

BIOCHIMIE. — *Nouvelles données permettant l'exploitation de l'hétérogénéité électrophorétique des gliadines du grain de blé en vue d'une identification variétale.*

Note (*) de MM. Jean-Claude Autran et Albert Bourdet ⁽¹⁾, présentée par M. Jean Roche.

L'hétérogénéité électrophorétique en gel d'amidon des gliadines de blé est une caractéristique variétale mais la complexité des diagrammes et les différences expérimentales rendent difficile leur exploitation en vue d'une identification des variétés. Un diagramme-type de chaque variété a alors été établi à partir de plusieurs répétitions, puis schématisé en exprimant les concentrations relatives de chaque composant par un nombre de croix. Cette méthodologie permet de vérifier objectivement la signification des différences variétales, de quantifier celles-ci au moyen d'un indice de similarité des diagrammes et d'établir un tableau de détermination chimiotaxonomique. On peut envisager en outre l'application du procédé à différentes recherches utilisant des données électrophorétiques ou chromatographiques notamment en biochimie génétique.

Il y a actuellement plus d'une décennie que plusieurs travaux d'origines américaine ⁽²⁾, anglaise ⁽³⁾, australienne ⁽⁴⁾ et française ⁽⁵⁾ ont tenté d'identifier les variétés de blés au moyen de la constitution électrophorétique de certaines protéines spécifiques et notamment des gliadines. Parmi les différents auteurs qui, depuis, ont cherché à se fonder sur cette seule caractérisation biochimique sans utiliser parallèlement des critères chimiques ou morphologiques, aucun n'est parvenu à des conclusions vraiment exploitables, la qualité des résolutions électrophorétiques et l'interprétation des diagrammes constituant les obstacles principaux.

La présente Note a donc pour objet de rapporter les récentes tentatives réalisées dans le cadre de notre laboratoire pour apporter d'éventuelles solutions au problème posé.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES. — 1. *Extraction et fractionnement des gliadines.* —

Les gliadines sont solubilisées directement et en totalité à partir du grain de blé broyé au moyen de glycol monochlorhydrine (GMC) à 25 % dans l'eau. Les protéines ainsi extraites sont fractionnées par électrophorèse en gel d'amidon (tampon lactate d'aluminium, urée 0,5 M, pH 3,2) selon la technique décrite par Feillet ⁽⁶⁾, mais modifiée en vue d'améliorer la résolution, notamment au niveau de la préparation des gels (chauffage à 80 °C) et de leur coloration (nigrosine 0,5 % en milieu trichloracétique 2 %). Dans ces conditions, la distance de migration des gliadines est de 15 cm environ en 4 h 30 et 16 à 21 composants sont révélés selon la variété. Les protéines de type albumine et globuline, solubilisées au cours de l'extraction directe des gliadines, ne perturbent absolument pas le fractionnement de ces dernières, du fait de leur mobilité plus élevée.

2. *Interprétation des diagrammes.* — Afin de s'assurer de la signification réelle des différences variétales observées — condition sine qua non de leur utilisation pratique pour caractériser les blés — nous avons eu recours aux voies d'approche complémentaires suivantes :

— Etablissement d'un diagramme-type gliadine (moyenne de plusieurs répétitions) rendant compte, pour chaque variété, de la mobilité des différents compo-

sants et de leur concentration relative obtenue par densitométrie des gels. Ce diagramme pourra concerner la totalité des composants ou seulement une partie d'entre eux tels que, par exemple, les α -, β -, γ - ou ω -gliadines définies selon Woychick et coll. (7).

— Schématisation du diagramme-type (*fig. 1*) en exprimant l'échelle des concentrations relatives par les symboles suivants : 0, traces, +, ++, ++++. Pour tenir compte des différences expérimentales et s'assurer d'une marge de sécurité suffisante, on convient alors qu'il n'y aura de différence significative entre deux variétés que si l'écart est d'au moins 2 unités pour un composant donné. Par exemple : 0 et +, tr. et ++, ou encore + et ++++.

— Quantification des analogies (ou des dissemblances) quantitatives et qualitatives entre les diagrammes pris deux à deux, au moyen d'un indice de similarité inspiré des travaux de Dedio et coll. (8) : pour chaque composant, on compte une valeur de 1 point d'indice s'il y a identité entre les deux diagrammes ou si la différence n'est pas significative, de 0 point si la différence est significative. L'indice absolu de similarité de deux diagrammes représente la somme des valeurs (1 ou 0) attribuées au niveau de chaque composant. Un indice relatif peut être calculé en rapportant l'indice absolu au nombre total de composants.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS. — On sait que l'hétérogénéité électrophorétique des gliadines constitue un caractère variétal et qu'en particulier, elle n'est pas influencée par les facteurs externes (lieu de culture, fertilisations, année) [(9), (10)]. La question est donc de pouvoir exploiter cette hétérogénéité en vue d'identifier significativement les différentes variétés de blé mises à la disposition de l'industrie.

Pour simplifier la présentation des résultats, nous nous sommes limités, dans le cadre de cette Note, à l'examen de la seule région des ω -gliadines. Celles-ci présentent d'ailleurs le double avantage d'une bonne résolution électrophorétique due au poids moléculaire élevé de leurs composants (11) et d'une grande diversité de constitution au niveau variétal (*fig. 2*). Il ressort également de l'examen d'environ 50 variétés de blé tendre qu'on peut pratiquement identifier, au sein de ces ω -gliadines, 12 composants différents dont les mobilités sont échelonnées entre 0,22 et 0,57 (le repère étant fourni par le composant γ_2 -gliadine, commun à toutes les variétés analysées, auquel on a convenu d'attribuer la mobilité 0,65). Nous avons également

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Planche I

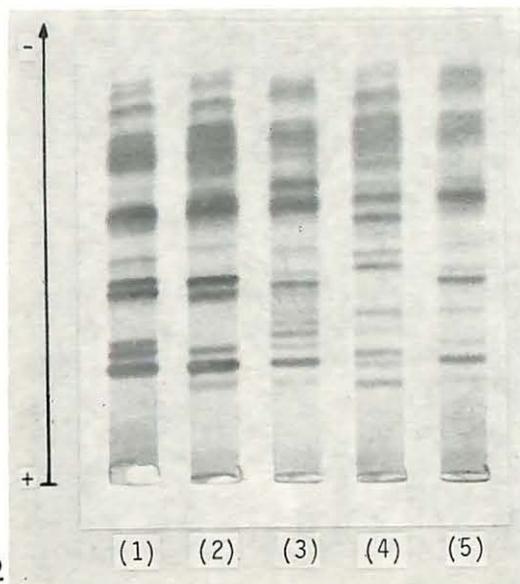
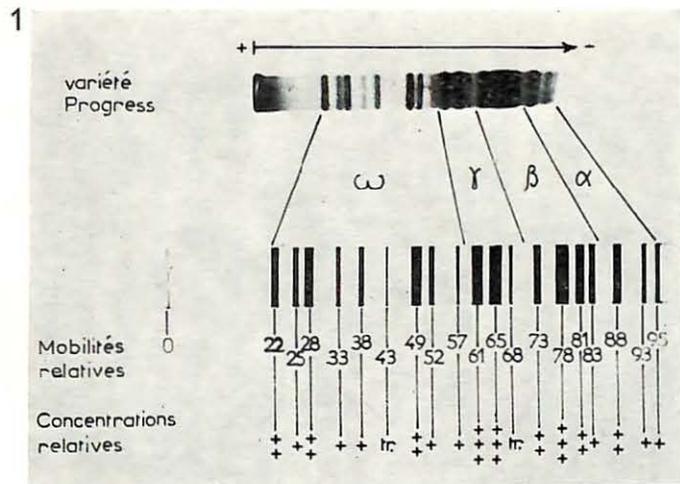
Fig. 1. — Exemple de schématisation du diagramme électrophorétique des gliadines.

Fig. 2. — Diagrammes électrophorétiques (gel d'amidon) des gliadines de 5 variétés de blé tendre, mettant en évidence la diversité de constitution des ω -gliadines. Variétés : 1. Atys ; 2. Rex ; 3. Aronde ; 4. Progress ; 5. Capitole.

Fig. 3. — Mise en évidence de différences significatives de constitution entre les diagrammes ω -gliadines.

Fig. 4. — Indices de similarité entre diagrammes de 6 variétés de blé tendre.

Fig. 5. — Exemple de tableau analytique d'identification des variétés.

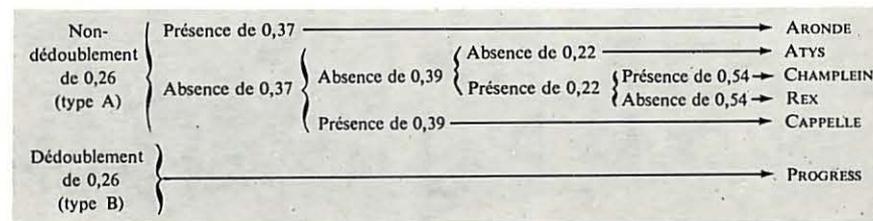


| Mobilité relative | 0,22 | 0,26 | 0,30 | 0,34 | 0,37 | 0,39 | 0,44 | 0,47 | 0,49 | 0,51 | 0,54 | 0,57 |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Cappelle | + | + | + | + | 0 | + | + | + | + | 0 | + | + |
| Rex..... | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 | 0 | + |
| Rex..... | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + | + | + | 0 | 0 | + |
| Aronde | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | tr. |

3

| Aronde | Atys | Cappelle | Champlein | Progress | Rex | |
|--------|------|----------|-----------|----------|------|-----------|
| 1 | 0,50 | 0,83 | 0,67 | 0,42 | 0,42 | Aronde |
| | 1 | 0,67 | 0,67 | 0,33 | 0,50 | Atys |
| | | 1 | 0,92 | 0,58 | 0,67 | Cappelle |
| | | | 1 | 0,33 | 0,75 | Champlein |
| | | | | 1 | 0,42 | Progress |
| | | | | | 1 | Rex |

4



classé les variétés en 2 catégories du fait que les ω -gliadines les plus lentes (mobilités 0,22 à 0,30) présentent nettement 2 types de constitution :

— soit un type A (cas des variétés françaises courantes : Cappelle, Champlein, Aronde, etc.) chez lequel on trouve 3 composants : 0,30 (+), 0,26 (++ ou ++++) et 0,22 (+, ou parfois 0 : Atys, Magdaléna, Florence-Aurore) ;

— soit un type B (cas de certaines variétés ayant des parents étrangers : Progress, Thatcher, Horizon, etc.) chez lequel nous constatons à la fois un dédoublement du composant 0,26 et la présence d'une bande de mobilité très légèrement inférieure à 0,22, de concentration généralement ++.

Dans ces conditions, l'établissement des diagrammes-types schématisés permet de comparer objectivement deux à deux les diagrammes des différentes variétés, comme le montre la figure 3. Selon la convention retenue, il apparaît, par exemple entre Cappelle et Rex, des différences significatives au niveau de 4 composants (0,34, 0,39, 0,49, 0,54). Si l'on considère Rex et Aronde, les différences portent sur 7 composants (0,34, 0,37, 0,39, 0,49, 0,51, 0,54, 0,57).

L'importance de ces différences variétales au sein d'un ensemble d'échantillons peut alors être quantifiée et exprimée sur un tableau d'indices relatifs de similarité. La figure 4 en donne l'exemple dans le cas de 6 variétés françaises. Cela permet de noter que certains blés présentent entre eux des indices faibles, donc des différences très marquées (cas de Aronde, Atys, Progress) tandis que d'autres apparaissent plus proches (cas de Cappelle et Champlein). L'explication est fournie par le fait que l'hétérogénéité électrophorétique des gliadines est un caractère génétique : plus les blés ont une parenté éloignée (exemple des blés de printemps Aronde, Atys, Progress, dont l'un des parents au moins est d'origine étrangère), plus les différences sont importantes. Inversement dans le cas de nombreux blés d'hiver courants, en raison de l'emploi répété des mêmes géniteurs par la sélection française, on observe une plus grande homogénéité des diagrammes.

Néanmoins, l'exploitation des différences variétales significatives mises en évidence chez les seules ω -gliadines permet de construire un tableau de détermination chimiotaxonomique. La figure 5 en donne un exemple limité ici volontairement aux données qualitatives (présence ou absence d'un composant) et à 6 variétés françaises. En tenant compte des données quantitatives (de 0 à ++++) et en étendant l'analyse à l'ensemble des bandes, il devient possible de classer un très grand nombre de diagrammes. L'ensemble de la méthodologie exposée semble donc permettre, en pratique, d'identifier la variété qui constitue un lot de blé inconnu.

Sur les autres critères d'identification variétale (¹²), l'hétérogénéité des gliadines présente donc l'avantage d'une grande spécificité, d'une relative rapidité et d'une totale indépendance à l'égard des facteurs externes. Cependant, l'électrophorèse en gel d'amidon reste une méthode de recherches et ne saurait donc être utilisée efficacement au niveau du simple laboratoire de contrôle. Il conviendrait donc, en vue d'une meilleure vulgarisation, de transposer la technique, sans perte de résolution, à des supports d'électrophorèse plus maniables, tels que des supports

commerciaux d'acrylamide ou d'acrylamide-agarose. C'est ce que nous étudions actuellement.

CONCLUSION. — L'application de la méthode décrite à la reconnaissance des variétés de blé devrait permettre, sur le plan pratique, un meilleur contrôle des matières premières et en conséquence favoriser l'approvisionnement de l'industrie en lots de qualité mieux définie.

Au plan de la recherche fondamentale et notamment en biochimie génétique, la méthodologie proposée devrait se révéler utile dans les cas où l'interprétation d'expériences chromatographiques ou électrophorétiques s'avère délicate. Nous pensons en particulier aux nouvelles études concernant la phylogénie, la taxonomie, la recherche d'homologies entre lignées et faisant appel aux caractères spécifiques mais complexes des protéines qui imposent une interprétation rationnelle des résultats obtenus.

(*) Séance du 1^{er} octobre 1973.

(1) Avec la collaboration technique de M^{lle} Ginette Gobin.

(2) G. A. H. ELTON et J. A. D. EWART, *J. Sc. Fd. Agric.*, 13, 1, 1962, p. 62-72.

(3) C. B. COULSON et A. K. SIM, *Biochem. J.*, 80, 1961, p. 46-47.

(4) J. W. LEE et C. W. WRIGLEY, *Aust. J. Exptl. Agr. Animal Husbandry*, 3, 9, 1963, p. 85-88.

(5) A. BOURDET, P. FEILLET et F. METTAVANT, *Comptes rendus*, 256, 1963, p. 4517-4520.

(6) P. FEILLET, *Ann. Technol. agric.*, 14, HS 1, 1965, p. 1-94.

(7) J. H. WOYCHICK, J. A. BOUNDY et R. J. DIMLER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 1961, p. 477-482.

(8) W. DEDIO, P. J. KALTSIKES et E. N. LARTER, *Can. J. Bot.*, 47, 1969, p. 1175-1180.

(9) P. FEILLET et A. BOURDET, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49, 10, 1967, p. 1273-1283.

(10) G. J. DOEKES, *J. Sc. Fd. Agric.*, 19, 3, 1968, p. 169-179.

(11) L. CHARBONNIER, *Comptes rendus*, 272, Série C, 1971, p. 709-712.

(12) J. REBISCHUNG et K. KARSKA, *Ann. Amélior. Plantes*, 1, 1952, p. 1-30.

Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, INRA,
16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris.

Résumé de la publication paru dans les Chemical Abstracts

143136m New data permitting exploitation of the electrophoretic heterogeneity of wheat grain gliadins for cultivar identification. Autran, Jean C.; Bourdet, Albert (Lab. Rech. Qual. Bles, Inst. Nat. Rech. Agron, Paris, Fr.). *C. R. Acad. Sci., Ser. D* 1973, 277(19), 2081-4 (Fr). Feillet's starch-gel electrophoresis of wheat gliadins (CA 65: 15980h) pH 3.2, Al lactate buffer contg. 0.5M urea, stained with 0.05% Nigrosine in 2% trichloroacetic acid is useful for the identification and chemotaxonomy of wheat cultivars. J. Cerbulis