

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT ANALYTIQUES DES PROTEINES

par **J.-C. AUTRAN**

Assistant à l'I.N.R.A.

Professeur à l'École Française de Meunerie
Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés
16, rue Nicolas-Fortin - Paris 13^e

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT ANALYTIQUES DES PROTEINES

par J.C. AUTRAN, Assistant à l'I.N.R.A
Professeur à l'Ecole Française de Meunerie
(Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés,
16, rue Nicolas-Fortin, Paris-13^e)

L'étude des protéines végétales, après avoir été très en retard par rapport à celle des protéines animales, fait actuellement l'objet de nombreuses recherches biochimiques ainsi d'ailleurs que physiologiques ou génétiques. Outre l'intérêt évident d'une étude fondamentale, il est certain qu'une meilleure connaissance de ce matériel devrait contribuer à mieux maîtriser les différentes étapes de la transformation de nombreux produits des industries agricoles et alimentaires.

L'étude proprement biochimique de ces protéines s'effectue généralement selon un schéma bien classique :

- extraction des protéines à partir du matériel biologique brut ;
- purification, c'est-à-dire élimination des substances non protéiques ;
- fractionnement, c'est-à-dire séparation des différentes espèces moléculaires constitutives de la protéine extraite.

1^{re} Partie

QUELQUES NOTIONS THEORIQUES INTERVENANT AU COURS DES OPERATIONS D'EXTRACTION ET DE FRACTIONNEMENT

Les protéines existent généralement dans la nature sous forme de mélanges complexes, les unes à l'état de solutions aqueuses, d'autres, solubles dans l'eau ou les solutions salines, se trouvent à l'intérieur des tissus d'où il faut les extraire ; d'autres, enfin, sont particulièrement difficiles à solubiliser, ce qui constitue un obstacle majeur à toute étude biochimique. C'est le cas des scléroprotéines animales, ou encore de certaines protéines des tissus végétaux de réserve (glutélines).

L'extraction préalable des protéines consiste à réaliser leur mise en solution dans des conditions convenables, c'est-à-dire, autant que possible, à obtenir des solutions limpides et stables sans modifier l'intégrité de leur édifice macromoléculaire.

Or, la plupart des protéines sont très fragiles. On ne saurait leur appliquer les méthodes d'isolement des composés organiques. C'est pourquoi il est primordial de maintenir des conditions opératoires rigoureuses tout au long de leur préparation et de contrôler en particulier les différents facteurs possibles de dénaturation :

- la température

- le pH
- les solvants organiques
- la dilution
- l'étalement en couches monomoléculaires (formation des mousses).

Comme le souligne MOSSE (1968), selon le but recherché, les méthodes d'extraction offrent plusieurs alternatives : elles peuvent être partielles ou exhaustives, ou encore globales ou sélectives. Les caractéristiques de solubilité peuvent donc intervenir, non seulement au niveau de l'extraction, mais aussi au niveau d'un premier fractionnement en groupes protéiques, dans le cas d'une extraction sélective.

Les opérations de fractionnement plus poussé, dont le but est de séparer les différentes espèces moléculaires, que l'on peut appliquer soit à un extrait brut de protéines, soit à un groupe protéique déjà isolé, font par contre intervenir des propriétés autres que la solubilité.

** Exposé présenté le 14 avril 1970, au CERDIA (Massy), à l'occasion des Cours de Perfectionnement des Cadres des Industries Agricoles et Alimentaires (C.P.C.I.A.).

I. — EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT A PARTIR DES CARACTERISTIQUES DE SOLUBILITE

La dissolution d'une protéine P dans un solvant S ne s'effectue que si les forces d'attraction qui s'établissent entre les molécules de la protéine et celles de S sont supérieures aux forces de cohésion auxquelles sont soumises les molécules de P dans le matériel biologique.

Ces forces de cohésion sont représentées d'une part par les interactions entre deux groupes chargés de signes contraires, tels que COO^- et NH_3^+ , et les interactions créées par les dipôles permanents comme les liaisons H, d'autre part, par les attractions de Van der Waals.

Les caractères de solubilité d'une protéine sont alors conditionnés par la répartition et la proportion relative des groupes polaires hydrophiles et apolaires hydrophobes de leurs acides aminés constitutifs, mais sont aussi influencés par le pH du solvant et la présence de sels neutres.

Ainsi, dans l'eau pure, les groupements NH_3^+ et COO^- sont dits « solvatés », c'est-à-dire entourés d'eau. L'addition de faibles quantités de sels neutres favorise la dissolution du fait que les attractions

électrostatiques qui s'exercent entre les paires d'ions sont alors nettement réduites. Par contre, en milieu très salin, il y a compétition entre la solvata-tion de la protéine et celle du sel, d'une part, et formation de liaisons électrostatiques entre les groupes chargés de la protéine et les ions du sel, d'autre part, ce qui se traduit par une désolvata-tion de la protéine. Les molécules de protéine s'agrègent alors et tendent à devenir insolubles : elles précipi-tent.

Les sels neutres ont donc un effet dissolvant à faible concentration et un effet opposé dit « effet de relargage » aux fortes concentrations, ces effets pouvant avoir des intensités différentes selon le groupe protéique envisagé.

Par ailleurs, le pH influe nettement sur la solubi-lité en milieu aqueux ou salin dilué. Généralement, la solubilité présente un minimum au voisinage du point isoélectrique, ce qui s'explique par l'existence d'un maximum des forces de cohésion au moment où la dissociation des groupements carboxyliques est égale à celle des groupes aminés.

II. — CHOIX DES SOLVANTS D'EXTRACTION

Les solvants d'extraction sont donc le plus sou-vent constitués par des solutions aqueuses diluées de sels neutres minéraux. Certaines protéines sont cependant peu solubles dans de tels agents. On est alors amené à utiliser des acides dilués ou des alcalis dilués (protéines du groupe des glutélines)

ou parfois des alcools dilués (prolamines).

Signalons enfin qu'il est préférable de tamponner la solution extractive pour éviter une acidification du mélange au cours des opérations d'extraction, ce qui pourrait provoquer une dénaturation.

III. — MODE OPERATOIRE CLASSIQUE

Les conditions de l'extraction varient avec chaque cas particulier mais on peut en donner le schéma suivant :

- broyage des tissus
- mise en suspension dans la solution d'extraction
- contact plus ou moins prolongé à basse température, avec ou sans agitation
- centrifugation jusqu'à obtention d'une solution limpide et séparation du surnageant par décan-tation
- récupération des protéines par lyophilisation ou par précipitation.

Selon l'objectif recherché, on peut procéder à une ou plusieurs extractions ; on peut aussi faire agir successivement des solvants différents, par exemple

de force ionique croissante, afin de réaliser une extraction exhaustive. Cependant, les fractions pro-téiques solubilisées au cours de ces extractions suc-cessives n'ont généralement pas la même nature. Si la réunion de ces fractions donne un extrait global, leur séparation permet une sélection et donc un fractionnement uniquement sur la base des caractéristiques de solubilité.

C'est ainsi qu'on a pu distinguer classiquement le groupe des albumines solubles dans l'eau et les solutions salines diluées du groupe des globulines salino-solubles mais hydro-insolubles. Albumines et globulines sont, par ailleurs, séparables par effet de relargage, les premières étant en principe précipi-tées par le sulfate d'ammonium à saturation, les secondes par le sulfate d'ammonium à demi satu-ration.

IV. — PURIFICATION DES EXTRAITS PROTEIQUES

Les préparations protéiques ainsi extraites sont généralement impures. Selon l'objectif recherché, on peut procéder à différentes opérations de purifica-tion afin d'éliminer les substances non protéiques contaminantes. Par exemple :

- la dialyse, ou l'électrodialyse, qui permettent

- l'élimination des petites molécules (sels, sucres simples, azote non protéique)
- la délipidation
- l'élimination des polyholosides non dialysables, des acides nucléiques, notamment par voie enzymatique.

Une purification très poussée permet d'obtenir des préparations parfois très pures en protéines, mais, outre les dénaturations éventuellement provoquées, on peut également penser que des préparations protéiques brutes rendent mieux compte des

différents complexes dans lesquels les protéines sont engagées et que des purifications poussées font perdre l'occasion d'observer ces protéines dans un état aussi proche que possible de l'état natif.

V. — FRACTIONNEMENT ANALYTIQUE DES PROTEINES

Il convient de distinguer ici la notion de pureté des préparations protéiques de la notion d'hétérogénéité. Les préparations isolées sont dites pures lorsqu'on a pu en éliminer toutes les substances non-protéiques. Mais généralement elles demeurent très hétérogènes car elles sont encore constituées d'un mélange d'espèces moléculaires différentes.

Toute étude plus poussée d'un tel groupe protéique (détermination du poids moléculaire, de la composition en acides aminés, des acides aminés terminaux) ne peut donc fournir que des résultats moyens et souvent peu significatifs. Sans s'attarder sur le cas de la biochimie fondamentale qui recherche une séparation totale et une analyse complète de chaque espèce moléculaire présente, le fractionnement des protéines est également une nécessité pour la recherche appliquée. La constitution protéique, c'est-à-dire la répartition et l'importance rela-

tive des différentes espèces moléculaires, peut en effet être reliée directement à certaines caractéristiques technologiques du matériel biologique étudié.

Parmi les méthodes les plus classiques de fractionnement des protéines, nous examinerons seulement les procédés suivants :

- la chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions, comme la CMcellulose ou la DEAEcellulose qui sépare les protéines suivant leur charge électrique ;
- la chromatographie d'exclusion sur colonne de gel de dextrane — séphadex — au cours de laquelle s'opère un tamisage moléculaire par taille ;
- l'électrophorèse en gel (amidon, gélose ou polyacrylamide), qui sépare les protéines suivant leur charge électrique au pH considéré, mais avec intervention du facteur taille moléculaire.

2° Partie

ETUDE D'UN CAS PARTICULIER : EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT ANALYTIQUES DES PROTEINES DE LA FARINE DE BLE

L'extraction des protéines de la farine de blé, en particulier, des protéines de graines de céréales, en général, pose des problèmes difficiles. Contrairement à celles rencontrées chez les tissus animaux ou chez les tissus végétaux à métabolisme actif, les protéines de graines de céréales se présentent dans un état natif presque anhydre, d'où la difficulté de les solubiliser convenablement sans les modifier.

Ainsi par exemple, si les protéines salino-solubles représentent 80 % des protéines totales chez le muscle, 100 % chez le sérum, 90 % chez la graine de soja, 97 % chez la graine d'arachide, le grain de blé n'en contient que 20 à 25 %. Le reste, corres-

pondant aux protéines de réserve, est habituellement qualifié d'« insoluble ». On conçoit donc les difficultés que présente l'étude de telles protéines.

Il se dégage actuellement deux tendances pour aborder ce problème. La première consiste à suivre dans ses grandes lignes la méthode proposée par OSBORNE, c'est-à-dire opérer un fractionnement au moment de l'extraction en utilisant différents solvants. Les partisans de la deuxième tendance recherchent par contre une mise en solution aussi simple que possible et n'attribuent de valeur qu'aux séparations chromatographiques ou électrophorétiques.

I. — EXTRACTION SELECTIVE DES PROTEINES DE LA FARINE DE BLE SUIVANT LE PROTOCOLE D'OSBORNE (1907) PRECISE PAR BOURDET ET FEILLET (1965)

Pendant de nombreuses années, nos connaissances sur les protéines de la farine de blé ont été fondées sur la méthode d'étude suggérée par OSBORNE (1907). Actuellement, ces travaux, bien que dépassés, servent de cadre à de nombreuses recherches dans ce domaine.

OSBORNE avait en effet fractionné ces protéines à partir des caractéristiques de solubilité et avait ainsi mis en évidence :

- une fraction ALBUMINE (leucosine) soluble dans l'eau et représentant 0,4 % du grain ;

- une fraction GLOBULINE (édestine) soluble dans les solutions de NaCl diluées mais insoluble dans l'eau (0,6 % du grain) ;
- une fraction PROLAMINE (gliadine) extraite par l'alcool à 70 % (4,5 % du grain) ;
- une fraction GLUTELINE (gluténine) dispersable dans les acides dilués ou les alcalis dilués (4 % du grain).

Mais ce protocole présente des inconvénients :

- les groupes protéiques ainsi définis interfèrent plus ou moins les uns sur les autres, en particu-

- lier à cause de l'hydrosolubilité de la gliadine ;
- les moindres variations dans les techniques d'extraction peuvent entraîner des écarts importants dans les proportions relatives des groupes protéiques ;
- à côté de ces 4 constituants, OSBORNE mentionnait la présence de protéoses, intermédiaires aux globulines et prolamines, mais dont l'identification était douteuse ;
- la fraction glutéline ne pouvait être solubilisée en totalité, de sorte que ce terme pouvait représenter soit le résidu après extraction des prolamines, soit la fraction dispersable de ce même résidu.

Faute de précision sur les conditions à utiliser, les compositions protéiques publiées selon ce protocole étaient sujettes à critique, de sorte que peu d'études significatives pouvaient être menées. C'est pourquoi, en 1965, BOURDET et FEILLET ont élaboré un protocole opératoire fixant avec précision les conditions optimales d'extraction et de fractionnement des protéines de la farine de blé améliorant ainsi le schéma proposé par OSBORNE (Fig. 1).

Insistons cependant sur le fait qu'il n'existe pas

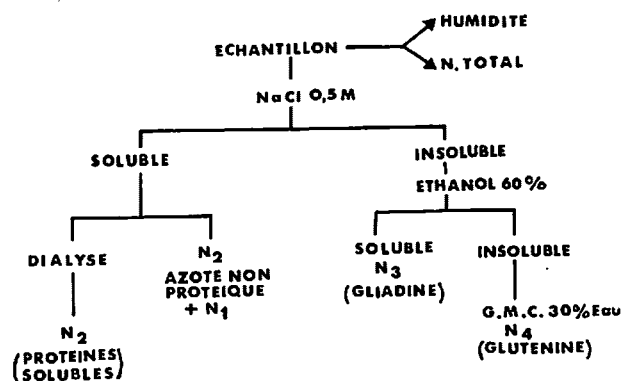


Fig. 1. — Schéma d'extraction des protéines de blé (d'après FEILLET, 1965).

de séquence de solvants permettant une séparation absolue des 4 groupes protéiques. Le protocole exposé ci-dessous, mis au point après des études systématiques, regroupe les conditions opératoires optimales.

A) GROUPE DES PROTEINES « SOLUBLES » (ALBUMINES ET GLOBULINES)

A cette étape, les difficultés proviennent de la solubilisation partielle des gliadines dans les solvants des albumines-globulines. Une étude systématique des différents facteurs de l'extraction : nature du sel, force ionique, pH, durée de l'extraction, a permis de découvrir les conditions d'extraction à la fois maximale des protéines « solubles » et minimale des gliadines :

« 10 g de farine sont mis en suspension dans 70 cc de solution NaCl 0,5 M amenés à pH 6,8 par du phosphate disodique (les ions PO_4^{3-} ayant la propriété d'insolubiliser les gliadines). Après un repos d'une heure au froid, on recueille le surnageant par centrifugation 15 mn à 3.000 g. Le culot est lavé 2 fois par 40 cc de NaCl 0,5 M et l'extrait total (surnageant et lavages) contient ainsi les albumines-globulines de la farine de blé, avec un minimum de gliadines, ainsi que « l'azote non protéique ».

Pour éliminer le sel ainsi que les petites molécules organiques, en particulier l'azote non protéique, on soumet l'extrait à une dialyse, dans des tubes de

viscose, à température aussi basse que possible et en présence d'un cristal de thymol, 2 jours contre l'eau courante et 2 jours contre l'eau distillée.

L'élimination du sel provoque la précipitation des protéines hydro-solubles (globulines). On sépare alors par centrifugation le précipité formé lequel, après lavage par l'eau, est lyophilisé. Le surnageant (albumines) est aussi lyophilisé tel quel.

Albumines et globulines peuvent aussi être séparées par tamisage moléculaire (colonne de Séphadex G 25) du fait de la plus forte rétention du NaCl par rapport aux protéines et élution obligatoire des globulines avec le front salin.

Les préparations protéiques lyophilisées ainsi obtenues ont des puretés différentes mais constantes au sein d'un même groupe. Si les albumines ne contiennent que 50 % de protéines, les globulines sont plus pures (85 %). Cependant, ces dernières ont subi une certaine dénaturation au cours de la dialyse et de la lyophilisation de sorte qu'il est impossible de les redissoudre en totalité. Ce phénomène limite considérablement leur étude qualitative.

B) GROUPE DES GLIADINES

Après extraction des protéines solubles, les gliadines sont solubilisées au cours d'un traitement par l'alcool dilué. Signalons que l'ordre inverse des opératoires ne doit pas être suivi, car l'éthanol n'opère pas une extraction sélective lorsqu'il est utilisé en premier lieu. L'élimination des protéines solubles est donc un préalable nécessaire à l'extraction des gliadines.

L'étude systématique des conditions opératoires (nature de l'alcool, titre de l'alcool, nombre d'extractions, système d'agitation...) a permis de vérifier 2 phénomènes : d'une part, la présence d'ions phos-

phatés provoque une insolubilisation de certaines gliadines, d'autre part, un traitement exhaustif donne un extrait trouble, ce qui est dû à un début de dispersion des gluténines.

Réalisant un compromis, le protocole choisi fait donc intervenir une première extraction par l'éthanol à 60 %, d'une durée de 2 heures, à l'aide d'un agitateur à secousses (Griffin), en présence de billes de verre, puis 2 lavages afin d'éliminer les ions PO_4^{3-} , et une 2^e extraction d'une heure, dans les mêmes conditions, au cours de laquelle une nouvelle fraction gliadine est solubilisée.

L'extrait obtenu ainsi contient la totalité des gliadines (les gluténines n'en contenant pas) et de très faibles quantités de gluténines (faible turbidité des

extraits). On le soumet à une dialyse, puis à une lyophilisation. Les préparations obtenues sont relativement pures en protéines (94 %).

C) GROUPE DES GLUTENINES

Compte tenu de l'action dénaturante exercée sur les protéines par les solutions alcalines, il a été recherché un solvant à pH acide, peu dénaturant et permettant une extraction quantitative. Après comparaison de l'acide acétique 0,01 N, du tampon lactate-propionate, de l'isopropanol lactique et de la monochlorhydrine du glycol (GMC), ce dernier solvant a été retenu.

L'extraction s'effectue donc avec la GMC à 30 % d'eau — pH 2,3 — selon les conditions retenues pour les gliadines, mais en supprimant les lavages entre les deux extractions. Il semble cependant que l'extraction ne soit quantitative que si l'agitation est réalisée à l'aide d'un appareil à grande vitesse, type « Ultra-Turrax ».

D) APPLICATIONS PRATIQUES DE CE PROCÉDE D'EXTRACTION SELECTIVE

Le protocole décrit ci-dessus conduit donc, uniquement à partir des caractéristiques de solubilité, à une extraction exhaustive et pratiquement sélective des protéines.

Contrairement à d'autres auteurs, BOURDET et FEILLET ont donc cherché à extraire avec le minimum de traitements la totalité des protéines répondant à des critères de solubilité définis et non pas d'isoler des protéines pures. C'est pourquoi les préparations protéiques obtenues à l'état brut, sans purification, contiennent des constituants non protéiques solubilisés dans les mêmes conditions.

Cette « impureté » des préparations ne constitue cependant pas un handicap pour certaines études (caractérisation des fractions par électrophorèse en gel d'amidon). Bien au contraire, l'étude des constituants non protéiques de ces préparations a permis d'émettre l'hypothèse d'une nature nucléoprotéique des globulines et des gluténines et d'une nature également lipidoprotéique des gluténines.

Ce protocole, tout en servant de base pour des travaux qualitatifs, rend possible, avant tout, l'étude quantitative des différentes fractions protéiques de la farine.

Il est alors permis de comparer objectivement les farines et de suivre, par exemple, l'influence des

caractères génétiques, agronomiques, technologiques ou physiologiques sur la base de la composition protéique. Ainsi, la Fig. 2 révèle la composition protéique des différents types de blés américains.

L'application de ce même protocole à d'autres produits de la mouture du blé a permis de mettre en évidence la composition protéique de chacune des principales régions histologiques du grain de blé (Fig. 3).



Fig. 2. — Composition protéique des principaux types de farines américaines (d'après BOURDET et FEILLET, 1967).

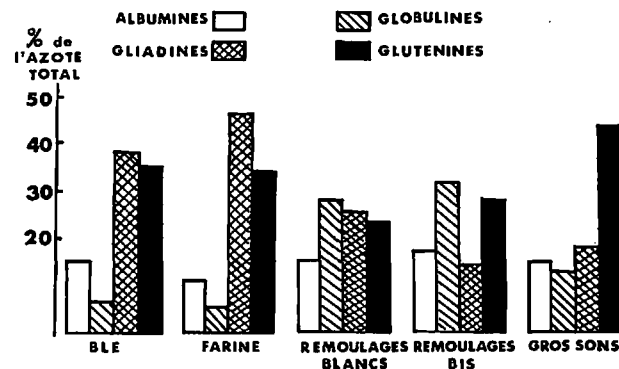


Fig. 3. — Composition protéique du blé CAPPELLE et des produits de sa mouture (d'après BOURDET).

Enfin, nous citerons la possibilité de découvrir des corrélations entre la proportion relative des fractions protéiques d'un blé et certaines de ses caractéristiques technologiques.

Ainsi, les travaux de BOURDET et FEILLET ont permis de préciser l'influence de la teneur en gluténine et du rapport gliadine/gluténine sur la valeur du W et de l'indice de sédimentation. GODON et PETIT (1967) ont également mis en évidence des corrélations entre la répartition des protéines au cours d'un fractionnement chromatographique et certaines caractéristiques rhéologiques comme le W. D'autres travaux visant à relier la valeur d'utilisation des blés à certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques, sont actuellement en cours.

II. — EXTRACTION GLOBALE DES PROTEINES DE LA FARINE DE BLE

Les partisans de cette tendance proposent de réaliser une extraction maximum des protéines avec 1 ou 2 solvants différents et de soumettre l'extrait global à la chromatographie ou à l'électrophorèse.

Ainsi, BAUDET et MOSSE (1963) solubilisent environ 37 % des protéines de la farine de blé en opérant 4 ou 5 extractions successives par l'eau. Plusieurs auteurs dont MOSSE et BAUDET (1964), et DESCHREIDER (1965), arrivent à solubiliser la moitié des protéines de la farine par l'eau en procédant à une extraction continue sur colonne de farine. Dans tous les cas, 2 groupes de constituants sont extraits successivement : dans le 1^{er}, les albumines dominent, dans le 2^e, ce sont les gliadines, la disso-

lution de cette 2^e fraction étant conditionnée à la fois par l'élimination des phosphates présents et par la disparition de l'acide phytique due à l'action de la phytase de la farine.

D'autres solvants ont été utilisés pour permettre une attraction exhaustive. Par exemple, COATES et SIMMONDS (1961) ont proposé la séquence pyrophosphate de sodium (dissolvant les globulines et une partie des albumines) - acide acétique 0,01 N (dissolvant les prolamines, le reste des albumines et une bonne partie des glutélines) permettant de solubiliser 80 à 85 % des protéines de la farine de blé.

III. — FRACTIONNEMENT ANALYTIQUE DES PROTEINES DE LA FARINE DE BLE

Ce fractionnement peut être appliqué soit à des extraits globaux de protéines, soit à des groupes

protéiques déjà isolés selon le procédé du type OSBORNE.

A) CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGES D'IONS

Dans ce type de chromatographie (sur colonne de CMcellulose ou de DEAEcellulose, le plus souvent), les protéines, dissoutes dans un tampon, sont déposées en haut de la colonne. Le pH doit être tel que les protéines soient fixées sur la résine (en milieu acide, il y a attraction entre les groupements NH_3^+ et les charges électronégatives de la colonne). On élue alors les protéines en faisant traverser la colonne par des solvants de pH ou de force ionique croissants.

La meilleure chromatographie jamais obtenue à partir des protéines de la farine a été réalisée par OH et GEHRKE (1965). 15 pics bien séparés sont obtenus à partir d'un extrait acétique de farine. BOURDET et FEILLET (1968) ont fractionné les albumines de farine en 10 pics environ, en éluant la colonne de DEAEcellulose par 6 solvants successifs (Fig. 4).

Cependant, bien que la mobilité électrophorétique des fractions ainsi obtenues varie dans le même sens que leur volume d'élution, il est exceptionnel d'obtenir uniquement par chromatographie, l'isolement d'une espèce moléculaire pure.

B) CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION (SEPHADEX)

Par suite d'un tamisage moléculaire, ce procédé permet une élution par ordre décroissant de taille. En fait, les paramètres du fractionnement sont plus nombreux car les gels de dextrane jouent aussi quelque peu le rôle d'échangeurs d'ions.

Parmi les principaux travaux concernant les pro-

téines de la farine de blé, on peut citer ceux de FEILLET (1965) qui sépare les albumines des globulines (Fig. 5), ceux de DESCHREIDER (1964) qui obtient 6 pics à partir d'un extrait aqueux de farine, ceux de WRIGHT (1964) et ceux de GODON et PETIT (1967) qui fractionnent les protéines du gluten en 4 groupes des constituants (Fig. 6).

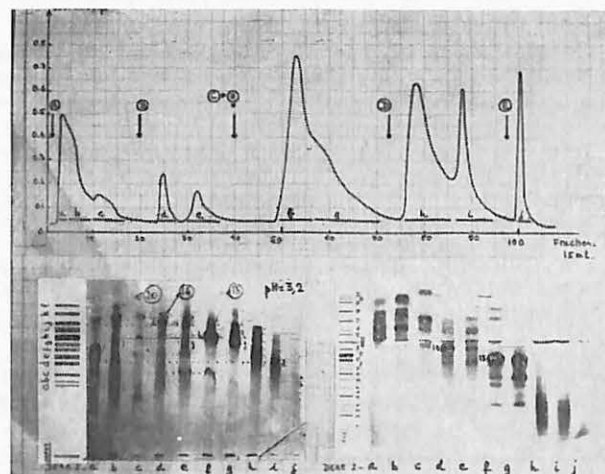


Fig. 4. — Fractionnement des albumines du blé par chromatographie sur DEAE cellulose et examen électrophorétique des pics obtenus (d'après FEILLET et BOURDET, 1968).

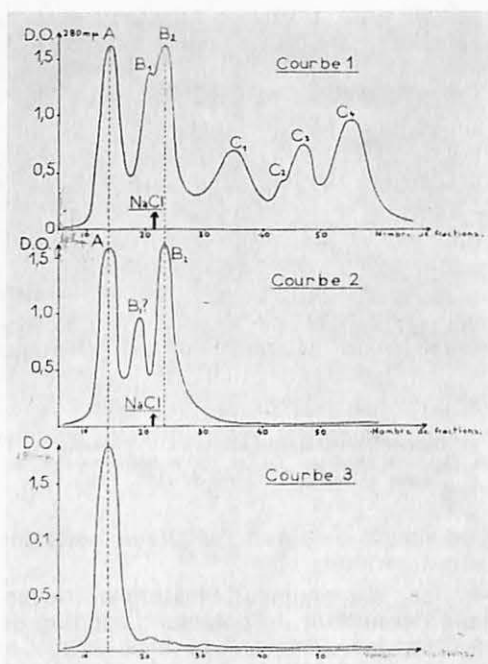


Fig. 5. — Séparation des albumines et des globulines par gel-filtration sur Sephadex G-25 (d'après FEILLET, 1965).

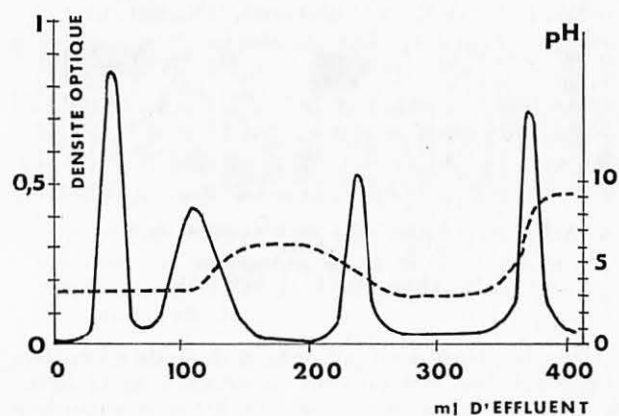


Fig. 6. — Diagramme d'éluion d'un extrait acétique de gluten sur Sephadex G-100 (d'après GODON et PETIT, 1967).

C) ELECTROPHORESE EN GEL

C'est la technique possédant actuellement le meilleur pouvoir séparateur. Elle représente le type de la méthode de fractionnement analytique, car il est vraisemblable — bien que cela n'ait pas encore été démontré — qu'il existe une relation biunivoque entre bande électrophorétique révélée par coloration et fraction protéique homogène.

Inventée en 1955 par SMITHIES, l'électrophorèse en gel d'amidoïn a été appliquée aux protéines du blé par de très nombreux auteurs à partir de 1959. Les conditions opératoires sont cependant relativement délicates d'autant plus que de très faibles différences dans les conditions de préparation et de coloration du gel peuvent modifier profondément la qualité des séparations.

La majorité des travaux utilisent le tampon lactate d'aluminium (pH 3,1) mis au point par JONES et al. (1959). Dans ces conditions, les albumines de la farine se séparent en une dizaine de constituants,

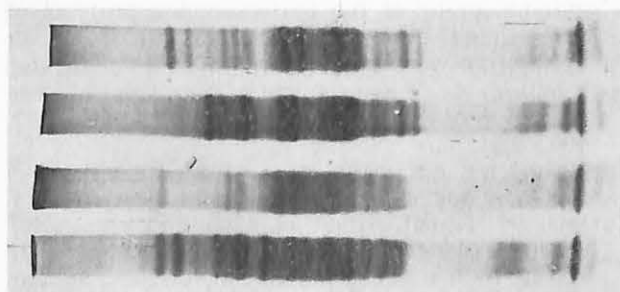


Fig. 7. — Fractionnement électrophorétique des gliadines en tampon lactate pH 3,2.

les globulines en 2 ou 3, les gliadines en 15-20 ; les gluténines ne migrent pas en raison de leur encombrement moléculaire (Fig. 7).

D'autres secteurs ont cependant employé des tampons différents. ABBOT (1964) utilise le tampon cacodylate à pH 6,2 tandis que BOURDET et FEILLET préfèrent le tampon TRIS-borate à pH 8,9 dans lequel les protéines du gluten ne migrent pas et où les albumines-globulines se résolvent en une vingtaine de constituants (Fig. 8). Il n'a cependant pas été possible d'identifier la position exacte des globulines à cause des difficultés de remise en solution de cette fraction à ce pH.

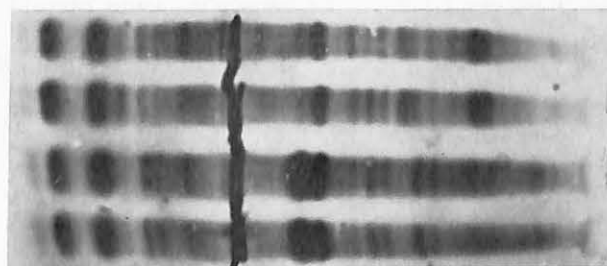


Fig. 8. — Fractionnement électrophorétique des albumines en tampon TRIS pH 8,9.

Des séparations ont été aussi réalisées dans d'autres milieux tels que la gélose ou le polyacrylamide. Ce dernier gel, développé depuis 1963, est d'une préparation moins délicate et donne des séparations plus fines, généralement.

La Fig. 9 compare d'ailleurs les résultats obtenus en gel d'amidon et en gel de polyacrylamide pour une même globuline de farine.



Fig. 9. — Electrophorèse d'une globuline de farine.
a : en gel d'amidon
b : en gel de polyacrylamide
(d'après AUTRAN et BOURDET).

L'électrophorèse en gel permet donc de démontrer l'hétérogénéité des groupes protéiques de la farine de blé, mais aussi de classer ces groupes selon leur mobilité électrophorétique moyenne. Habituellement, les gliadines sont des protéines « lentes », les albumines sont « moyennes », les globulines contiendraient une fraction très rapide et une fraction moyenne, tandis que les glutélines ne migrent pas (Fig. 10). C'est d'ailleurs par ce procédé que BOURDET et FEILLET ont pu préciser les conditions optimales du fractionnement des protéines selon le schéma d'OSBORNE.

Par ailleurs, l'hétérogénéité de ces protéines semble liée aux caractéristiques génétiques des blés :

CONCLUSION

— Il apparaît que si les définitions d'OSBORNE ne constituent pas un critère absolu de différenciation des groupes protéiques, elles restent cependant à la base de nombreux travaux. Un fractionnement préliminaire fondé sur les caractéristiques de solubilité facilite en effet l'étude des protéines de céréales.

— Il faut éviter d'identifier les albumines et globulines de céréales aux albumines et globulines classiques de sérum, car malgré leur appellation commune, ces protéines se différencient totalement sur plusieurs points et en particulier leurs proprié-

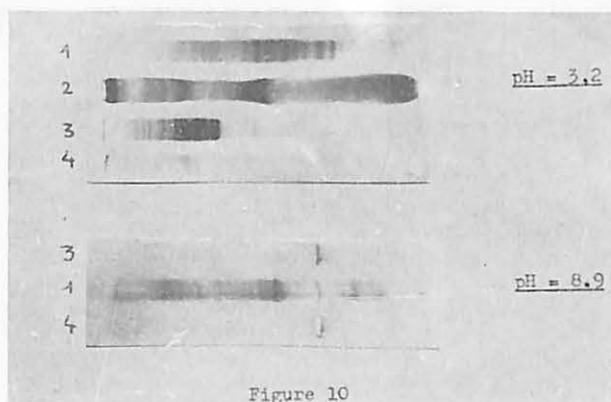


Figure 10

Fig. 10. — Comportement électrophorétique des albumines (1), des globulines (2), des gliadines (3) et de la glutéline (4) en milieu acide et basique (d'après FEILLET, 1965).

Celle des albumines serait spécifique, celle des gliadines serait variétale.

Ainsi, les diagrammes électrophorétiques des albumines permettent de détecter l'addition de blés tendres dans des semoules de blés durs. Des travaux importants sont également en cours dans le but d'identifier les variétés de blés à partir du fractionnement électrophorétique des gliadines.

Ces résultats fondamentaux laissent entrevoir les possibilités immenses offertes par le fractionnement des protéines, notamment au niveau de la sélection et de l'identification des variétés de blé.

tés de solubilité.

— Les techniques que nous avons décrites intéressent d'une part la biochimie fondamentale, mais aussi, et surtout, la recherche appliquée car les notions de solubilité et de fractionnement des protéines, reliées à la qualité des produits, sont susceptibles d'aider à la fois le généticien dans la création et l'identification de variétés nouvelles, l'agronome dans la recherche des conditions optimales de culture et le technologue dans l'amélioration des méthodes de transformation ou de conservation des produits.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOT D.C., 1964. Water soluble proteins of wheat flours. Dis. Abstr., 25, 1527.
- AUTRAN J.C. et BOUDET A. A paraître.
- BAUDET J. et MOSSE J., 1962. Extraction par l'eau des protéines de la farine de blé. Ann. Physiol. Vég. 4, 315-331.
- BOURDET A. Résultats non publiés.
- BOURDET A. et FEILLET P., 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 10, 1273-1283.
- BOURDET A. et FEILLET P., 1967. Distribution of phosphorus compounds in the protein fraction of various types of wheat flours. Cereal chem., 44, 5, 457-482.
- COATES J.H. et SIMMONDS D.H., 1961. Proteins of wheat and flour. Extraction, fractionation and chromatography of the buffer soluble proteins of flour. Cereal Chem., 38, 256-272.
- DESCHREIDER A.R., 1964. Contribution à l'étude des protéines de froment solubles dans l'eau et dans l'alcool propylique, Industr. aliment., agric., 81, 1083-1091.
- DESCHREIDER A.R., 1965. Considération sur l'extraction continue des protéines de la farine de blé. Industr. aliment. agric., 82, 1265.
- FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines de blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. Ann. Technol. agric., 14, hors-série 1, 1-94.

- FEILLET P. et BOURDET A., 1968. Les protéines solubles du blé. Fractionnement des albumines par chromatographie et par électrophorèse. *Ann. Technol. agric.*, 17, 4, 267-276.
- GODON B., RICHARD H. et PETIT L., 1967. Etude des protéines du gluten par dispersion dans l'acide acétique et chromatographie sur gel de dextrane. *Industr. aliment. agric.*, 84, 9.
- GODON B. et PETIT L., 1967. Action des ultra-sons sur les propriétés physico-chimiques du gluten. *Ann. Technol. agric.*, 16, 3, 205-216.
- JONES R.W., TAYLOR N.W. et SENTI F.R., 1959. Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch. Biophys. Biochem.*, 84, 363.
- MOSSE J., 1968. Les protéines des céréales, in *Actualités Scientifiques*, Hermann.
- MOSSE J. et BAUDET J., 1964. Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. vég.*, 6, 285.
- OH Y.H. et GEHRKE C.W., 1965. Stepwise elution chromatographic isolation on CMC of proteins from wheat albumins and globulins. *Analyt. Biochem.*, 10, 148.
- OSBORNE T.B., 1907. The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institution of Washington. Pub. n° 84.
- SMITHIES O., 1955. *Biochem. J.* 61, 629, 641.
- WRIGHT W.B., BROWN P.J. et BELL A.V., 1964. A method for fractionation of flour proteins by means of gel filtration on Sephadex G-100. *J. Sci. Fd. Agric.*, 15, 56.
-