solubilisation non dénaturante.

En conclusion de ce travail, il nous est apparu que le grain de blé constitue un tissu très complexe, tant par son caractère ^{à l'organe} ~~de réserve~~ de réserve peu hydraté et riche en constituants insolubles que par son hétérogénéité cad par la présence de différentes zones cellulaires de propriétés et de fonctions biologiques diverses.

Il semble alors que devant cette complexité, et faute de connaissances précises sur l'état des cellules et des organites cellulaires du blé mature, il soit préférable de s'orienter vers un tissu mieux différencié qui détient son potentiel héréditaire et ses caractéristiques biochimiques et génétiques. ^{Le tissu} ~~est~~ ^{serait} le germe, région vivante du grain à partir de laquelle on peut espérer obtenir des résultats plus significatifs qu'à partir de la totalité du grain.

Le travail à fournir pourrait donc encore utiliser des extractions solines en vue de l'isolement des NP et mais pourrait aussi ^{mettre au point} ~~employer~~ des méthodes nouvelles d'extraction des AN, telles que le procédé au phénol.

Les constituants isolés pourraient être étudiés finement à l'aide des techniques actuelles de fractionnement : la chromatographie et l'électrophorèse.

~~L'intérêt de~~ Le travail ~~sur le germe de blé~~ intéresserait donc à la fois la physiologie végétale puisqu'il essaierait de préciser la nature et le rôle des NP

du germe de blé et aussi la génétique des blés en vue de la création de variétés nouvelles, mieux adaptées à nos besoins puisque le germe est la région la plus représentative du patrimoine génétique des ~~variétés~~ différentes variétés

Densité optique

SPECTRE U.V.
D'ARN DE LEVURE

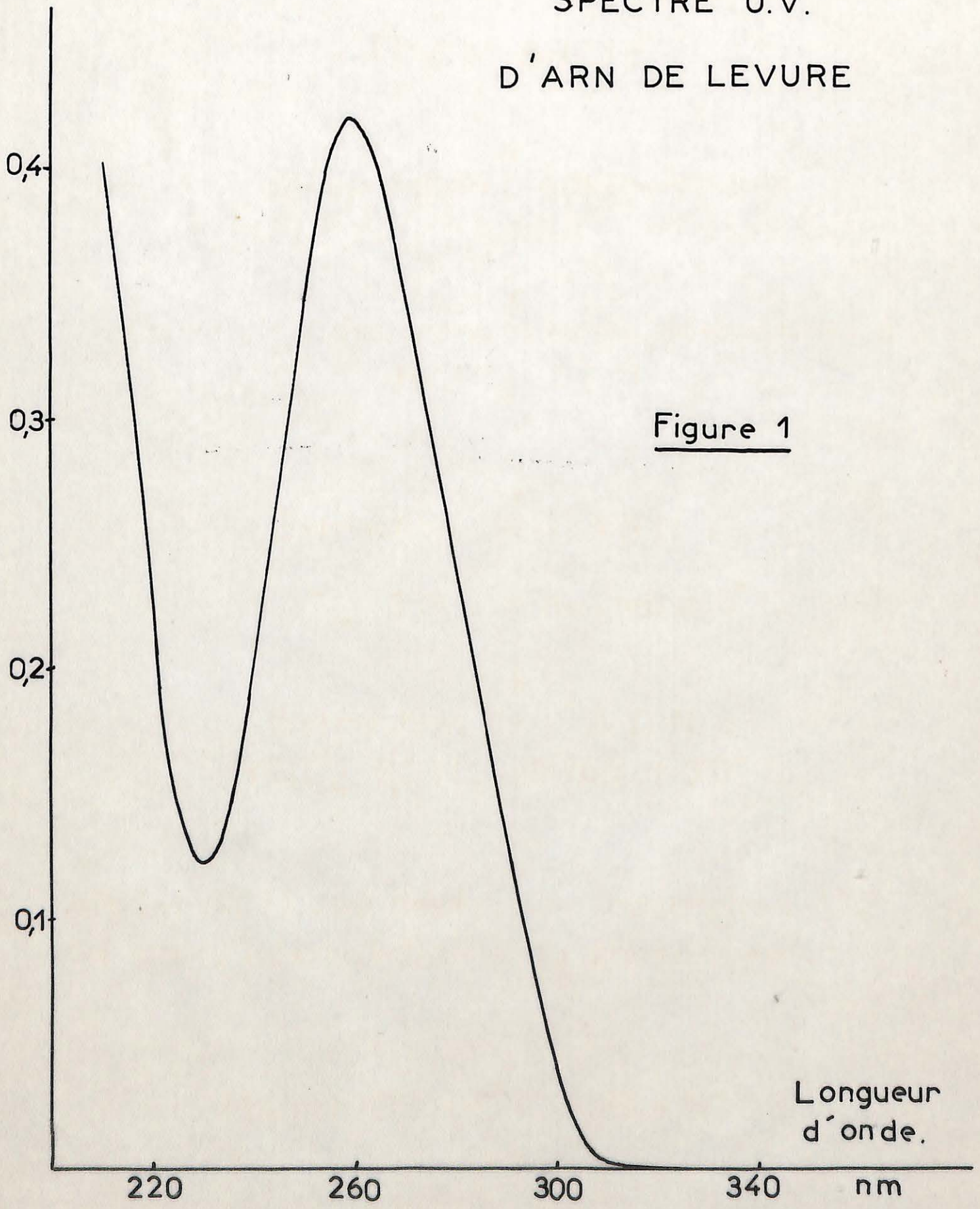


Figure 1

Longueur
d'onde.

220 260 300 340 nm

Densité optique
à 265 nm

DOSAGE DE L'ADN
PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Courbe d'étalonnage à partir
d'un ADN de thymus

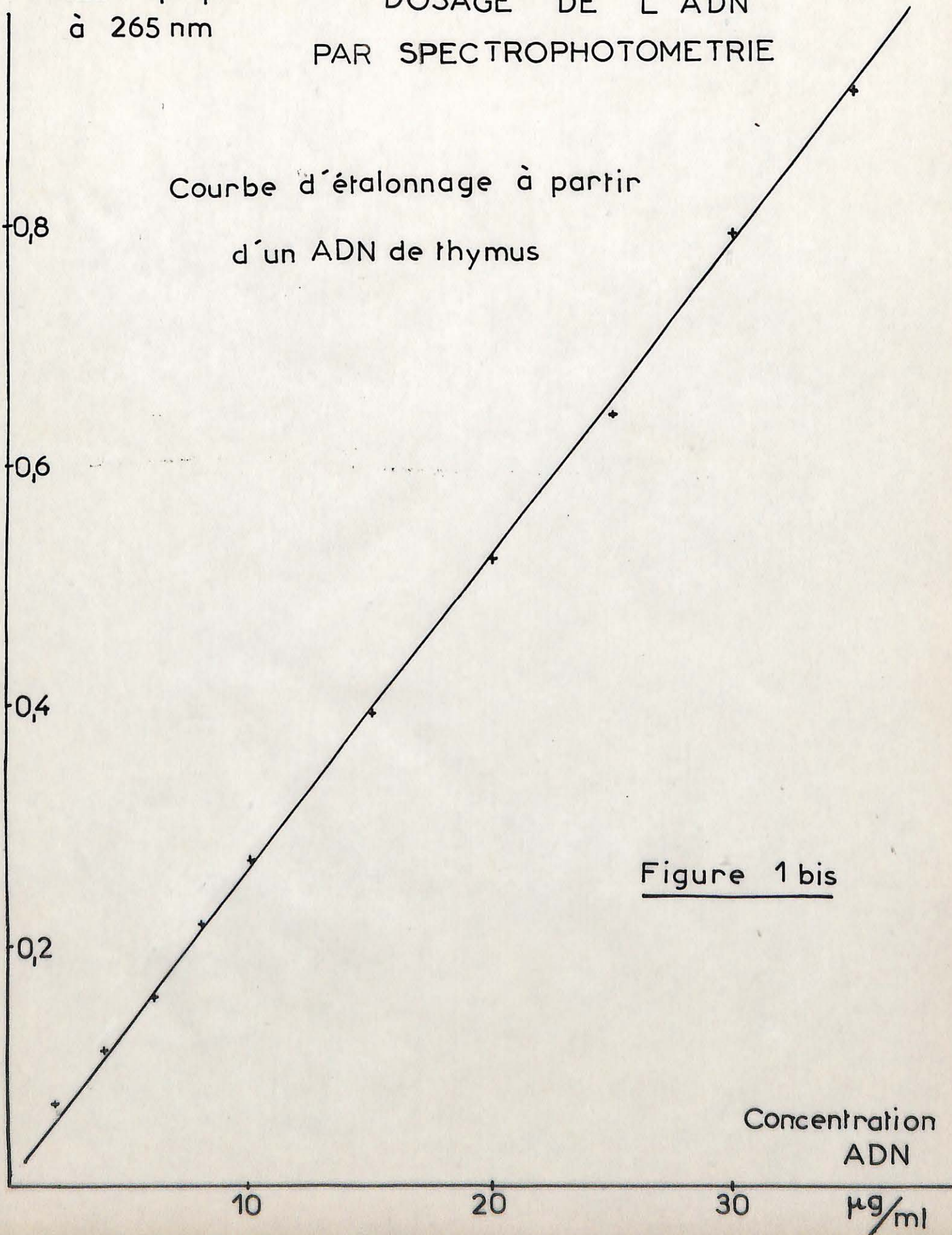


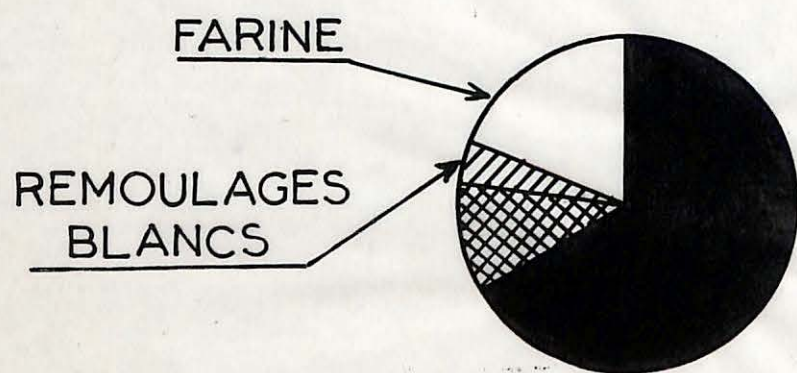
Figure 1 bis

« ORIGINE HISTOLOGIQUE »

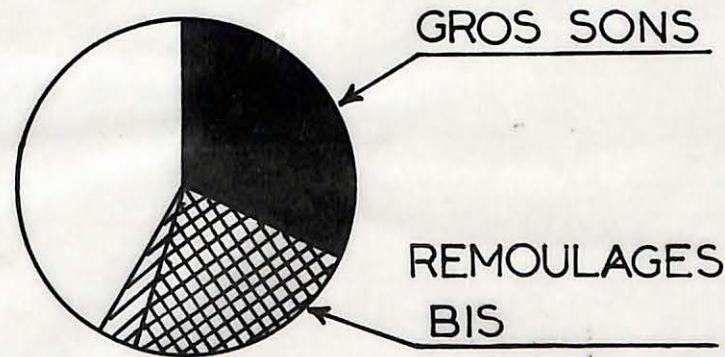
DES DIFFÉRENTES FORMES DE PHOSPHORE DU

GRAIN DE BLÉ

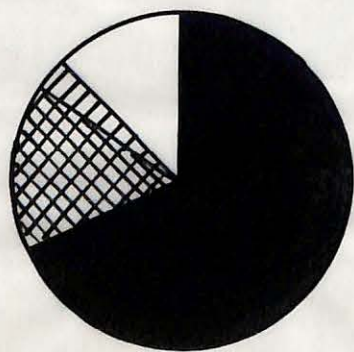
Figure 1 ter



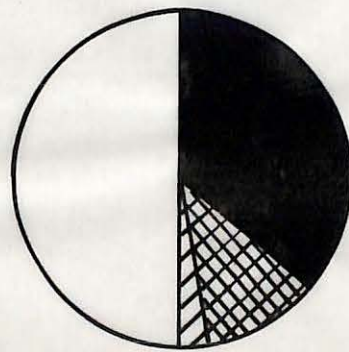
P-TOTAL



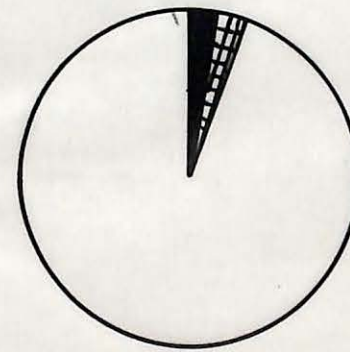
P-NUCLÉIQUE



P-PHYTIQUE



P-LIPIDIQUE



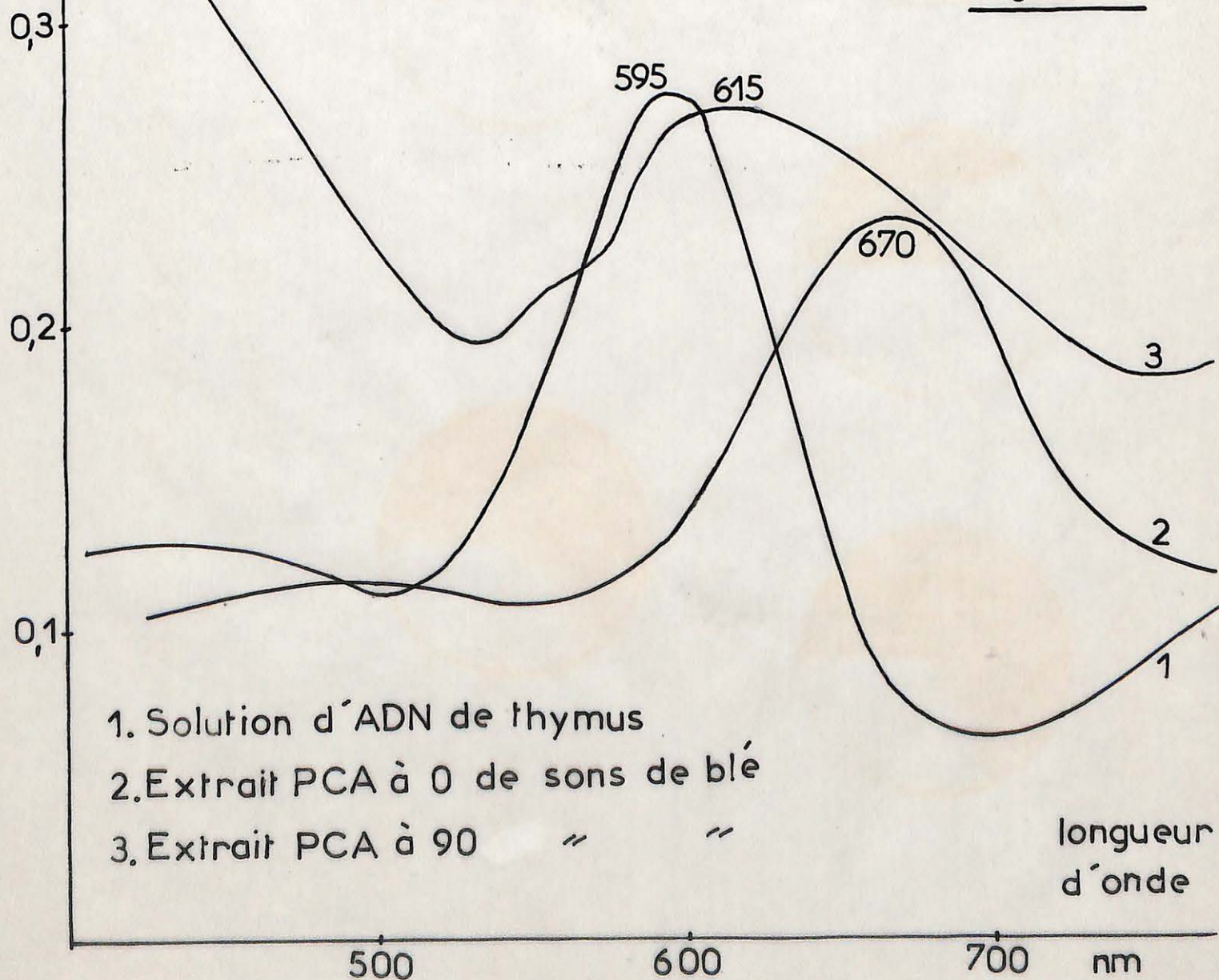
P-GLUCIDIQUE (?)

Densité
optique

DOSAGE DE L'ADN SELON LA METHODE DE DISCHE-BURTON

Spectre de la coloration

Figure 2



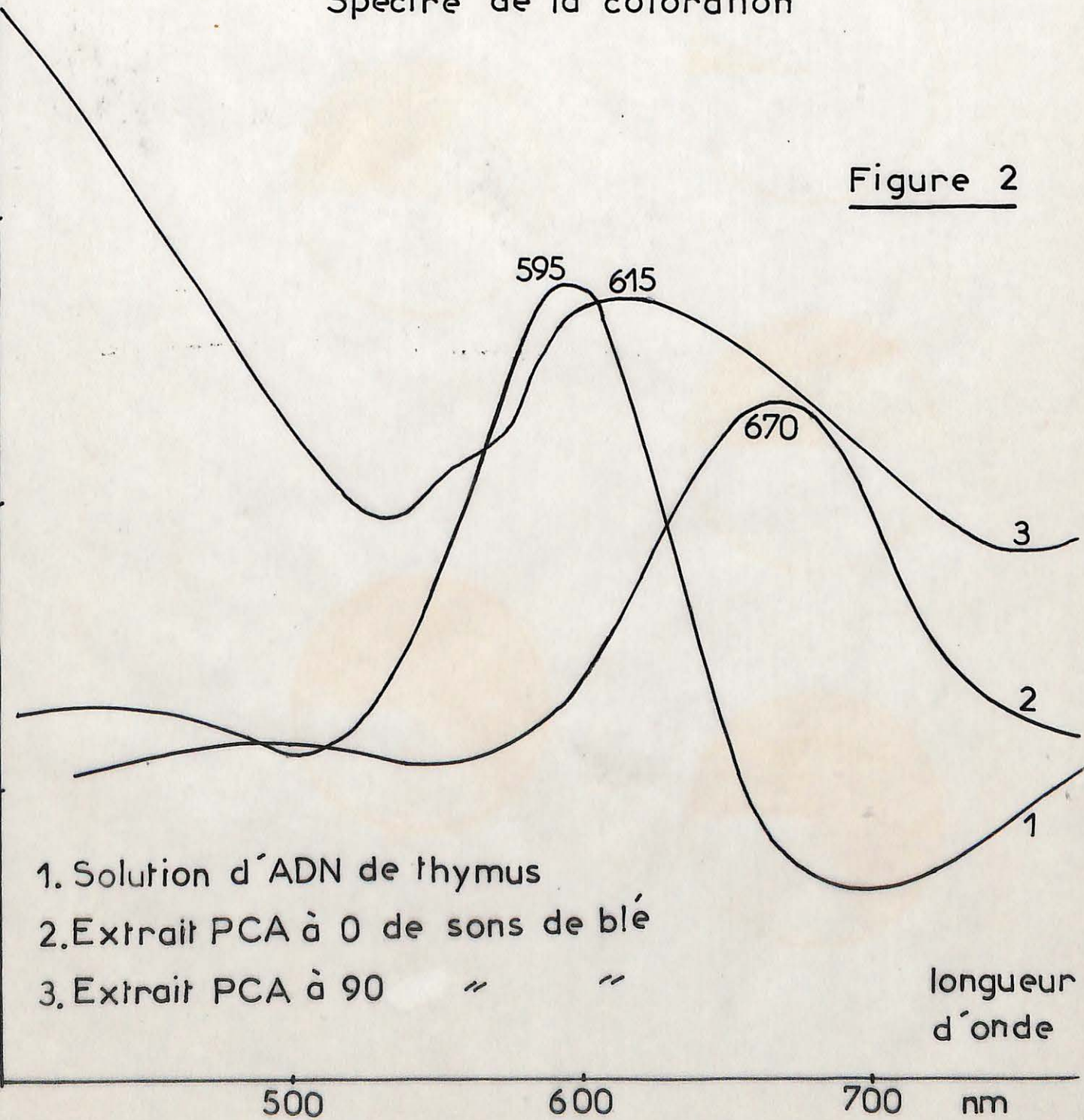
1. Solution d'ADN de thymus
2. Extrait PCA à 0 de sons de blé
3. Extrait PCA à 90 " "

longueur
d'onde

DOSAGE DE L'ADN SELON LA METHODE DE DISCHE-BURTON

Spectre de la coloration

Figure 2



SPECTRES U.V. D'EXTRAITS
PERCHLORIQUES DE BLÉ.

1 à 0°C

2 à 90°C

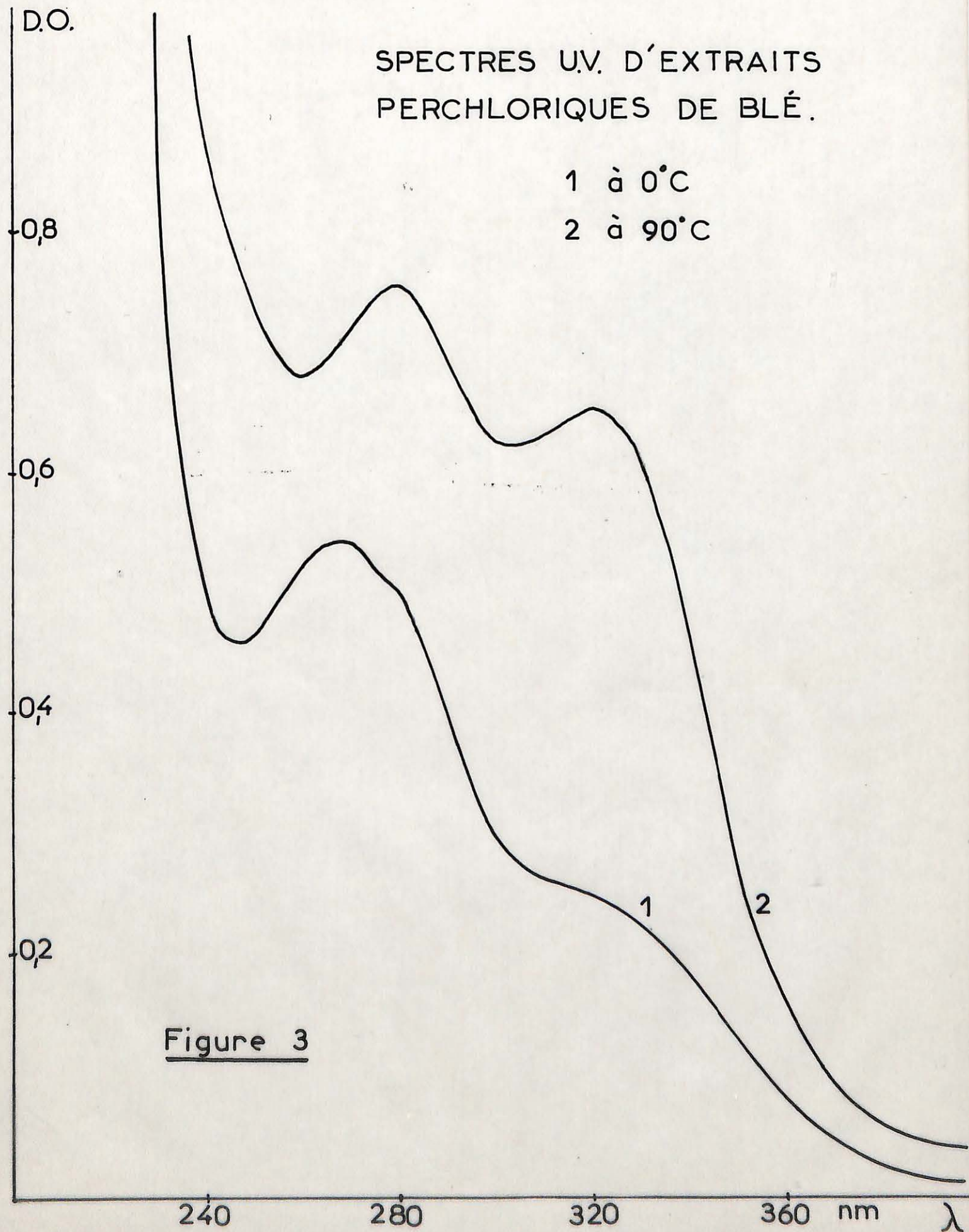


Figure 3

Densité
Optique

SPECTRES UV. D'EXTRAITS HClO_4
DE 4 PRODUITS DE LA MOUTURE
D'UN BLÉ CAPPELLE

(Extractions à 0°C)

1 - Farine

2 - Remoulages blancs

3 - Remoulages bis

4 - Gros sons

Figure 4

1,00

0,75

0,50

0,25

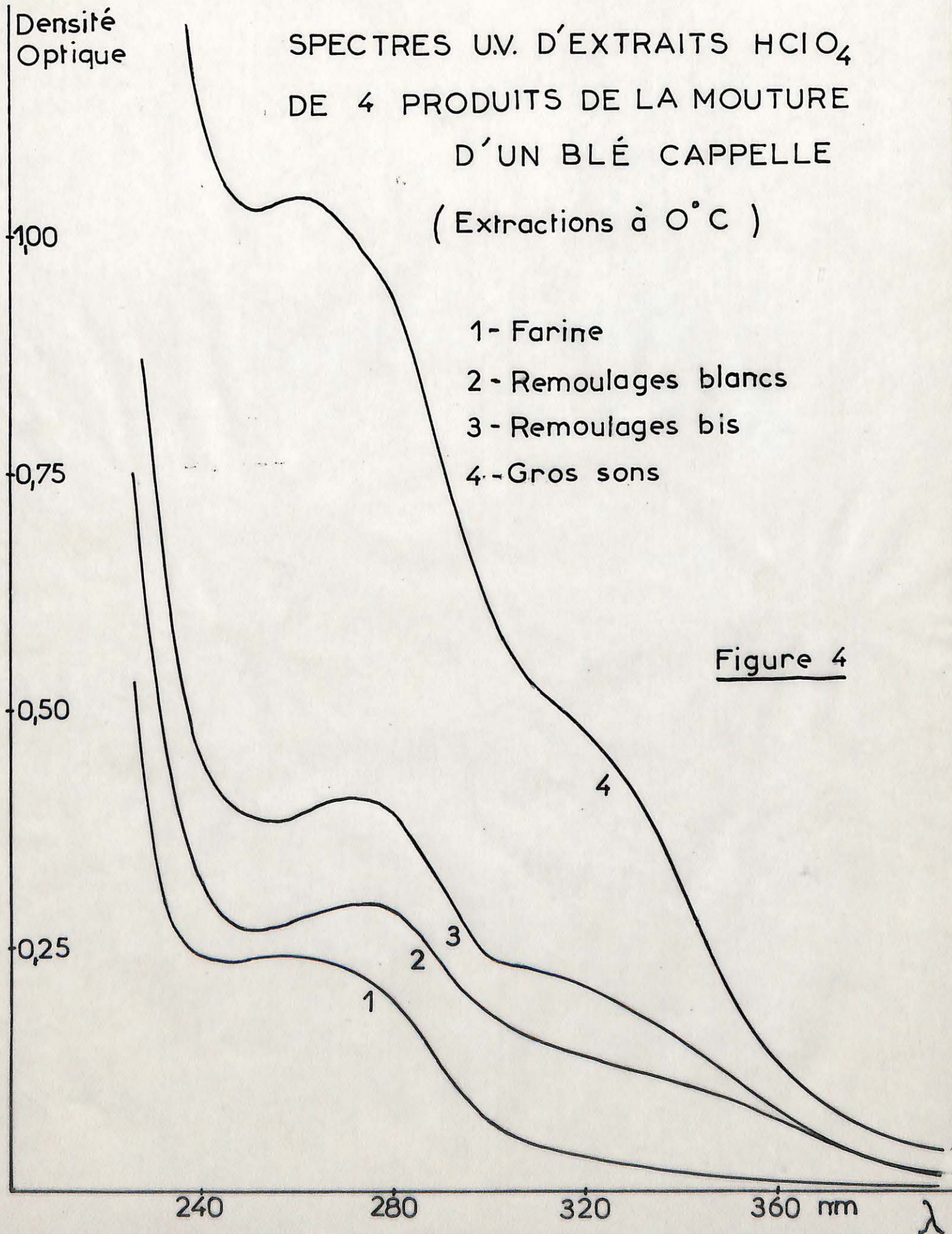
240

280

320

360 nm

λ



Densité
Optique

SPECTRES UV. D'EXTRAITS HClO_4
DE 4 PRODUITS DE LA MOUTURE
D'UN BLÉ CAPPELLE
(Extractions à 90°C)

1,00

0,75

0,50

0,25

Figure 5

240 280 320 360 nm λ

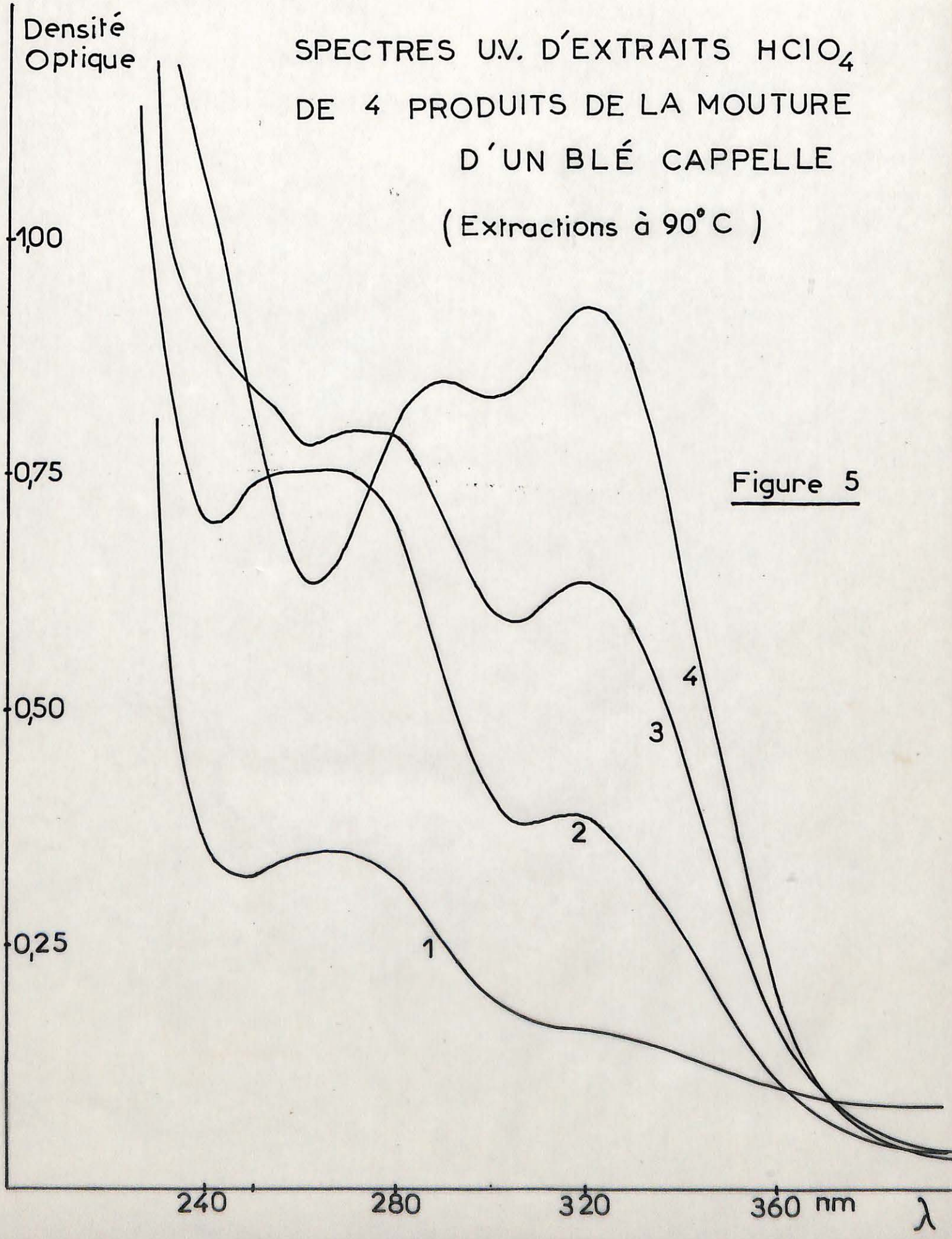
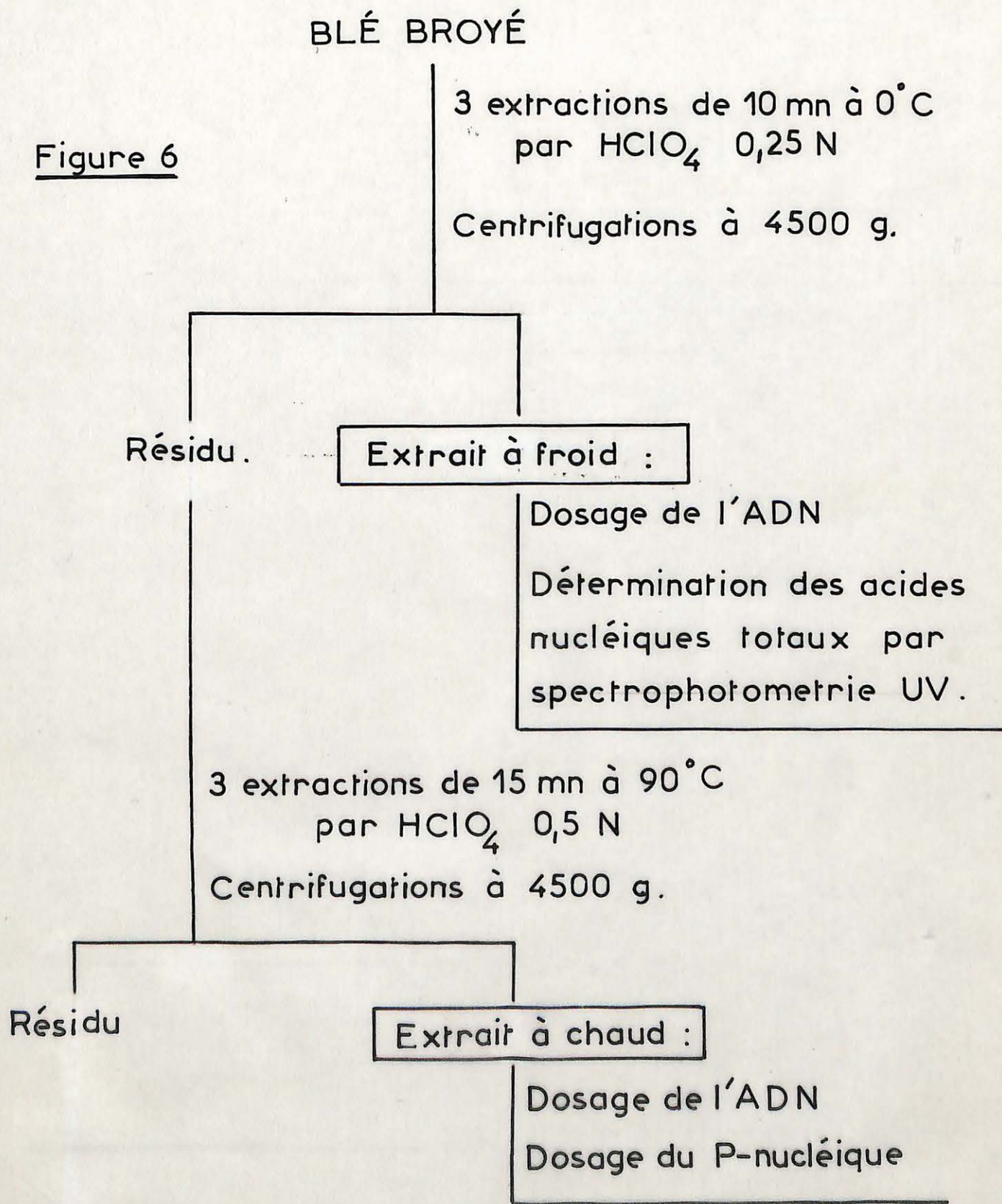


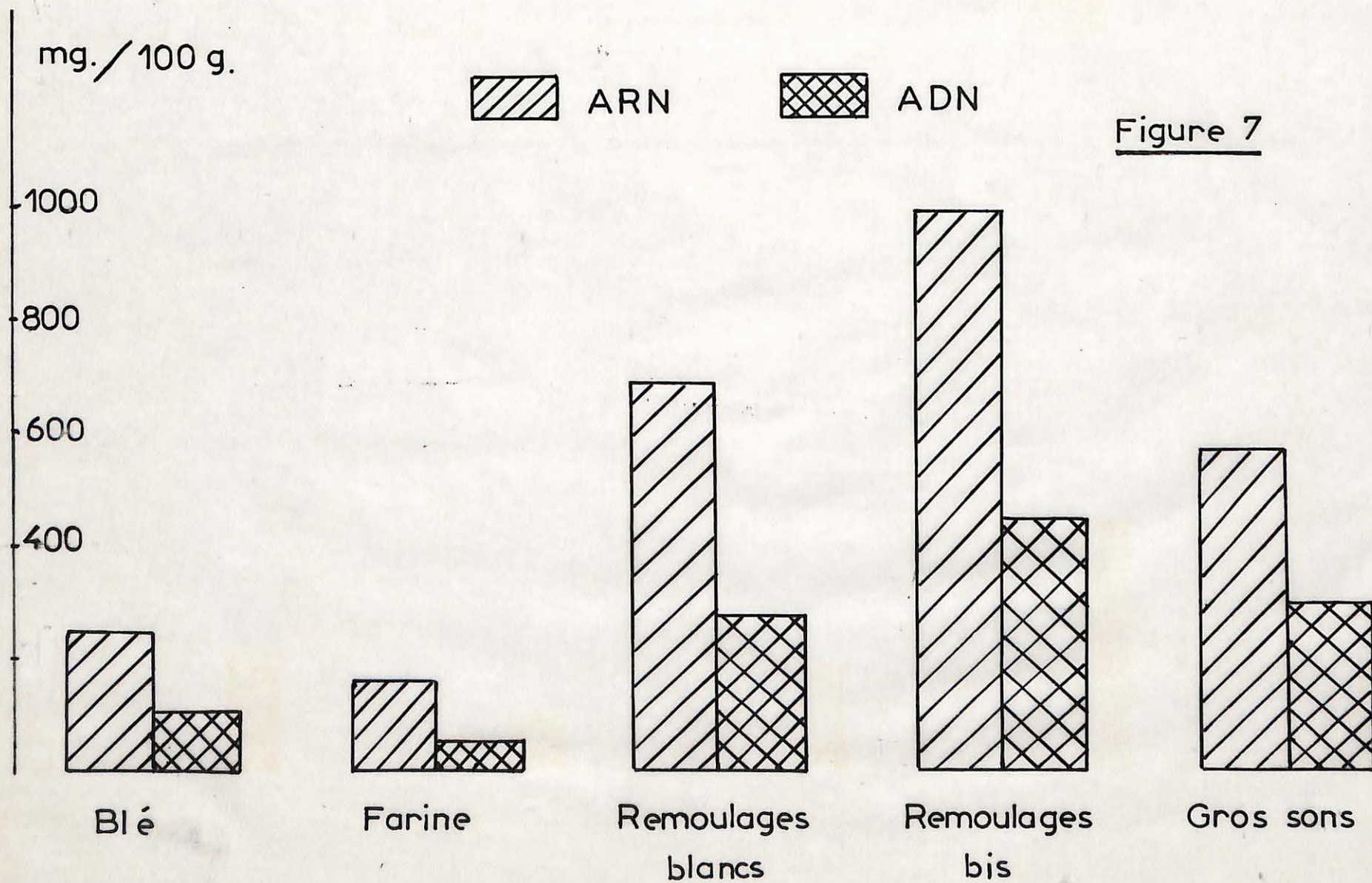
Figure 6



SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL
DE DETERMINATION DES ACIDES NUCLEIQUES

TENEURS EN ACIDES NUCLÉIQUES DES DIFFÉRENTS PRODUITS

DE LA MOUTURE DU BLÉ

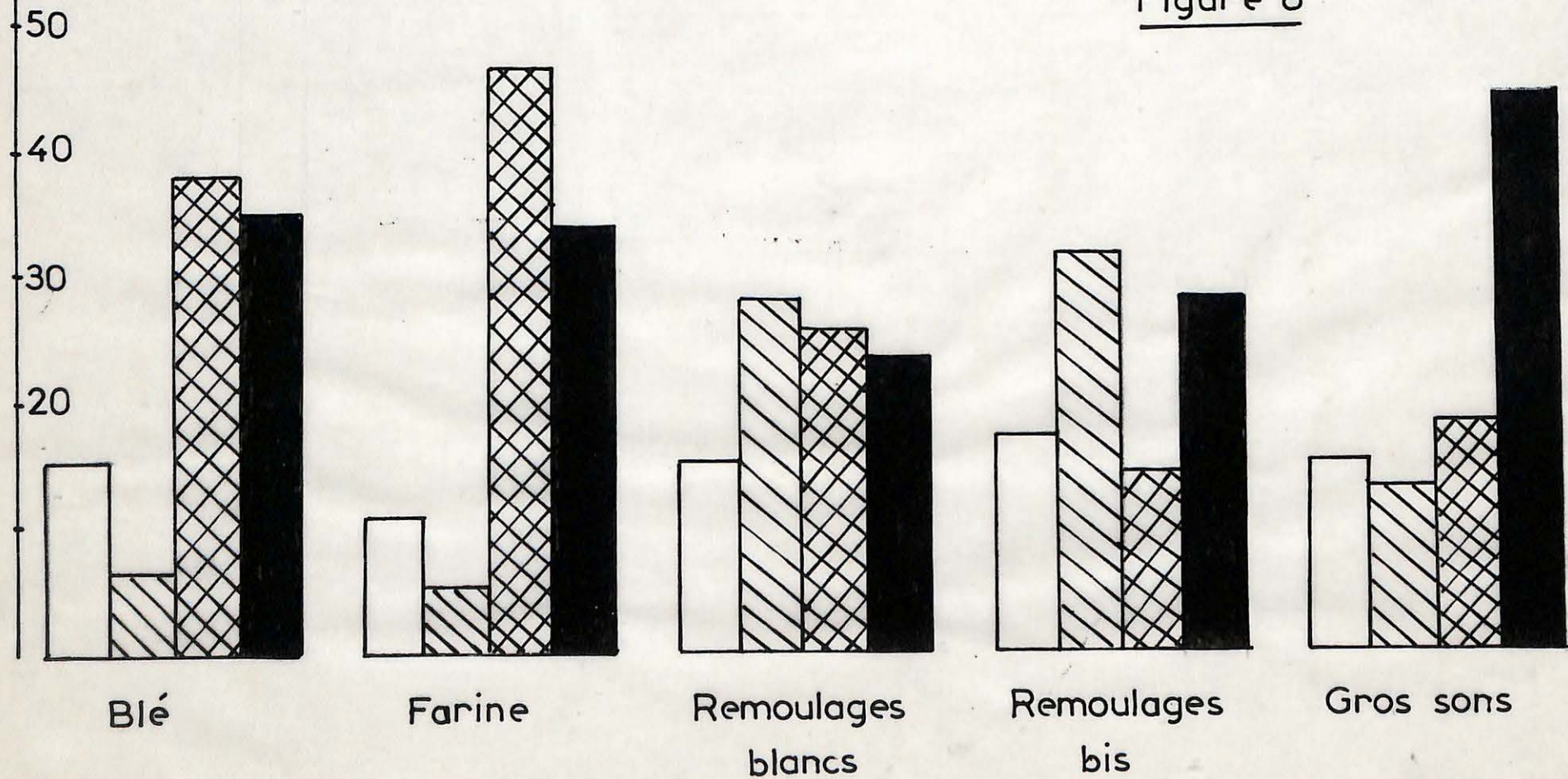


COMPOSITION PROTEIQUE DU BLE CAPPELLE ET DES PRODUITS DE SA MOUTURE

Albumines Globulines
Gliadines Gluténines

Figure 8

% de l'azote total



TENEURS EN ACIDES NUCLÉIQUES DES PRÉPARATIONS PROTÉIQUES

en % d'acides nucléiques/protéines

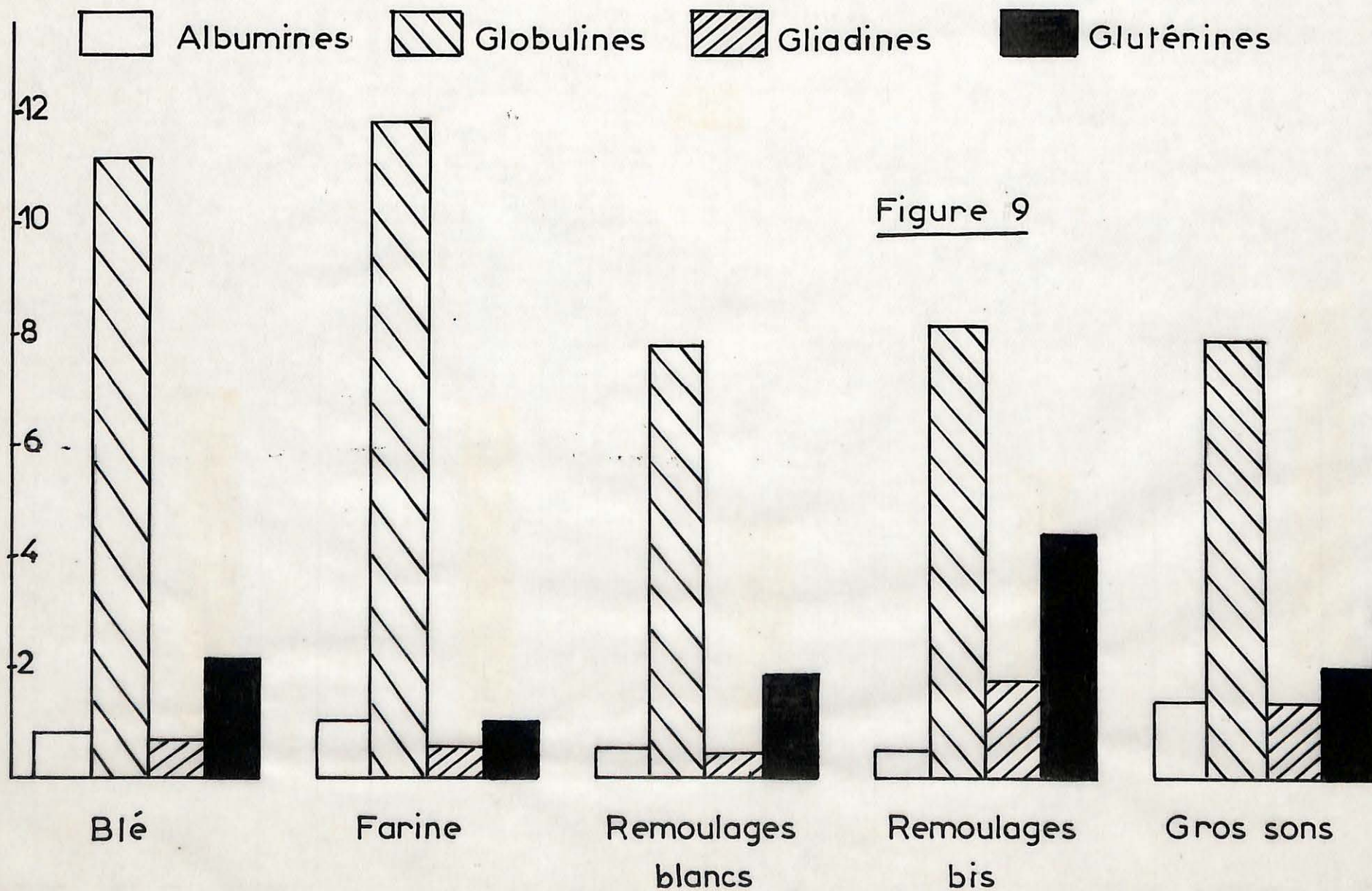


Figure 9

COMPOSITION AZOTÉE ET PHOSPHORÉE
DES PRODUITS DE LA MOUTURE DU BLÉ.

	‰ du grain	mg p. 100g. de produit		mg p 100g de blé .	
		N	P	N	P
Blé Cappelle	100	2130	426	-	-
Farine	78,3	1905	111	1493	87
Remoulages blancs	1,6	3080	752	49	12
Remoulages bis	5,8	3160	1255	183	73
Gros sons	14,3	2860	1933	409	276

EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES DE BLE A L'AIDE DE DIFFERENTS SOLVANTS .

	en mg d'AN extraits/100 g. blé	en % des A.N. totaux du blé
Eau	14,0 mg	4,1 %
NaCl 0,14 M	47,2	13,9
NaCl 1 M	72,3	21,2
NaCl 2 M	70,0	20,6
{ Albumines: eau Globulines: Na 0,5 M Gliadines: alcool 60° Gluténines: GMC	14,5	4,3
	86,5	25,5
	29,7	8,7
	90,8	26,7
		} 65,2 %

TISSU BROYE



Extraction du P. acido soluble

ATC 10 %



Extraction des phospholipides
éthanol-éther



Extraction globale des acides nucléiques
ATC 5 % : 15 mn à 90° C

- Dosage spécifique de l'ARN par la réaction du ribose à l'orcinol
- Dosage spécifique de l'ADN par la réaction à la diphénylamine.

METHODE DE SCHNEIDER
1945

TISSU BROYE



Délipidation : éther-éthanol



Extraction des composés acido-solubles à 0° C
HClO₄ 0,2 N



Extraction de l'ARN :

HClO₄ 1 N . 6 heures à 0° C



Extraction de l'ADN :

HClO₄ 0,5 N . 20 mn à 70° C



ARN et ADN sont dosés par absorption UV
ou par l'intermédiaire du phosphore .

METHODE DE OGUR & ROSEN
1949

TISSU BROYE

↓
Extraction du P. acido-soluble
ATC 7 %

↓
Extraction du P. lipidique
éthanol-éther

↓
Extraction des acides nucléiques par
incubation dans KOH 1 N : 15 h. à 37 °C .

↓
Précipitation de l'ADN par HCl 6 N

L'ARN sous forme d'oligonucléotides
demeure dans le surnageant.

—
ARN et ADN sont dosés par le phosphore .

METHODE de SCHMIDT & THANNHAUSER

1945

SPECTRES UV D'EXTRAITS
PERCHLORIQUES DES

- ALBUMINES : 1
- GLOBULINES : 2
- GLIADINES : 3
- GLUTENINES : 4

DE BLE

