

P 74-6

JOURNEE DE RECHERCHE BIOCHIMIQUE ET DE CHIMIE ALIMENTAIRE
(BECKMAN INSTRUMENTS FRANCE)

Mercredi 16 octobre 1974

Park-Hôtel - 9, avenue Victor Cresson

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE I.N.R.A. Laboratoire de Recherches sur la qualité des Blés 16, Rue Nicolas-Fortin - PARIS-13 ^e TÉL. 5385472
--

92 - ISSY-les-MOULINEAUX

ELECTROPHORESE DES PROTEINES SUR SUPPORT

Applications à l'identification des variétés de blé

par Jean-Claude AUTRAN

Docteur Es-Sciences, Chargé de Recherches à l'I.N.R.A. (☉)

L'objet de cet exposé est de fournir un exemple précis d'application de l'électrophorèse dans le domaine de la biochimie alimentaire. Le thème choisi est l'identification des différentes variétés de blé commercialisées en France à partir d'une analyse de l'hétérogénéité électrophorétique de certaines protéines du grain.

Il s'agit d'une question très spéciale, mais il va de soi que le principe d'exploitation des résultats rapporté ici peut être étendu à de nombreux autres cas et donc intéresser à la fois ceux qui ont affaire à des problèmes généraux de chimiotaxonomie et ceux qui cherchent à interpréter des diagrammes de fractionnements protéiques relativement complexes.

Le plan de l'exposé sera alors le suivant :

- Une justification rapide des recherches appliquées concernant l'identification des variétés de blés ou d'autres végétaux.
- Une description de la méthodologie utilisée et surtout du type d'exploitation des données électrophorétiques.
- Applications pratiques et discussions.

(☉) Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A., 16, rue Nicolas-Fortin - 75013 PARIS -

.../...

I - POURQUOI DES RECHERCHES CONCERNANT L'IDENTIFICATION DES VARIETES DE BLE ?
QUELS SONT LES PROCEDES UTILISABLES ? POURQUOI UTILISER L'ELECTROPHORESE ?

Ces recherches peuvent se justifier principalement à 2 niveaux.

D'une part, la possibilité de reconnaître les variétés aiderait grandement la production et l'industrie de transformation des céréales car ces secteurs attachent une importance croissante au facteur variétal qu'ils considèrent comme l'un des meilleurs critères susceptibles de garantir un niveau donné de qualité.

D'autre part, il paraît important que les généticiens, les sélectionneurs disposent d'une méthode sûre permettant de reconnaître, de caractériser aussi bien des lignées en cours de sélection que les blés inscrits au catalogue français des variétés.

Or, il faut reconnaître que, jusqu'ici, le problème de la reconnaissance des variétés, bien que très anciennement posé, apparaît mal résolu. En effet, les méthodes existantes, fondées soit sur la morphologie du grain, soit sur l'examen de la plante ou de la plantule, soit sur des réactions chimiques, présentent de nombreux inconvénients :

- un temps de réponse généralement élevé,
- une dépendance parfois très forte à l'égard des conditions culturales,
- une très faible spécificité (classes de variétés et non variété unique).

D'où la nécessité de proposer une nouvelle technique ne possédant pas les défauts inhérents aux anciennes méthodes et fondée pour cela sur un principe tout différent. Ce principe n'est autre que la spécificité génétique de l'hétérogénéité électrophorétique des protéines végétales de type prolamine.

On rappelle que l'électrophorèse sur support permet d'obtenir, à partir de protéines naturelles (qui sont en fait des mélanges de nombreuses espèces moléculaires différentes), un diagramme de fractionnement renfermant plusieurs bandes, chaque bande pouvant représenter (dans les meilleurs des cas) une espèce moléculaire déterminée.

L'hétérogénéité électrophorétique ainsi mise en évidence peut être, selon les protéines considérées, plus ou moins spécifique du matériel étudié.

- On connaît ainsi des protéines non spécifiques (exemple de certaines protéines fonctionnelles : cytochrome c, histone). Le cliché 1 fournit d'ailleurs un exemple d'une telle protéine non spécifique : l'histone isolée de germes de différentes variétés de blés. Certains de ses composants apparaissent même identiques jusque dans leur composition en AA, qu'il s'agisse de sérum humain, de foie de rat ou de racine de pois.

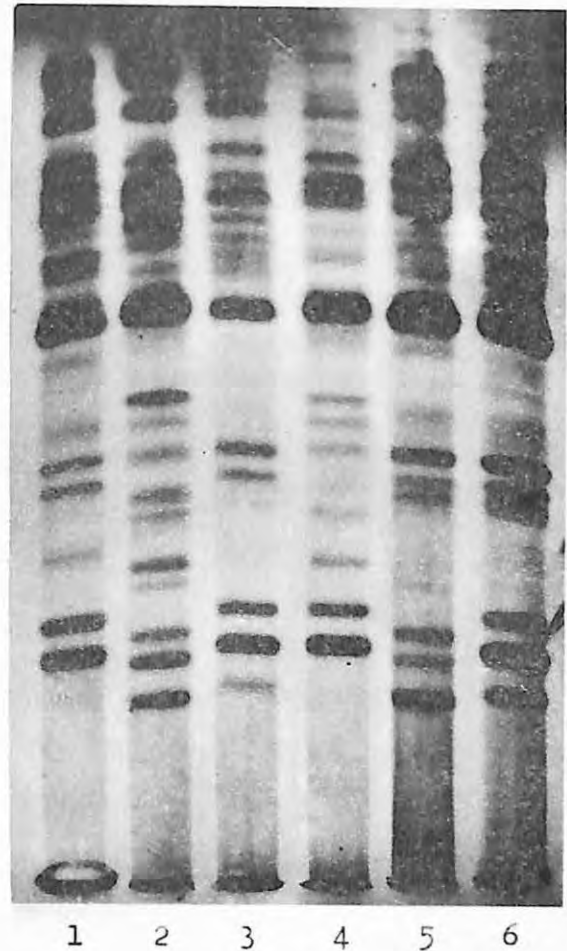
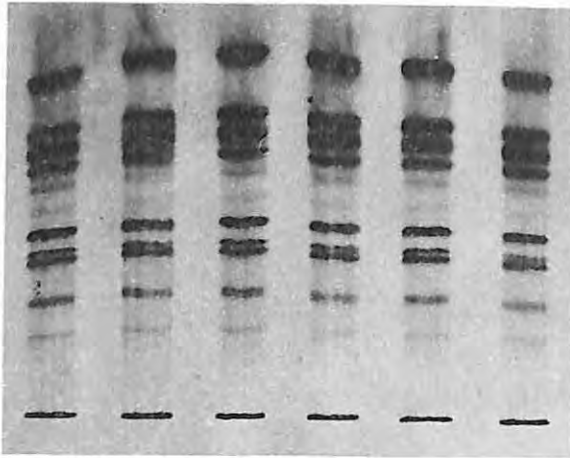


Figure 1 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide des histones isolées de 6 variétés différentes de blé. (Exemple de protéine non spécifique)

Figure 2 : Electrophorèse en gel d'amidon des gliadines de 6 variétés différentes de blé tendre: (1) Florence-Aurore, (2) César, (3) Chrismar, (4) Clairon, (5) Kolibri, (6) Rex.

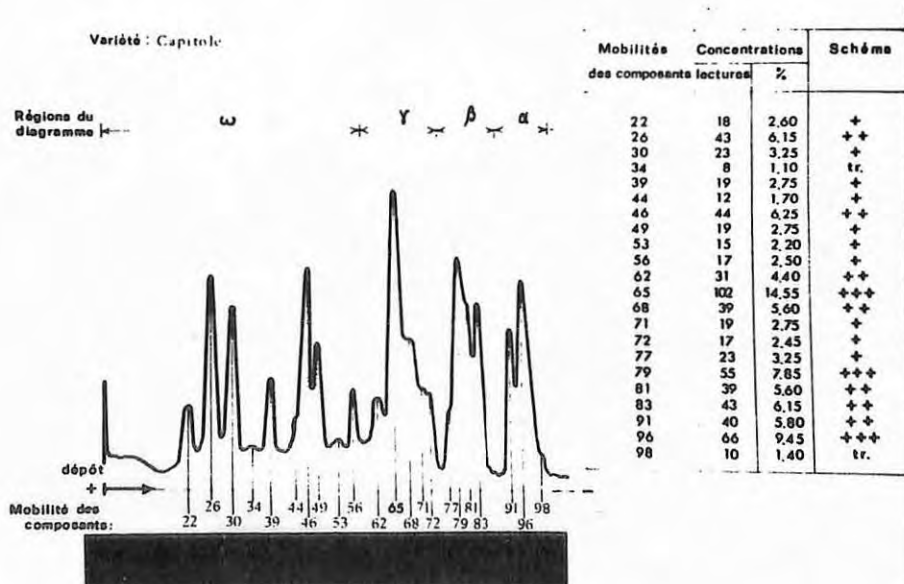


Figure 3 : Densitométrie de l'électrophorégramme gliadine et schématisation du diagramme-type.

- On connaît également certaines protéines dont l'hétérogénéité est fonction de l'espèce (exemple des protéines dites solubles : albumines-globulines) qui, chez le blé permettent de différencier l'espèce blé tendre (T. vulgare) de l'espèce blé dur (T. durum) mais non pas de différencier les variétés de chacune de ces espèces.

- On connaît enfin, - le cas est certainement plus rare, mais précieux pour résoudre notre problème - des protéines dont l'hétérogénéité est de type variétal. Précisément, chez les céréales, des protéines de ce type existent : ce sont notamment celles de la catégorie des prolamines (gliadines, chez le blé) que l'on définit à partir de leur caractère de solubilité dans les alcools dilués.

Voici d'ailleurs un exemple cliché 2 des fractionnements obtenus qui montrent cette hétérogénéité de type variétal des gliadines du blé.

II - CONDITIONS EXPERIMENTALES ET PRINCIPE D'EXPLOITATION DES DIAGRAMMES.

Les conditions expérimentales consistent :

1) en une extraction directe de la fraction gliadine au moyen d'éthanol dilué (60-70 %) ou de G.M.C. à partir d'une faible quantité de grain broyé (1 g. en général mais on peut miniaturiser la méthode jusqu'à 1 seul grain).

2) en une électrophorèse en gel d'amidon, tampon lactate d'Al., pH 3,2, coloration des protéines par la nigrosine en milieu A.T.C. La migration obtenue est de l'ordre de 15-18 cm en 4 h. 30 et 16 à 22 composants sont révélés, selon la variété.

Il faut cependant signaler que ce caractère variétal et génétiquement stable de la constitution électrophorétique des gliadines a été mis en évidence depuis plus de 10 ans déjà par différentes équipes américaines, anglaises, australiennes et françaises. Mais je dois ajouter, qu'à notre connaissance, nul n'avait pu véritablement exploiter ces données fondamentales à des fins appliquées : on constatait des différences variétales mais on ne savait pas les utiliser pour caractériser significativement les variétés, et cela en raison, d'une part, de la complexité des diagrammes (16-22) et d'autre part, de certaines fluctuations d'ordre expérimental dont on pouvait craindre qu'elles ne limitent parfois la signification des différences variétales.

Pour surmonter ces difficultés voici les voies d'approche complémentaires que nous avons pensé à utiliser :

Le cliché 3 montre d'abord comment à partir de chaque diagramme variétal on a construit un diagramme-type schématisé rendant compte à la fois de la mobilité des composants (0 à 100) et de leur concentration relative approximative, d'après la densitométrie du gel.

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	+	+

Figure 4 : Schémas comparatifs des diagrammes-types oméga-gliadines de 4 variétés de blé (2 T. vulgare et 2 T. durum).

Capitole	Hardi	Champlein	Joss	Etoile de Choisy	Cappelle	Magali	Moisson	Rex	Rémois	Florence-Aurore	Heims	
0	6	9	8	13	6	14	0	13	5	8	12	Capitole
	0	2	1	13	3	8	6	10	3	8	11	Hardi
		0	3	13	7	10	9	11	5	12	13	Champlein
			0	13	5	9	8	11	2	7	13	Joss
				0	11	21	13	13	11	12	10	Etoile de Choisy
					0	10	6	11	4	9	11	Cappelle
						0	14	19	11	14	20	Magali
							0	12	5	8	12	Moisson
								0	10	9	11	Rex
									0	5	11	Rémois
										0	13	Florence-Aurore
											0	Heims

Figure 5 : Tableau des indices relatifs de dissimilarité entre les diagrammes gliadines de 12 variétés françaises de blé tendre.

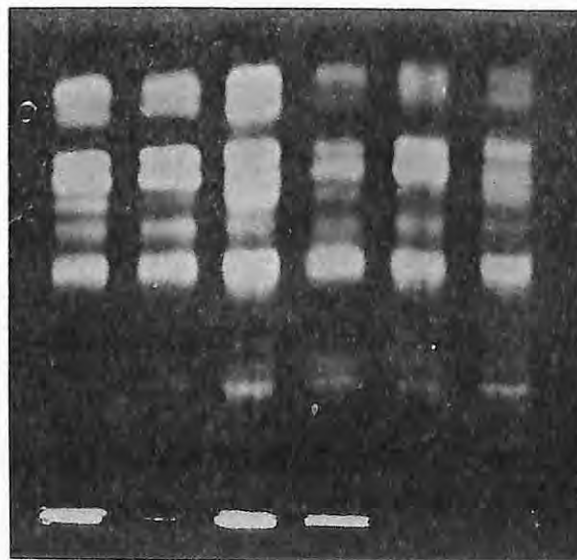


Figure 6 : Diagrammes électrophorétiques des gliadines de 8 variétés françaises de blé tendre (4 d'origines génétiques voisines : 1 - Joss, 2 - Champlein, 3 - Cappelle, 4 - Capitole, et 4 d'origines éloignées : 5 - Progress, 6 - Aronde, 7 - Rex, 8 - Atys).

Insistons cependant sur le fait qu'un répertoire exhaustif des espèces moléculaires gliadines présenté dans un ensemble de variétés est impossible à établir car la seule méthode d'électrophorèse ne permet pas de démontrer que des bandes de mobilité apparemment identiques ou très voisines correspondent à une même protéine.

Dans l'interprétation à caractère purement appliqué que nous donnons ici, le répertoire retenu est limité aux seuls composants différenciables avec certitude. On en a retenu 43 pour un ensemble de 250 variétés actuellement étudiées. (Il en existe certainement bien davantage mais il serait illusoire d'en faire état en raison de la précision avec laquelle les bandes peuvent être repérées).

Une deuxième simplification a consisté à exprimer simplement, (toujours pour tenir compte de fluctuations expérimentales éventuelles) l'importance relative des composants par l'échelle suivante : 0, tr., +, ++, +++. Si l'on convient alors, de considérer qu'il n'y a différence significative entre 2 variétés que si, pour un composant donné l'écart est d'au moins 2 unités dans l'échelle (ex. : 0 et +, tr. et ++, + et +++), une comparaison objective des diagrammes devient possible.

La figure 4 montre ainsi qu'entre les variétés Cappelle et Rex existent 4 différences significatives : au niveau des composants 34, 39, 49 et 54. A partir de cela on peut affirmer que ces 2 variétés peuvent être différenciées sans ambiguïté. Il en est de même des 2 variétés de blé dur Lakota et Oued-Zénati.

Ce mode d'analyse des diagrammes permet ensuite de quantifier l'analogie (ou la dissemblance) entre 2 variétés au moyen d'un indice de similarité (ou de dissimilarité) des diagrammes, lequel correspond simplement au nombre de différences significatives relevées entre eux (ex. : 4 entre Cappelle et Rex).

Pour un ensemble de variétés, les indices de dissimilarité peuvent être rassemblés dans un tableau à 2 entrées dont la figure 5 donne un exemple (cas des 12 variétés françaises les plus cultivées). Plus l'indice de dissimilarité est élevé (ex. : 24 entre Magali et Etoile de Choisy), plus les diagrammes diffèrent et plus leur différenciation est évidente. En revanche, lorsque l'indice est faible (Joss - Hardi), la différenciation est plus délicate. Il existe même quelques rares cas où l'indice est nul (Capitole - Moisson) ce qui signifie que les variétés en question ne peuvent pas être reconnues, du moins par cette méthode.

A quoi attribuer cette plus ou moins grande similarité des diagrammes?

Nous pensons que cela est à relier à l'origine génétique des différentes variétés:

Le cliché 6 montre les diagrammes de 8 variétés Françaises :

- les 4 de gauche ont une parenté génétique élevée (Joss, Champlain, Cappelle, Capitole) et on constate que leurs diagrammes sont très voisins.

- les 4 de droite sont par contre génétiquement très éloignées (ce sont des blés de printemps dont l'un au moins des parents est d'origine étrangère) et on constate que leurs diagrammes sont très différents. Ces 4 derniers sont donc faibles à identifier contrairement aux 4 premiers.

Malheureusement ce sont les 4 premiers qui sont de loin les plus cultivés en France car les sélectionneurs français ont employé de façon répétée les mêmes géniteurs de sorte que nos principaux blés d'hiver se ressemblent tous plus ou moins et sont plus difficilement différenciables.

III - APPLICATIONS PRATIQUES ET DISCUSSIONS.

Examinons dans une 3ème partie les applications pratiques que l'on peut attendre de cette méthode d'électrophorèse des gliadines : Puisque la validité du procédé semblant désormais assurée, on voit qu'il est possible, dès à présent :

1) de contrôler, de vérifier la variété présumée d'un blé, c'est-à-dire de répondre à la question : "Ce blé est-il bien -par exemple- de la variété Rex". Il suffit pour cela de procéder à une électrophorèse des gliadines de l'échantillon à vérifier, parallèlement à celles d'un témoin de collection et de comparer les diagrammes. La réponse sera oui, ou non.

2) il est possible, notamment dans le cas où la précédente réponse est négative, d'identifier une variété totalement inconnue. En effet, puisque la plupart des diagrammes sont différents sur le plan de la mobilité des bandes et/ou de leur concentration relative, il était possible a priori de retrouver le nom de la variété à partir de la connaissance du diagramme.

Nous avons construit pour cela un tableau (cliché 7) chimiotaxonomique, qui, tout comme une flore, grâce à des clés de détermination fondées sur la présence ou l'absence de quelques composants du diagramme, permet de remonter au nom de la variété. La figure 7 se limite à 7 variétés. Mais ce tableau existe pour les 80 variétés de blé actuellement inscrites au catalogue français. Le tableau est d'ailleurs en cours d'extension avec les blés de la C.E.

La figure 8 illustre un tableau du même type dans le cas des blés durs.

En fait, il faudrait dire, la plupart des 80 variétés françaises car on a trouvé quelques cas de blés ayant des diagrammes trop voisins pour être différenciés avec certitude. Cependant ces cas sont rares et représentent 6 % seulement de l'ensemble des variétés (malgré la relative homogénéité déjà signalée des blés d'hiver français). On peut donc affirmer que l'actuelle méthode d'électrophorèse des gliadines offre des possibilités nettement supérieures à tout ce qui existait jusqu'ici en matière d'identification des variétés de blé à partir du grain.

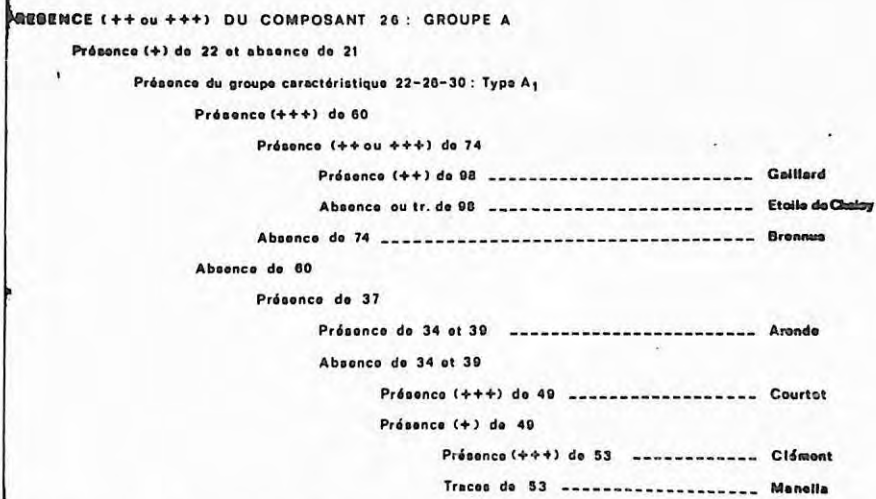


Figure 7 : Exemple de clé de détermination de quelques variétés françaises de blé à partir du diagramme électrophorétique des gliadines en gel d'amidon.

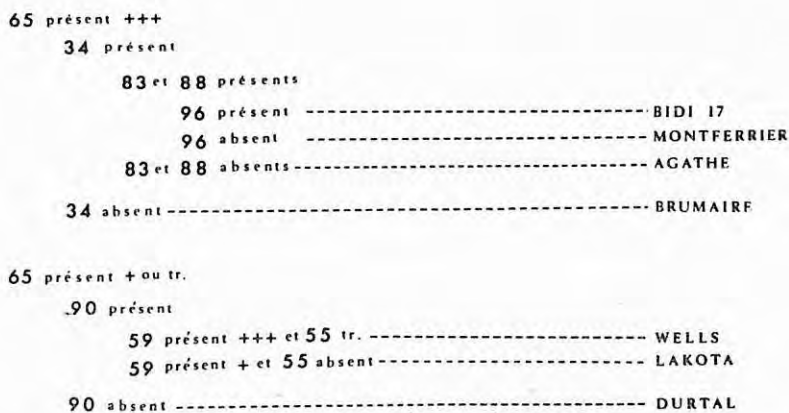


Figure 8 : Clé de détermination des variétés de blé dur du Catalogue Français des Variétés à partir du diagramme électrophorétique des gliadines.

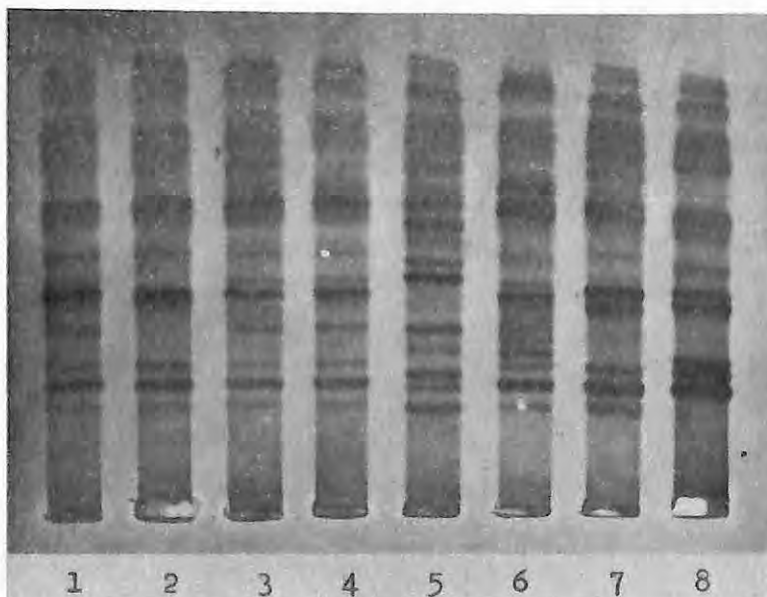


Figure 6 : Exemple de fractionnement électrophorétique des gliadines du blé en gel de polyacrylamide (tampon acétate avec simple fixation trichloracétique des protéines, sans coloration).

En conséquence, et compte tenu du fait que le principe utilisé ici peut vraisemblablement être transposé à d'autres végétaux, nous pensons que dans l'avenir, cette méthode d'électrophorèse sera utile à la fois :

- aux généticiens et sélectionneurs pour caractériser biochimiquement les lignées en cours de sélection,
- aux industries de transformation des céréales pour faciliter un approvisionnement en lots de qualité mieux définie,
- peut être aussi aux services chargés de l'inscription des variétés au catalogue officiel ou du contrôle et de la répression des fraudes.

En guise de conclusion nous évoquerons les 3 points suivants :

- 1) On peut s'étonner que la technique utilisée ici soit (encore) l'électrophorèse en gel d'amidon qui présente certains inconvénients au niveau de la préparation ou de la manipulation des gels. Pourquoi ne pas utiliser plutôt des supports plus manipulables, plus compatibles avec les conditions d'un laboratoire de contrôle, tels que l'acrylamide ou même des supports commerciaux tels que l'acétate de cellulose ou l'acrylamide-agarose? La raison est qu'il n'a pas encore été possible, avec ces derniers supports, d'obtenir des résolutions aussi élevées qu'en gel d'amidon (ex: cliché 9). Cela tient probablement au fait que les prolamines sont des protéines relativement hydrophobes (elles sont solubles dans les alcools dilués à 70 %) et qu'elles se séparent mieux dans un support très polaire comme l'amidon. D'autres protéines, plus polaires, comme les albumines, les globulines, les histones, se fractionnent en revanche beaucoup mieux en acrylamide qu'en amidon.
- 2) Ce qui vient d'être dit concerne l'identification de lots de blés de variétés pures. Que se passe-t-il dans le cas de mélange de variétés ? Les études, encore en cours ont montré d'ores et déjà que c'est là un problème nettement plus difficile surtout s'il s'agit de mélanges de variétés génétiquement voisines. Même dans les meilleurs des cas (diagrammes très différents) il paraît impossible de déceler des contaminations inférieures ou égales à 20-25 % de sorte que la technique ne permet pas actuellement de détecter de faibles additions frauduleuses par exemple d'un mauvais blé dans un bon.
- 3) Sur un plan plus fondamental on peut enfin s'interroger sur cette originalité de constitution observée chez les protéines de type prolamine. On sait, d'une part, qu'elles appartiennent à la catégorie des protéines de réserve du grain dont le rôle n'est, en principe, que de servir de nourriture à la plantule lors de la germination. Mais d'autre part, on constate paradoxalement que leur hétérogénéité électrophorétique présente à la fois, outre une totale indépendance à l'égard des conditions culturales, une grande complexité et une exceptionnelle variabilité intervariétale, autant de caractères que l'on s'attendrait à trouver chez des protéines fonctionnelles ou hautement fonctionnelles.

Selon nous, il semblerait que ce soit précisément en raison de leur absence de fonction vitale que les composants de la gliadine apparaissent aussi diversifiés. En effet, contrairement à ce qui a lieu avec des protéines fonctionnelles telles que les histones ou les protéines ribosomales ou les enzymes, la constitution des gliadines, synthétisées par la plante en quelque sorte en bout de chaîne (dans le grain), a certainement pu supporter un grand nombre de mutation non létales, ce qui expliquerait la grande diversité observée pour les composants gliadines des blés actuels.

Beckman Instruments France S.A. au capital de 10.800.000 Francs

52/54, Chemin des Bourdons - 93220 GAGNY - Téléphone 927-77-77 - Téléc 91.921

Monsieur AUTRAN
Laboratoire de Recherche sur la
qualité des blés
ENSMIC
I.N.R.A.
16, rue Nicolas Fortin
75013 PARIS

N. Réf. 40.642.001 SM/NB

Gagny, le 30 Septembre 1974

Monsieur,

Nous n'avons pas eu le plaisir de nous entretenir de vive voix avec vous, mais nous vous remercions ici d'avoir bien voulu accepter d'être conférencier, à la Journée de Biochimie Alimentaire que nous organisons au PARK-HOTEL d'ISSY-LES-MOULINEAUX le 16 Octobre.

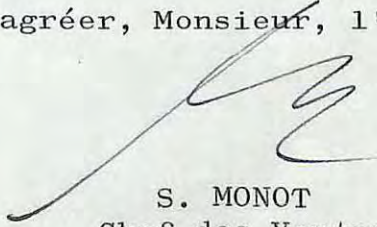
Afin de vous permettre d'avoir une idée plus précise, nous vous expédions, ci-joint, une photocopie du programme de cette Journée, qui vous donnera tous les détails sur les communications qui seront faites au cours de cette manifestation.

Nous avons retenu le titre de votre conférence : "Electrophorèse et électrofocalisation des protéines sur support, Applications à l'identification des variétés de blé", étant entendu que vous vous chargez de la seconde partie de cette communication, la première étant assurée par Monsieur LEFEBVRE.

Nous serons heureux de vous compter parmi nous dès le début de cette réunion, toutefois, s'il ne vous est pas possible de vous libérer toute la journée, nous vous attendons pour le déjeuner.

Nous sommes persuadés que votre participation contribuera au succès de cette Journée et, vous en remerciant par avance,

Nous vous prions d'agréer, Monsieur, l'expression de nos sentiments distingués.

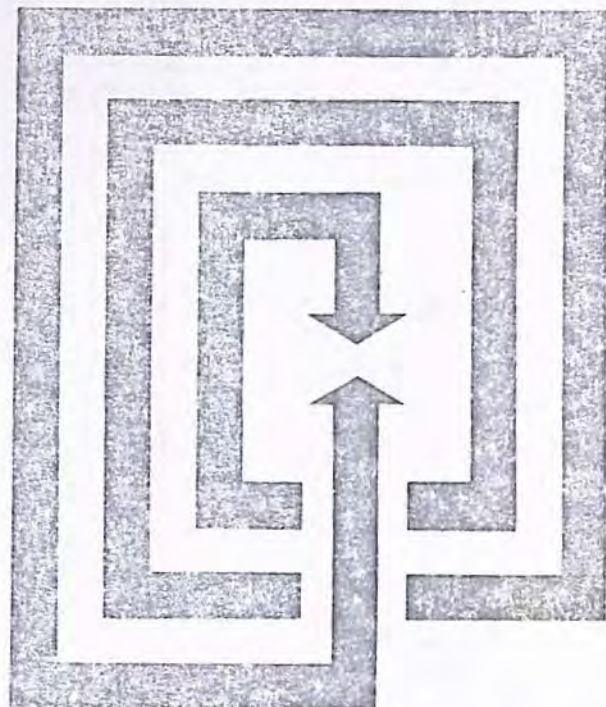


S. MONOT
Chef des Ventes

P.S. Si vous désiriez apporter un changement dans le titre de votre conférence, nous vous serions reconnaissants de nous le faire savoir dès que possible.

Matériels exposés en permanence au cours de cette journée

- Ultracentrifugeuse L5-65 avec accessoire à absorption UV
- Rotors à angles fixes
à godets mobiles
zonaux
- Compteur de rayonnements gamma
- Electrophorèse Microzone, enregistreur,
intégrateur, imprimante, modèle MCD.
- Spectrophotomètre Ultraviolet UV-25
- Spectrophotomètre Ultraviolet, Proche Infrarouge
ACTA M-IV
- Spectrophotomètre Infrarouge, modèle 4220
- Spectrophotomètre d'Absorption Atomique
- pH-mètre numérique pHasar
- Analyseur d'oxygène dissous "Fieldlab"
- Picnomètre
- Viscosimètre Brookfield.



RENCONTRES BECKMAN

Journée de Biochimie Alimentaire

16 Octobre

A PARIS

Beckman®

**Hubert MANINGUE, Chef de notre Agence de la Région Parisienne,
et ses collaborateurs Messieurs Cauchoix, Magnin, Maisondieu, Picard, Rougerie,
seront heureux de vous accueillir à la Journée de Recherche Biochimique et de Chimie Alimentaire
organisée le Mercredi 16 Octobre au :**

P A R K - H O T E L
9, Avenue Victor Cresson
92130 ISSY LES MOULINEAUX

TEL. 644 - 77 - 34

P R O G R A M M E

9 h 00 Accueil des participants

9 h 30 (précises)

"Utilisation de la Spectrophotométrie Ultraviolet et Infra-rouge en Chimie Alimentaire", par J. BESSUAND, Ingénieur.

10 h 15 Pause

10 h 45

"Importance de l'analyse d'Acides Aminés en Biochimie Alimentaire", par Monsieur Bruno RIBADEAU-DUMAS - Maître de Recherches à l'I. N. R. A.

11 h 30

"Analyse des Acides Aminés dans les Aliments et l'Alimentation animale", par F. ROUSSEL, Ingénieur.

12 h 15 Déjeuner offert par la Société Beckman.

14 h 00

"Le dosage d'éléments mineurs dans les aliments par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique", par G. HUTET, Ingénieur.

14 h 30

— Electrophorèse et Electrofocalisation des protéines sur support,
— Applications à l'identification des variétés de blé, par MM. J. LEFEBVRE, Laboratoire de la Station de Biochimie des Céréales, I. N. R. A. (1ère partie), et J. C. AUTRAN, Laboratoire de recherche sur la qualité des blés, I. N. R. A. (2ème partie).

15 h 10 Pause

15 h 45

"Utilisation de l'Ultracentrifugation en Biochimie Alimentaire", par M. MUTTELET, Ingénieur.

Ces communications alterneront avec la présentation des matériels dont vous trouverez la liste au dos de cette invitation