

S Y M P O S I U M F R A N C O - S O V I E T I Q U E

21-22-23 Novembre 1972

LENINGRAD

" Génétique des protéines du blé en liaison avec le
problème de la qualité du grain. "

Peut-on identifier avec certitude les variétés de blés cultivées
d'après le diagramme électrophorétique de certaines protéines ?

par J.C. AUTRAN et A. BOURDET

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés.
16 rue Nicolas-Fortin, PARIS 13° - FRANCE

S Y M P O S I U M F R A N C O - S O V I E T I Q U E

21-22-23 Novembre 1972

LENINGRAD

" Génétique des protéines du blé en liaison avec le
problème de la qualité du grain."

Peut-on identifier avec certitude les variétés de blé cultivées d'après
le diagramme électrophorétique de certaines protéines ?

par J.C. AUTRAN et A. BOURDET

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Recherche sur la qualité des Blés.
16 rue Nicolas Fortin, PARIS 13e - FRANCE

Peut-on identifier avec certitude les variétés de blé cultivées d'après le diagramme électrophorétique de certaines protéines ?

.....

par A. BOURDET et J.C. AUTRAN

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Recherche sur la Qualité des Blés
16 rue Nicolas Fortin - Paris 13e - FRANCE.

.....

Il y a actuellement plus d'une décennie que différents travaux notamment ceux des écoles australienne, anglaise et américaine, ont tenté de différencier les blés au niveau des variétés ou des espèces par l'intermédiaire de la constitution de certaines protéines.

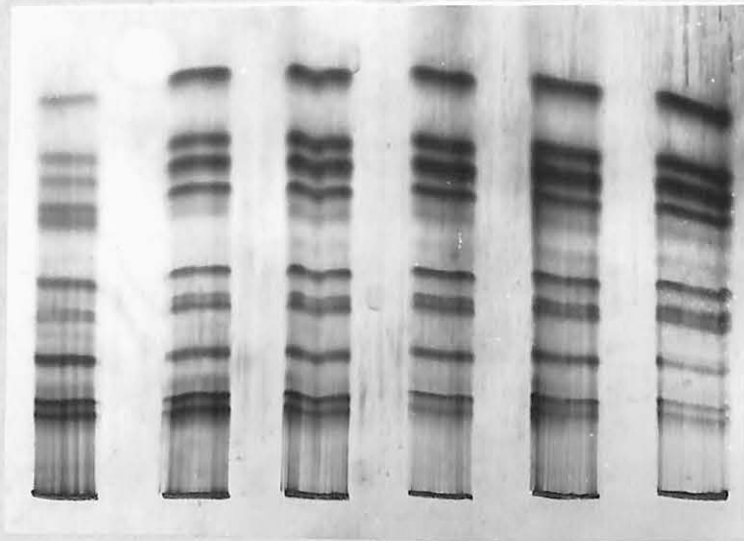
Dès 1963, nous signalons nous-mêmes les possibilités intéressantes offertes de ce point de vue par le fractionnement électrophorétique des gliadines (BOURDET et al, 1963). Parmi les différents auteurs qui, depuis se sont employés à développer ce type d'étude, aucun à ce jour n'est parvenu à des conclusions vraiment exploitables, la qualité des résolutions électrophorétiques et l'interprétation des diagrammes obtenus constituant l'obstacle principal.

En France, et depuis plusieurs années, les producteurs et les industries de transformation des blés attribuent une importance croissante au facteur variétal qu'ils considèrent comme seul critère susceptible de garantir un niveau donné de qualité. Pouvoir identifier de façon simple, rapide et significative les principales variétés cultivées aiderait en effet grandement au classement qualitatif des récoltes et à l'approvisionnement des industries de la meunerie et de la semoulerie en qualités de blé définies.

Le présent exposé a donc pour objet de rapporter les différentes tentatives réalisées dans le cadre de notre laboratoire pour apporter d'éventuelles solutions au problème posé.

L'ensemble de notre expérimentation a porté sur deux types de protéines : les histones et les prolamines, et a utilisé dans chaque cas les principes du fractionnement électrophorétique en milieu acide.

L'étude des histones auxquelles on attribuait encore il y a quelques années (VENDRELY et VENDRELY, 1966), une certaine spécificité biologique tant chez les animaux que chez les végétaux, s'est révélée particulièrement décevante dans le cas particulier du blé, et plus spécifiquement du matériel nucléoprotéique isolé du germe. Non seulement les techniques à mettre en oeuvre sont longues, délicates et laborieuses, mais elles aboutissent à constater, comme le montre la figure I que la constitution



électrophorétique des histones, fractionnées en gel de polyacrylamide à Ph 3,2 selon le procédé de PANYIM et CHALKLEY (1969), demeure remarquablement constante quel que soit le type de blé considéré.

Fig. I : Diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide des histones de 6 variétés de blé.

L'étude de la fraction prolamine des protéines du grain s'est révélée plus prometteuse, et les travaux rapportés ici concernant son fractionnement électrophorétique en gel d'amidon, support offrant un pouvoir de résolution élevé.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- Extration directe à partir du grain de blé broyé d'une fraction contenant la totalité des gliadines, au moyen de glycol monochlorhydrine à 25 % dans l'eau.

- Fractionnement électrophorétique en gel d'amidon, tampon lactate d'Al., urée 0,5 M, pH 3,2 et coloration des protéines par la nigrosine, ce qui permet d'obtenir en 4h30 une migration de l'ordre de 15 cm pour les gliadines et de révéler de I6 à 2I composants selon les variétés.

Dans la mesure où les opérations sont effectuées soigneusement, en particulier au niveau de la coloration des bandes, les diagrammes sont très reproductibles sur le plan qualitatif avec seulement de légères fluctuations au plan quantitatif. Il est alors possible d'effectuer des mesures significatives de concentration relative des composants par densitométrie des diagrammes et, sous réserve d'un minimum de répétitions d'établir pour chaque variété un diagramme type moyen rendant compte à la fois de la mobilité et de la concentration relatives des différents composants.

A partir des diagrammes types de chacune des variétés étudiées, nous avons tenté d'interpréter les résultats et d'aboutir à une différenciation significative des divers échantillons.

Sur le plan qualitatif, la présence chez une variété d'un composant de mobilité donnée et son absence chez une autre, ne présente pas de difficulté majeure de différenciation. Sur le plan quantitatif, on a utilisé une représentation schématique quantifiée des diagrammes types, en s'inspirant des travaux de DEDIO et Al. (1969), ce qu'illustre le tableau I : selon la concentration relative du composant on lui attribue l'indice +++, ++, + ou tr. (traces).

On considère alors que la différence de concentration d'un échantillon à l'autre est significative lorsque les écarts observés sont au moins de 2 unités soit par exemple 0 et +, ou tr et ++, ou + et +++.

avec échelle

Interprétation du diagramme électrophorétique des gliadines

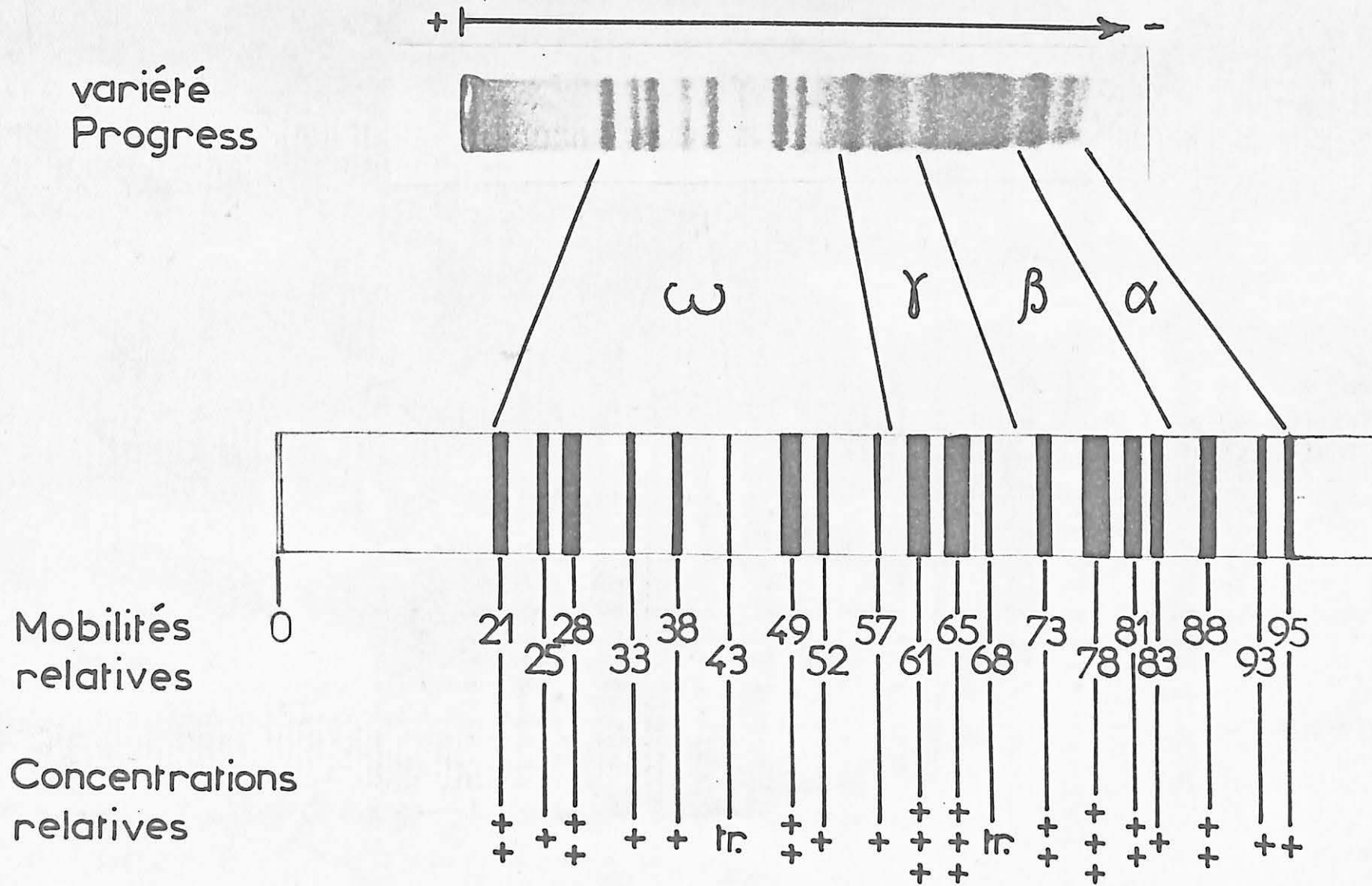


Tableau 1

Schéma comparatif des diagrammes-types moyens

ω - gliadines

de blés durs et de blés tendres

Mobilité relative	22	26	30	34	37	39	44	47	49	51	54	57	
T.aestivum (moyenne de 30 variétés)	+	++	+	+	tr.	+	+	++	++	tr.	+	+	
T. durum (moyenne de 15 variétés)	0	0	0	++	tr.	++	+	tr.	+	+	+++	++	

Tableau 2

Schémas comparatifs des diagrammes-types ω -gliadines de

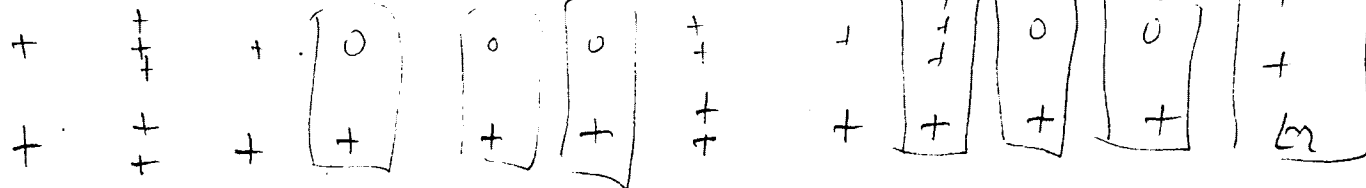
4 variétés de blé : 2 T. aestivum et 2 T. durum.

Mobilité relative		22	26	30	34	37	39	44	47	49	51	54	57
Blés tendres	Cappelle	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+
	Rex	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+
Blés durs	Lakota	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+
	Oued Zénati	0	0	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+

Tableau 3

Rex

Aronde



Le tableau I montre également que du seul point de vue de la mobilité, on peut répartir les bandes en 4 groupes et les assimiler à chacun des types α , β , γ et oméga - gliadines de la nomenclature proposée par WOYCHIK en 1961. L'un des constituants γ -gliadine, présent dans tous les diagrammes examinés jusqu'ici a été choisi comme référence pour le calcul des mobilités de toutes les autres bandes observées.

La figure 2 illustre les diagrammes gliadines obtenus à partir de 8 variétés de blé tendre actuellement cultivées en France.

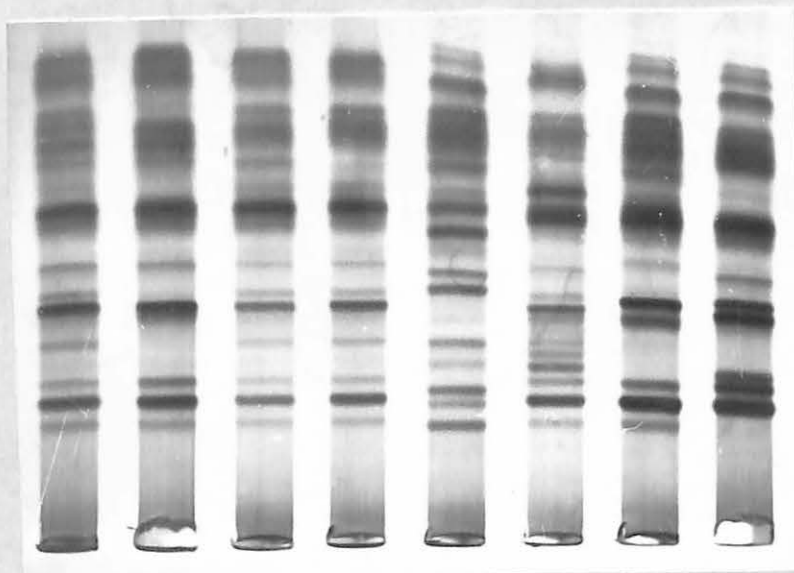


Fig 2: Diagrammes électrophorétiques en gel d'amidon de 8 variétés de blé tendres : de gauche à droite :
Joss, Champlein, Cappelle, Capitole, Progress, Aronde, Rex, Alys.

Une première tentative de différenciation intervariétale, fondée sur l'importance relative des 4 groupes gliadines, s'est révélée insuffisamment significative et n'a pas confirmé les résultats de CLUSKEY (1961) relatifs aux blés américains. Par contre, en se fondant uniquement sur la constitution du groupe des oméga-gliadines (de mobilité inférieure à 0,60), au sein duquel les différences variétales sont particulièrement nettes, certaines possibilités de différenciation apparaissent.

On peut, par exemple, selon le mode d'interprétation préconisé, fournir une première approximation des différences majeures de constitution protéique existant entre les 2 espèces : *T. aestivum* et *T. durum*. La figure 3 qui présente les diagrammes de 7 variétés de blé dur comparativement à 1 de blé tendre illustre ces possibilités de différenciation (présence des 3 bandes les plus lentes chez *T. aestivum* et absence chez *T. durum*).

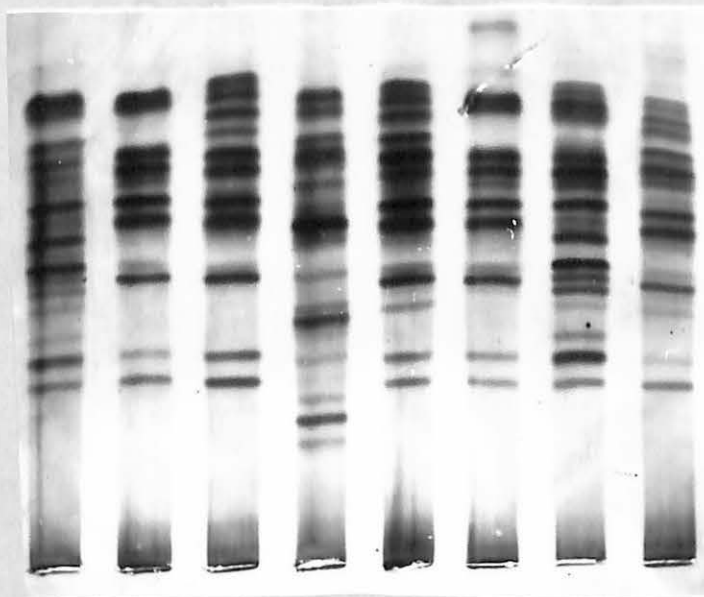


Fig.3 : Diagrammes électrophorétiques des gliadines de 1 variété de blé tendre et de 7 de blé dur : de gauche à droite : Lez, Semouler, Oued-zénati, Cappelle(*T. aestivum* témoin), Bidi I7, Agathe, Lakota, Montferrier.

La valeur significative de cette particularité a été exprimée (tableau 2) en comparant les diagrammes moyens qualitatifs ^{et quantitatifs} établis à partir de 30 variétés de blé tendre, d'une part et de 15 variétés de blé dur d'autre part

Dans la limite de ces observations, on note, chez les blés durs, l'absence constante des bandes 0,22 - 0,26 - 0,30 et la prépondérance quantitative de la bande 0,54 alors que chez les blés tendres, les 3 premières bandes sont constamment présentes et la bande 0,47 reste prédominante.

Au niveau variétal, des différences significatives peuvent également être mises en évidence comme l'illustrent (tableau 3) les diagrammes relatifs à 2 variétés de blé tendre et 2 de blé dur. C'est ainsi que Rex et Cappelle (T. aestivum) sont différenciés au niveau des bandes 0,34 - 0,39 - 0,49 - 0,54 alors que Lakota et Oued Zénati (T. durum) présentent des différences significatives au niveau des composants 0,34 - 0,44 - 0,49 - 0,51.

Par ailleurs le calcul des indices de similarité selon DEDIO et al. (1969) entre les diagrammes oméga-gliadines permet d'exprimer de façon quantifiée et plus significative, l'importance des différences au niveau variétal.

Ainsi, pour les blés tendres (tableau 4), on constate que les variétés issues de géniteurs très voisins ont des diagrammes très proches ne permettant pas bien de les différencier. Par exemple, les indices de similarité sont respectivement de 100 entre les diagrammes de Cappelle et Capitole et de 92 entre ceux de Capitole et Moisson. En revanche, la différenciation entre variétés semble apparaître d'autant plus nettement que le patrimoine génétique au niveau variétal est lui-même plus différencié : l'indice de similarité est ainsi de 33 seulement entre les diagrammes de Progress et Atys et de 42 entre ceux de Rex et Aronde.

Une grande similarité des diagrammes s'observe principalement pour bon nombre de variétés françaises issues de géniteurs voisins. Ces considérations rejoignent celles formulées par l'agronome russe FLAKSBERGER (1935) sur la base de caractères uniquement agronomiques, notamment la distinction d'un écotype "gallicum" au sein de l'espèce T. aestivum. Dès 1951, JONARD soulignait que cette convergence n'est pas

due à une action sélective du milieu mais essentiellement à l'emploi répété des mêmes géniteurs par les sélectionneurs français. Cette relative homogénéité des blés français, qui apparaît au niveau des diagrammes de leurs gliadines, constitue un obstacle à la bonne différenciation biochimique de certaines variétés.

Inversement, lorsque la sélection française a fait appel à des géniteurs nouveaux, et c'est le cas notamment des variétés de printemps Rex, Aronde, Progress et Atys, on observe une plus grande différenciation électrophorétique.

Il est par ailleurs utile de noter que certaines variétés électrophorétiquement similaires peuvent manifester des aptitudes technologiques très différentes : tableau 5. C'est ce qu'indiquent les critères de qualité suivants (W, indice ZELENY, volume de pain) relatifs à 8 variétés de blés tendres génétiquement très voisins (Cappelle, Capitole, Joss, Moisson, Ouest, Rémois, Splendeur, Wimax). S'il est certain qu'au niveau variétal les diagrammes gliadines traduisent des particularités génétiques, il est donc peu probable qu'ils soient l'expression de la valeur technologique des variétés de blés tendres.

Des observations similaires ressortent au niveau de l'espèce T.durum : l'indice de similarité est ainsi de 100 entre les diagrammes des variétés Wells et Lakota, mais de 58 seulement entre ceux de Wells et Semoulor (tableau 6). On notera toutefois que pour cette espèce, la différenciation intervariétale est plus délicate du fait que le nombre de bandes de la région explorée est plus limité.

Les diagrammes obtenus au niveau des oméga-gliadines semblent donc bien exprimer des caractéristiques variétales, mais seulement dans la mesure où les variétés considérées sont elles-mêmes issues de géniteurs suffisamment éloignés génétiquement. En conséquence, sur la base des similarités ou des dissemblances d'ordre quantitatif ou qualitatif précédemment rapportées, l'identification proprement dite de la variété apparaît généralement possible au moyen d'un tableau analytique fondé sur les caractéristiques les plus essentielles des diagrammes. C'est ce qu'exprime le tableau 7 limité, à titre d'exemple, à 9 variétés de blé tendre.

Aronde	Alys	Cappelle	Capitole	Champlein	Etoile de Choisy	Florence Aurore	Moisson	Progress	Rex	
100	50	83	75	67	92	75	75	42	42	ARONDE
	100	67	75	67	67	83	67	33	50	ATYS
		100	100	92	100	92	100	58	67	CAPPELLE
			100	83	100	92	92	58	58	CAPITOLE
				100	75	58	92	33	75	CHAMPLEIN
					100	92	92	67	75	ETOILE DE CHOISY
						100	75	42	67	FLORENCE AURORE
							100	50	67	MOISSON
								100	42	PROGRESS
									100	REX

INDICES DE SIMILARITE ENTRE DIAGRAMMES DE BLESTENDRES

Aptitudes technologiques de 8 variétés de blés tendres
d'origines génétiques voisines

Variétés	Joss	Cappelle	Splendeur	Wimax	Rémois	Ouest	Capitole	Moisson
W	80	140	100	215	125	150	200	200
Indice Zeleny	24	30	30	43	32	26	36	36
Volume du pain	580	675	675	700	750	775	800	825

Tableau 5

Agathe	Bidi 17	Chili	Kype - runda	Lakota	Lez	Mont-ferrier	Oued Zénati	Semoulor	Wells	
100	92	75	75	75	67	75	100	100	67	AGATHE
	100	83	83	83	75	92	92	92	75	BIDI 17
		100	100	100	100	92	75	75	100	CHILI
			100	100	100	92	75	75	100	KYPERUNDA
				100	100	92	67	67	100	LAKOTA
					100	83	67	67	100	LEZ
						100	83	83	83	MONTFERRIER
							100	100	58	OUED ZENATI
								100	58	SEMOULOR
									100	WELLS

INDICES DE SIMILARITE ENTRE DIAGRAMMES DE BLES DURS

Tableau 6

TABLEAU ANALYTIQUE D'IDENTIFICATION DES VARIETES

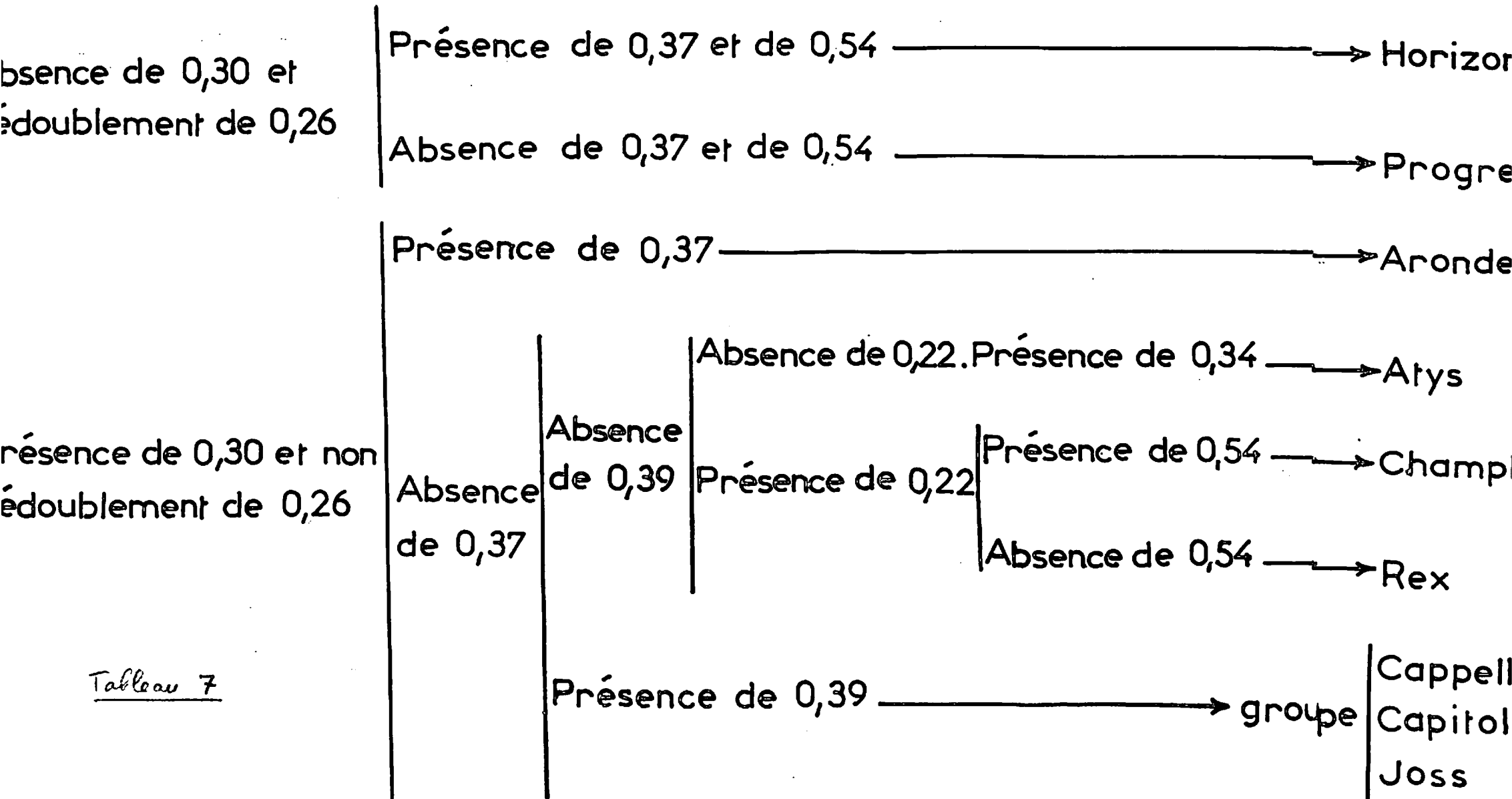


Tableau 7

Une telle analyse dichotomique permettrait dès à présent de préciser, soit l'identité de la variété inconnue, soit seulement le groupe électrophorétique auquel elle s'apparente. Les données ainsi acquises pourraient, dans l'avenir, ouvrir des perspectives nouvelles sur le plan d'une véritable chimiotaxinomie des variétés de blés.

Dans l'état actuel des choses, il apparaît donc possible d'identifier une variété de blé inconnue à condition :

- que le matériel d'étude soit issu de lignées parentales suffisamment différenciées entre elles génétiquement.
- que les opérations d'électrophorèse, de coloration et de densitométrie soient particulièrement soignées.
- que l'on procède à un minimum de répétitions pour un même échantillon et qu'une variété témoin connue soit incorporée à chaque série d'expériences.
- enfin, que les lots testés ne soient pas des mélanges de variétés.

De toute façon, si pour l'instant un tel moyen d'identification n'apparaît pas particulièrement rapide, il présente au moins, par rapport à certaines techniques, un caractère de spécificité incontestable.

Toutefois, le support d'amidon apparaît mal adapté à des conditions d'utilisation pratiques. Aussi, avant d'envisager la vulgarisation de la méthode, il semble indispensable de l'adapter aux impératifs des utilisateurs en trouvant des supports de préparation et de manipulation plus aisées, sous réserve qu'ils permettent une résolution du même ordre. C'est actuellement le but des travaux que nous poursuivons. La figure 4 donne ainsi un exemple de la résolution obtenue pour les gliadines en gel de polyacrylamide, tampon lactate d'Al.

.. / ..

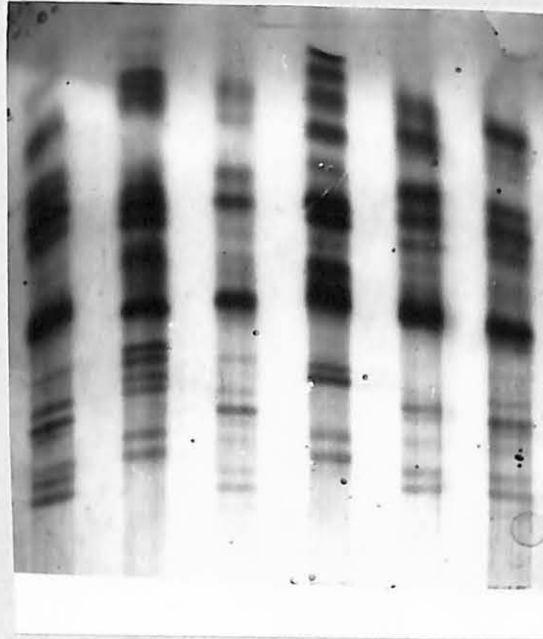


Fig. 4 : Exemple de fractionnement des gliadines (en gel de polyacrylamide tampon lactate, pH 3,2) de 6 variétés de blé

Une telle méthode de caractérisation biochimique des variétés constituerait un outil particulièrement utile, non seulement dans les programmes de sélection mais dans les recherches plus fondamentales de biochimie génétique, en particulier dans le cas des blés tendres, quant aux relations éventuelles entre certains composants et le génôme D.

Une telle étude au niveau des progéniteurs ne saurait toutefois négliger une connaissance plus précise des variabilités de constitution au niveau variétal : la figure 5 montre ainsi les différences dans les diagrammes gliadines entre plusieurs *Aegilops squarrosa*.

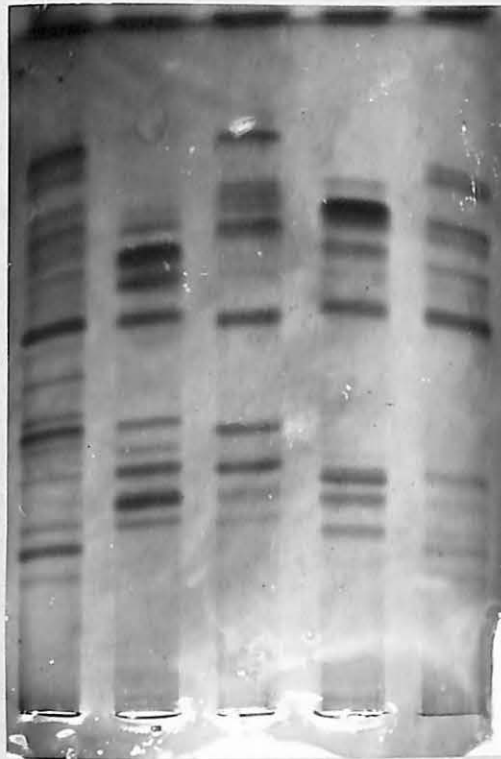


Fig 5 : Variabilité de constitution de l'espèce *A. squarrosa*, comparativement à un *T. aestivum* (de gauche à droite : *T. aestivum* Joss, *A. squarrosa* : lignées 84A, 146, 179 et 232)

C'est pourquoi, en définitive, une telle étude poursuivant des buts essentiellement pratiques doit nécessairement s'appuyer sur une connaissance plus profonde des phénomènes fondamentaux.

Aussi souhaitons-nous que cet exposé puisse susciter une fructueuse discussion de la part des spécialistes avertis ici présents.

.....

REFERENCES

- BOURDET et al. 1963 C.R. Acad. Sci. Paris, 256, 21, 4517-4520
CLUSKEY et al. 1961 Cereal Chem: ,38, 352.
DEDIO et al. 1969 Can. J. Bot. 47, 1175-1180
FLAKSBERGER, 1935 Les blés. Monographie. Moscou-Léningrad
JONARD 1951 Les blés tendres cultivés en France Ed INRA Paris
PAYIM et CHALKLEY, 1969 Arch. Bioche. Biophys. 130, 1-2, 337-346
VENDRELY et VENDRELY 1966 Protoplasmatologia, 5, 3e, 1-88
WOYCHICK et al 1961. Arch. Biochem. Biophys. 94, 477-482.