

24 Janvier 1975 - Maisons Alfort

Electrophorese en gel de polyacrylamide et en gel d'amidon de certaines proteines et enzymes du grain de ble: application à l'etude de la phylogenie des bles tendres et des bles durs.

J.-C. AUTRAN, B. FLEURY, P. JOUDRIER et A. BOURDET

Laboratoire de Recherches sur la Qualite de Bles
16 rue Nicolas-Fortin . 75013 PARIS

INTRODUCTION

Les activités du Laboratoire de Recherches sur la Qualite des Bles ont pour but d'améliorer la valeur d'utilisation des bles en intervenant notamment au niveau de la sélection des variétés. Dans ce cadre général, les recherches relatives aux protéines et aux enzymes occupent une place prépondérante que justifient à la fois la spécificité biologique et l'importance technologique de ces composés.

La réalisation de ce programme implique nécessairement différentes recherches plus fondamentales correspondant à une approche biochimique de certains problèmes de nature génétique ou cytogénétique. ^{notamment polymérisation de prot. ou enzymes} C'est ainsi qu'au moyen des méthodes de fractionnement des protéines et tout particulièrement de l'électrophorese analytique nous avons été amenés à étudier quelques problèmes de biochimie génétique élémentaire tels que ^{publification du polymérisation de cette prot. et enzyme par divers auteurs}

- la phylogénie des bles cultivés
- le déterminisme génétique de certains constituants protéiques et enzymatiques
- la caractérisation biochimique des espèces, variétés, génomes, chromosomes
- etc,...

Compte tenu de l'étendue des problèmes soulevés et du temps dont nous disposons, nous nous bornerons à illustrer par quelques exemples, l'utilisation de méthodes bien connues, mais à l'usage duquel nous n'avons pas eu connaissance (notamment)

des méthodes électrophorétiques dans le domaine de la phylogénèse des blés cultivés.
ET, si nous avons bien compris l'esprit de ce colloque, nous insisterons davantage sur l'aspect expérimental que sur les résultats proprement dits.

Les exemples choisis seront les suivants :

1. - Électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines solubles (albumines - globulines) du grain de blé
2. - Électrophorèse en gel de polyacrylamide et révélation spécifique des isoenzymes de la β -amylase libre du grain
3. - Électrophorèse en gel d'amidon des protéines de réserve du grain, de type prolamine (ou gliadine, chez le blé).

MATERIEL D'ÉTUDE

En vue de contribuer à la connaissance de la phylogénèse des blés actuellement cultivés, il s'agissait notamment de préciser la responsabilité des génomes ^{du blé} dans la synthèse des constituants protéiques et enzymatiques étudiés. En fait, nous ferons ^{ici} essentiellement allusion au génome D, pour lequel les résultats sont les plus nets. C'est pourquoi le matériel d'étude retenu a été le suivant :

- 200 à 300 de blé tendre (*T. vulgare*) et 30 variétés de blé dur (*T. durum*) d'origines géographiques très diverses. On rappelle que ces blés sont respectivement hexa (ABD) et tétraéploïdes (AB). Leur comparaison devrait donc permettre de déceler les constituants marqueurs du génome D.

- 12 souches de l'espèce sauvage *Aegilops squarrosa* dérivées du génome D.

- 3 variétés tétraéploïdes dérivées de blés hexaéploïdes (provenus au Canada)

* dérivées du génome D connus, → phylogénèse non étudiée → intérêt du marqueur fait de génome.

METHODES EXPERIMENTALES ET RESULTATS OBTENUS

Les méthodes sont détaillées au niveau de chacun des 3 exemples fournis :

I Électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines ^{libres} solubles ^(alb-glob) du grain de blé :

Louquoi avoir retenu ces protéines ?

Tout simplement parce qu'on a remarqué leur faible variabilité au plan variétal (c.a.d. leur constance au plan intrasécifique), caractère qui permet des comparaisons et des interprétations simples aux niveaux de différentes espèces et de différents génomes.

Au plan expérimental ces protéines dites solubles sont extraites directement à partir du grain de blé broyé par contact 1 heure à 4°C avec une solution NaCl 0,5 M et centrifugation.

Le fractionnement est opéré en plaques de gel de polyacrylamide (170x 150 x 3) :

- 7,5 % (Cyanogum)
- tampon lactate d'Al. ($\mu = 0,05$)
- urée 6M
- pH 3,6.
- polymérisation directement en milieu acide gras avec catal. TEMED

(conditions classiques)

L'électrophorèse est conduite sous 10 V/cm pendant 2h 50 et potentialité de pH_0 après bicourant de 2h à 7 V/cm

La coloration est effectuée par l'aniline bleue - black (CANALCO) qui selon SILANO (1979) a la propriété de réagir différemment avec les alb. et les glob, les premières étant colorées en bleu foncé, les secondes en vert.

① Exemple cliché 1 : Prot solubles de 8 variétés d'une même espèce (blé dur) ce qui redémontre, si besoin était, la similitude des diagrammes au sein intraspécifique (dissemblances seulement quantitatives et portant sur glob. infides).

Des observations analogues peuvent être effectuées sur T. vulgare ou sur A. squarrosa : cliché 2 (on voit mieux le vert des glob)

③ Si l'on compare entre elles différentes espèces cliché 3, on aboutit à des conclusions plus intéressantes :

- le nombre de bandes ne semble pas s'accroître avec le degré de 'fluidité' (toujours 20 - 25)

- 25-30 % des bandes trouvés dans tous les A. squarrosa (D) ne figurent dans aucun blé tendre (ABD) ce qui peut souligner des particularités de dominance et de régulation entre les génomes.

- enfin l'alb (bleu) 1,07 et le glob (vert) 1,11 ^{qui sont} présentes chez tous les blés tendres ABD et toutes les variétés de squarrosa D paraissent donc de ce fait être considérées comme spécifiques du génome D. En pratique ces deux composants permettent de distinguer entre elles les 2 espèces cultivées blé tendre et blé dur et on serait tenté d'assimiler l'alb 1,07 à l'alb 13 ^{isolé par} FEILLET et BOURDET (1968) dont la présence dans le blé tendre et l'absence dans le blé dur a été confirmée pour mettre au point un test rapide utilisable dans les transactions commerciales.

④ Une dernière confirmation semble être apportée par l'étude des tétrafloïdes dérivés (cliché 4) d'hexaploïdes par élimination du génome D. Ces 3 tétrafloïdes artificiels ont en effet perdu les 2 bandes 1,07 et 1,11 caractéristiques du génome D et présentes dans les 3 blés hexaploïdes témoins.

II Zymogrammes ^{en gel de polyacrylamide} β amylase libre soluble du grain de Blé :

La β amylase a été choisie ici en raison de son importance technique et notamment de son rôle en panification.
 D'où l'intérêt de préciser les zones du zymogramme ou trouvent non la déphosphorylation du glucose D (qui s'en consomme comme substrat) ou l'hydrolyse du D-glucose.

Au plan expérimental, la β amylase soluble est extractée en même temps que l'ensemble des protéines solubles par une solution saline diluée et elle n'est caractérisée qu'après révélation spécifique après fort assèchement et l'élution par le D-glucose.

L'identification a lieu en gel de polyacrylamide dans des conditions normales \approx celles du gel précité (7,5% lactate) mais ici.

- pour l'usage (indiquant les β) \rightarrow p. 32 (qui est indiquée)
- phosphorylation en milieu neutre (l'impureté en lactate avec catal. DMAPN)
- égalités avec temps par précipitation nuit.

Migréon (h à 8v/cm.
 D'après les notes p. 102 103 m. (tableaux N° 2, 3).

Révélation spécifique par

- liantage du gel
- incubation 30 min à 30°C du gel désséché à 1% p. 4, 5.
- coloration pp. 102-103 dans I₂-KI
- conservation à 4°C. Eau-sau

Classe 5 \rightarrow zones \rightarrow activité β appartenant en blanc sur fond bleu noir

Si l'on compare différents variants de l'enzyme T, on observe une certaine variabilité : classe 5 : En fait 5 types voisins ont été trouvés. I à V (zones A, B, C)

En revanche des T. du même pan de variabilité intraspécifique : dans IV (A, B).
classe 6 : dans II (A + C)

D'où l'idée que la zone C présente des T. en relation avec la zone D et absente des T. du même pan. On peut caractériser le glucose D et apprécier dans certains cas au moins des les A, B, D.

Une confirmation est apportée par l'étude des tétrapeptides libérés. classe 7

Ces cas-ci, on observe une disposition des composants de la zone C dans de l'élution du glucose D. On trouve souvent dans ce type IV, qui est le type III dans. En note toutefois que dans le cas de la variété tetraperulide, la

départition de la zone C n'est que partielle. Ce phénomène s'est pas surprenant car il a été montré (KATSIKES, 1968) que dans le cas de cette variété, l'élimination du génome D n'a pas été complète: il y a eu translocation d'une partie du chromosome 1D sur le génome A. Autre confirmation qui implique en outre que les gènes responsables des P amylose du groupe C se trouvent localisés sur le chromosome 1D.

III Electrophorèse en gel d'amidon des protéines de réserve de type prolamine

- Cladines retenues car - importance technologique: 50% du gluten
- variabilité génétique très élevée: complex mais très riches en résultats

Au plan expérimental

- extraction = partir des prof. de solub. alcools dilués ETOH 60% ou GAC 25%. 1 nuit à ordinaire
- électrophorèse cette fois en gel d'amidon en plaques
tampon lactate d'Al $\mu = 0,0265$ μ 32 μ 950
préparé 80° - cuves Plengen Amidaphan (gels 120 x 300 x 6 mm)
pc 2h à 8V/cm
migration 6h45 = - dissous
fixation ATC 20% 30 sec \rightarrow v. syst. de classement
coloration nigrosine 0,5%. 1 nuit ATC 2%
défate: papier filtre

charbonnien

8

\rightarrow exemple sur cliché 8
composants repérés / bande & marqueuse $\rightarrow 65$

interprétation: ~~ceci~~ phase originale du travail.
(jusqu'ici on ne savait pas exploiter des diagrammes aussi complexes)
on savait qu'il y avait 3 variétés

denaturation
intégration cliché 9

9

diagramme type / moyenne \leftarrow mobilité cc relative
schéma en fractals. exp. + + + + +
comparaisons enfin objectives avec voyes de sécurité.
 \rightarrow exploitation apparaissant possibles

10

11

12

- comparaison des σ \neq signific ou non (10)
- compter nbe de σ \rightarrow indices de similarité de l'esp. (11)
- reconnaissance des variétés \rightarrow chromosomique (12)

résultats: σ & les var cultivées ont des l'esp \neq \rightarrow moyen efficace d'identif. variétale
idem pour durum
squarosa

Au niveau interopéufigue: difficile car on ne peut pas superposer & variétés
 \rightarrow idée d'éliminer fret variétal en étudiant gd nombre de résultats

conclusions:

- nbe de bandes \neq avec l'esp de florité
9-12 \rightarrow 15-15 \rightarrow 17-25.
D AB ABD

- zones \neq selon géométries
ABD 24 à 100
AB 34 à 100 (13)



(13)

zones
D 21-66 et 62-85

Cependant la complexité des diagrammes fait qu'on se heurte à des difficultés lorsqu'on cherche à préciser la spécificité génomique au niveau des composants eux-mêmes. Actuellement, le problème ne semble résolu qu'avec les *in situ* hybridations de faible mobilité (20 à 30.)

(14)

Les dernières sont notamment responsables de la γ du tétra (14)
T vulgare γ \approx 2-6 bandes
T. darsum \odot

En outre l'élimination du génome D entraîne la perte de ces bandes ce qui semble prouver qu'elles sont bien sous la dépendance du génome D (tétra darsum; (15).)

(15)

CONCLUSIONS.

- Complexité des interprétations de diagrammes
→ prudence : perte de bandes : parfois interactions dans une même région génomique
- D + avanci mais caillou en surface

Plan expérimental

- finesse des méthodes d'hybridation 1985 au SBE
outil performant ^{pour tester un clone} en *in situ* hybridation
(détection de translocation)
- miniaturisation de $\frac{1}{2}$ agarose \rightarrow Pa et amplicons
- tubes - plaques
- choix du gel je terminerai le tétra pour P1 et P \rightarrow acyl. glyad \rightarrow amidon apolarité acyl = agarose SBEIA etc ...
- histones et
- choix judicieux du gel \rightarrow outil performant (vérifier la complexité) par immuno et électrophorèse pour tester darsum de *in situ* hybridation des plis

2ème COLLOQUE I.N.R.A. de BIOCHIMIE

ELECTROPHORESE DES MACROMOLECULES ET DE LEURS DERIVES (ALFORT, 24.1.75)

Liste des participants (Conférenciers)

MM, Mme

ou Mlles

Paris - Jura (près de la Chapelle)

- AUBE Gérard
- AUTRAN Jean-Claude
- BAROUH Guy
- BERNARD Serge
- BOSCHETTI E.
- BOUNIAS Michel
- BOURDET Albert
- BURI Jacques-François
- CHARBONNIER Louis
- DAUSSANT J.
- FLEURY B.
- GRIPON Jean-Claude
- GROSCLAUDE Jeanne
- HERNACHE Geneviève
- JOUDRIER Philippe
- LEBARS Dominique
- MOSSE Jacques
- POUILLAIN Joelle
- ROUQUETTE Daniel
- ROUZE Pierre
- SZYLIT Maurice

Biologie Physico-Chimique
Paris-Qualité des Blés ENSMIC
S E B I A
Immunologie
S E B I A
Biochimie Dept Zoologie
Paris-Qualité des Blés ENSMIC
Biologie Physico-Chimique
Produits et Acides aminés
Physiologie Végétale, C.N.R.S.
Ecole de Meunerie
Biochimie Microbienne
Virologie
S E B I A
Qualité des Blés
Biochimie Microbienne
Protéines et Acides aminés
Virologie et Immunologie
Biologie Physico-Chimique
Virologie et Immunologie
Biophysique

ALFORT
PARIS 13^e
PARIS 16^e
THIVERVAL-GRIGNON
PARIS
MONTFAVET-AVIGNON
PARIS 13^e
ALFORT
VERSAILLES
MEUDON
PARIS 13^e
JOUY en JOSAS
THIVERVAL-GRIGNON
PARIS 16^e
PARIS 13^e
JOUY EN JOSAS
VERSAILLES
THIVERVAL-GRIGNON
ALFORT
THIVERVAL-GRIGNON
ORSAY

*Paris
scant michel
(chelle) (Paris)*

*Paris - C. de Ch.
Paris - Jura
Paris - Jura*

*Paris - Jura
Paris - Jura
Paris - Jura*

LABORATOIRE DE BIOLOGIE
PHYSICO-CHIMIQUE

I. N. R. A.

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE
D'ALFORT

7. AVENUE DU GÉNÉRAL DE GAULLE
94 - MAISONS-ALFORT

TÉL. 368. 30-40 - POSTE 248

ALFORT le 5 Décembre 1974

Monsieur Albert BOURDET

Mon cher Collègue,

Nous organisons à nouveau un colloque INRA de Biochimie, centré sur l'Electrophorèse des Macromolécules et de leurs Dérivés.

Un programme provisoire comporte les communications suivantes :

- 1° Etude Electrophorétique de la Variabilité Génétique des Protéines de Réserve chez les Blés et Espèces Apparentées (*tritichum algilops*)
L. CHARBONNIER, CNRA VERSAILLES.
- 2° Application de l'Immunoélectrophorèse Quantitative à l'Etude d'Enzymes
J. DAUSSANT, Laboratoire de Biologie Végétale, CNRS MEUDON.
- 3° Utilisation des Méthodes Electrochimiques pour la Prévision de la Corrosion par Piqures d'Aciers Inoxydables.
G. DAUFIN, INRA RENNES, ENSA.
- 4° La Technique d'Electrofocalisation en Gel de Polyacrylamide. Application à l'Analyse des Protéines du Virus de la Fièvre Aphteuse -
J. GROSCLAUDE et S. BERNARD, Service de Virologie, GRIGNON.
- 5° La Technique d'Immunoélectrophorèse. Principes et Application.
J. POULAIN (N^{me}) Anot Virologie
- 6° Immunoélectrodifusion et Immunoélectrophorèse Bi-dimensionnelle
P. ROUZE

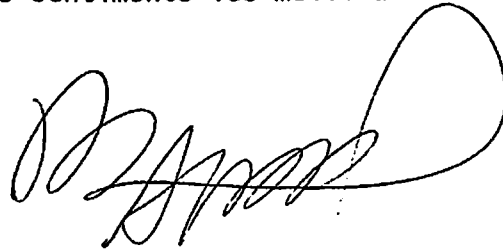
Ce colloque se tiendra au Laboratoire Central de Recherche Vétérinaire, rue Pierre Curie à MAISONS-ALFORT, le 24 JANVIER 1975 de 10 heures à 18 heures.

... / ...

... / ...

Si vous-même désirez y assister, il serait souhaitable que le bulletin d'inscription ci-joint me soit retourné aussi rapidement que possible, ainsi que ceux que vous voudrez bien transmettre aux personnes de votre entourage qui seraient éventuellement intéressées par ce colloque.

Dans l'attente de vous lire, je vous prie de croire, mon cher Collègue, à l'assurance de mes sentiments les meilleurs.



Jacques-François BURI
Directeur de Laboratoire

P.S. Les Bulletins sont à retourner à l'adresse suivante :

Dr J.F. BURI, Laboratoire de Biologie Physico-Chimique,
Ecole Vétérinaire, 7, rue du Général de Gaulle, 94700 à MAISONS-ALFORT.

Communication libre

entre 5 et 15 minutes

→ gel ammonia

Titre exact *mond.*

(denier approximation)

ELECTROPHORESE DES MACROMOLECULES ET DE LEURS DERIVES (ALFORT, 24.I.1975)

PROGRAMME

- 10.00 Ouverture du Colloque
- 10.10 J. POULAIN (Virologie Grignon): La technique d'immunoélectrophorèse.
Principes et applications
- 10.35 P. ROUZE (Virologie Grignon): Immunoélectrodifusion et immunoélectrophorèse
bidimensionnelle
- 10.55 J. DAUSSANT (Biologie Végétale, CNRS Meudon): Application de l'Immunoélectro-
phorèse quantitative à l'étude d'enzymes
- 11.50 J.F. BURI (Biologie Physico-chimique Alfort): Electrofocalisation sur colonne
et Isotachophorèse
- 12.10 J. GROSCLAUDE, S. BERNARD (Virologie Grignon): La technique d'électrofocalisa-
tion en gel de polyacrylamide. Application à l'analyse des pro-
téines du virus de la fièvre aphteuse
- 12.55 L. CHARBONNIER (Physiologie Végétale, Versailles): Etude de la variabilité
génétique des protéines de réserve des Triticum et espèces
apparentées (Aegilops) par électrophorèse sur gel d'amidon
- 13.15 REPAS.....
- 14.30 J.C. AUTRAN, B. FLEURY, P. JOUDRIER, A. BOURDET (Ecole Française de Meunerie):
Electrophorèse en gel de polyacrylamide et en gel d'amidon de
certaines protéines et enzymes du grain de blé. Applications à
l'étude de la phylogénèse des blés tendres et des blés durs
- 14.50 M. BOUNIAS (Zoologie Avignon): Détermination quantitative des principales
fractions protéiques de l'hémolymphe de quelques races d'abeilles
par électrophorèse en gel de polyacrylamide
- 15.10 E. BOSCHETTI (Sebia Paris): Electrophorèse sur Acrygel
- 15.40 J.C. GRIPON, D. LEBARS (Biochimie Microbienne Jouy): Application de l'électro-
phorèse en gel d'acrylamide-agarose à l'étude de la dégradation
des caséines
- 15.55 G. BAROUH, G. HENNACHE (Sebia Paris): Immunotechniques sur Cellogel
- 16.10 D. ROUQUETTE, J.F. BURI (Alfort): Méthodes électrophorétiques d'analyse des
macromolécules sur gel de polyacrylamide
- 16.50 G. AUBE, J.F. BURI (Alfort): visualisation densitométrique des protéines après
électrophorèse