

L'électrophorèse et son application particulière à l'identification des variétés de blé

par A. BOURDET et J.-C. AUTRAN

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Recherches sur la qualité des blés - 18, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris

Les molécules protéiques animales ou végétales présentent la particularité de posséder conjointement des groupements acides et basiques conférant aux particules des charges électriques différentes selon le pH du milieu qui les contient. Soumises à l'influence d'un champ électrique, les protéines en solution vont se déplacer en fonction de leur charge propre ; à des protéines différentes correspondront des vitesses de migration elles-mêmes différentes.

Tel est, brièvement énoncé, le principe de l'électrophorèse.

Dès 1886, l'Anglais Lodge signalait que les particules dispersées d'une solution colloïdale étaient sensibles à l'influence du champ électrique. Divers travaux allaient ensuite être consacrés à l'étude théorique des propriétés électrochimiques des molécules protéiques elles-mêmes. Une étape im-

portante dans l'application du phénomène devait être franchie en 1937 lorsque le physicien suédois Tiselius (devenu Prix Nobel de Chimie en 1948) mit au point son dispositif d'électrophorèse en phase liquide.

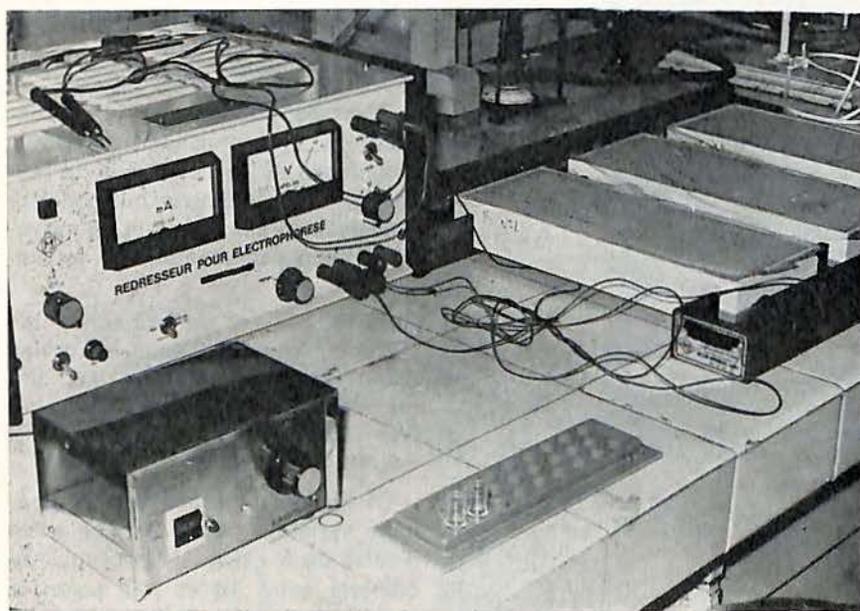
Cette technique allait permettre d'importants progrès dans la connaissance des caractéristiques physico-chimiques de ces molécules fort complexes que sont les protéines. Sa mise en œuvre réclamait toutefois beaucoup de temps et un appareillage très coûteux.

L'apparition, vers les années 1948-1950 d'une nouvelle technique d'électrophorèse dite de zone ou sur support, allait ouvrir considérablement les possibilités pratiques d'application du phénomène. Les principes généraux de ce procédé restent les mêmes que dans la méthode de Tiselius, mais la phase liquide dans laquelle se déplacent

les protéines est remplacée par un support solide imprégné de liquide. Divers types de supports ont été utilisés : le papier, les gels d'agar, de gélatine, d'amidon, et plus récemment, les gels de polyacrylamide et les membranes d'acétate de cellulose. Ces divers supports présentent des degrés de porosité ou de réticulation différents, ce qui explique que la migration des molécules protéiques soit conditionnée non seulement par leur charge électrique, mais aussi par leur forme et leur taille.

La biologie clinique fut la première et la principale bénéficiaire de l'électrophorèse sur support : non seulement la méthode, facile à mettre en œuvre, se prêtait à des déterminations de série, mais les protéines des divers milieux biologiques étudiés (sérum, plasma, liquide céphalo-rachidien...) se trouvaient naturellement en solution. La similitude remarquable des protéinogrammes fournis par les sujets normaux allait inciter les médecins à étudier les altérations provoquées par différentes maladies. C'est ainsi que l'étude des globulines sériques, et notamment des γ -globulines, a considérablement fait progresser les connaissances dans les affections cardio-vasculaires, hépatiques, rénales et tumorales...

L'application de l'électrophorèse sur support aux protéines végétales ne devait être ni aussi rapide, ni aussi spectaculaire. La plupart de ces protéines sont présentes à l'état fortement condensé dans les tissus de réserve tels que les graines et, de ce fait, particulièrement difficiles à solubiliser. C'est le cas notamment des protéines constituantes du gluten du grain de blé. On a admis pendant longtemps que



Équipement de laboratoire pour électrophorèse des gliadines

la fraction gliadine soluble dans l'alcool et la fraction gluténine soluble dans les bases, représentaient les deux seules entités protéiques homogènes composant le gluten.

L'électrophorèse sur support a permis de démontrer que chacune de ces fractions était en réalité un mélange très complexe de protéines différentes.

C'est vers les années 1960 que se situent nos premières tentatives de fractionnement des gliadines du blé par électrophorèse ; nous utilisons alors un support papier qui nous permettait de caractériser péniblement 3 à 4 bandes protéiques. Vers la même époque, le Dr Coulson nous faisait part des résultats très améliorés qu'il avait obtenus dans son laboratoire d'Edimbourg en utilisant comme support un gel d'amidon, technique introduite vers 1957-58 par Smithies. Bénéficiant de l'expérience acquise par Coulson, ces premiers travaux devaient aboutir d'abord en 1963 à la présentation d'une note devant l'Académie des Sciences, en 1965 à la soutenance d'une thèse (Feillet),

puis en 1966 à la publication d'un mémoire montrant que l'hétérogénéité électrophorétique des gliadines constituait un caractère spécifiquement génétique, non influencé par les conditions culturales ou les facteurs du milieu.

S'il était alors facile de constater que les diagrammes gliadines obtenus étaient qualitativement différents d'une variété à l'autre, on se heurtait toutefois à la difficulté d'en tirer une interprétation exploitable au plan pratique.

Les fractionnements obtenus au cours des dix dernières années par différentes équipes américaines, soviétiques, anglaises et hollandaises, avec des qualités de résolution d'ailleurs variables, ont été surtout utilisés à des fins de biochimie fondamentale, en dehors de toute préoccupation appliquée.

C'est à partir de 1971, au terme d'un important travail concluant à la non spécificité génétique des histones, autres types protéiques présents dans le blé, que l'un de nous (Autran) devait reprendre le problème des gliadines.

Après avoir amélioré la reproductibilité de la méthode par une étude systématique des différents paramètres expérimentaux, il entreprit l'analyse de plus de 400 variétés de blés tendres et durs, représentatives des principales productions françaises, européennes et mondiales. Par des essais répétés, il établit ainsi pour chaque variété un « diagramme type » rendant compte à la fois de la mobilité et de la concentration relative des différents composants protéiques, permettant ainsi de différencier significativement les variétés entre elles.

Actuellement, seuls les travaux de l'équipe australienne du CSIRO à North-Ryde se situent sur le même plan pratique que les nôtres et commencent à être vulgarisés.

Dans son principe, la méthode élaborée par notre laboratoire consiste à extraire directement du grain les protéines du gluten du type gliadines, à les déposer telles quelles dans un support gélifié à base d'amidon, puis à les séparer les unes des autres sous l'action d'un champ électrique.

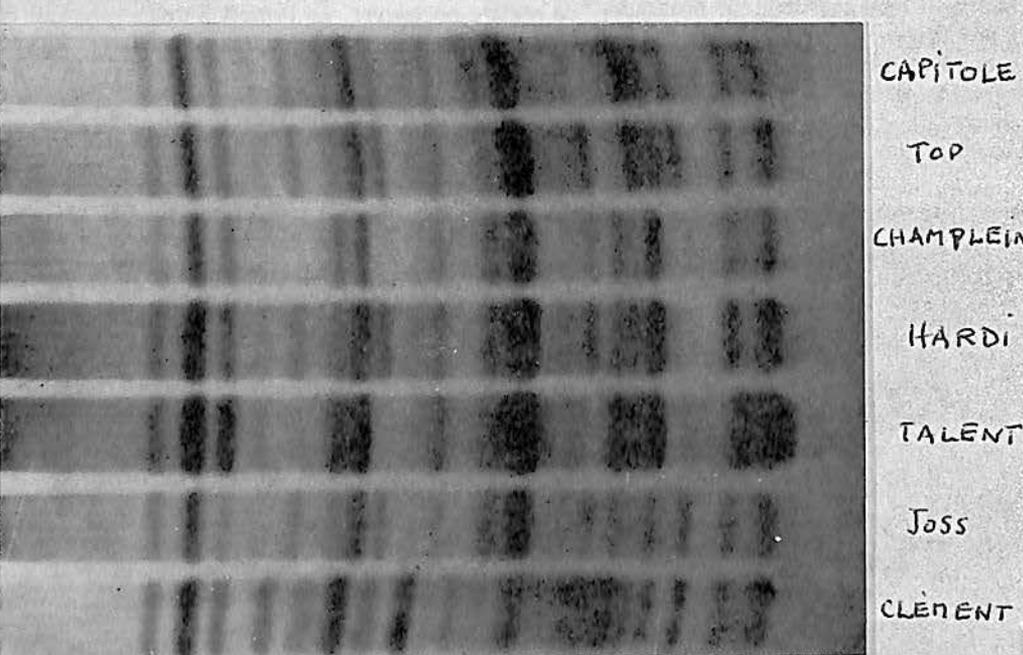
Le diagramme électrophorétique obtenu après révélation des différents composants protéiques est caractéristique de chaque variété et totalement indépendant des conditions de développement de la plante (sol, climat, fertilisation, traitements culturaux, etc.).

Les électrophorogrammes des grains composant un lot de blé permettent donc de déterminer avec certitude l'identité des variétés qui le constituent.

Diverses publications (cf bibliographie) ont précisé les détails techniques et les conditions de réalisation de la méthode qui consiste à analyser grain par grain un micro-échantillon représentatif du lot initial.

Lorsqu'il s'agit de lots constitués d'une seule variété, tous les grains du lot doivent fournir un diagramme identique et, en principe, l'analyse d'un seul grain pris au hasard devrait être suffisante.

En réalité, on confirme l'homogénéité variétale du lot sur une prise d'essai de N grains, N pouvant être compris entre 10 et 100, selon la précision désirée. Si la variété est



ELECTROPHORÉGRAMMES GLIADINES
de quelques variétés françaises courantes

préalablement connue, l'analyse est faite comparativement à un témoin. Si la variété est inconnue, son identité est précisée en s'aidant de la clé de détermination établie à cet effet.

Si l'on se réfère aux règles de probabilité, la similarité de l'ensemble des diagrammes obtenus ne permet pas toutefois de conclure que le lot considéré est intégralement exempt de toute autre variété. En revanche, la présence de diagrammes ne correspondant pas à la variété annoncée, est considérée comme significative, même après analyse d'un nombre limité de grains et prouve de façon irréfutable que le lot n'est pas variétalement pur.

Lorsque, cas le plus fréquent, on est en présence d'un lot constitué de plusieurs variétés en mélange, l'analyse électrophorétique grain par grain permet, non seulement d'identifier les variétés composantes, mais aussi d'en estimer les proportions respectives.

Si, par exemple, l'analyse d'un micro-échantillon de 50 grains conduit à caractériser 30 grains Capitole, 15 grains Hardi et 5 grains Clément, on peut, en première déduction, fixer à 60 %, 30 % et 10 % les proportions respectives de ces trois variétés.

En fait, les pourcentages ainsi obtenus, ne peuvent être considérés comme des valeurs exactes, mais, comme pour toute analyse de populations, comme des valeurs approchées se situant dans les limites d'une certaine « fourchette » dite « intervalle de confiance », pour un niveau donné de probabilité.

Des résultats précédents, on peut simplement conclure, avec 95 chances sur 100 d'exprimer la réalité, que la proportion de Capitole est comprise entre 45 et 74 %, celle de Hardi entre 18 et 45 % et celle de Clément entre 3 et 22 %.

Selon le nombre de grains examinés et le niveau de probabilité que l'on se fixe, les valeurs extrêmes de chaque fourchette peuvent être calculées à partir de tables statistiques.

Dans les contrats qui pourront intervenir entre meuniers et pro-

ducteurs ou stockeurs deux types de clauses peuvent être envisagés : soit l'achat sur variétés définies, soit l'achat à l'exclusion de certaines variétés.

Supposons dans le premier cas que le lot considéré doit contenir au moins 80 % des deux variétés Capitole et Hardi et que l'analyse électrophorétique de 50 grains conduise à identifier 40 grains de ces deux variétés, on pourra simplement conclure que le taux probable de Capitole + Hardi dans le lot sera compris entre 66 et 90 %.

Si, inversement, les clauses prévoient l'exclusion d'autres variétés et si l'électrophorèse démontre que ces variétés sont néanmoins présentes dans le lot, on en conclura nécessairement que ces clauses n'ont pas été respectées.

Il suffira, par exemple, en analysant un échantillon de 10 grains, de détecter au moins 3 grains des variétés exclues pour affirmer que leur taux sera supérieur à 5 % (fourchette 7 à 65 %). A partir d'un échantillon de 50 grains, la présence d'au moins 6 grains des variétés indésirables, permettra à coup sûr de formuler la même conclusion, avec des écarts de fourchette plus limités (5 à 24 %).

Dans l'éventualité où les clauses d'un contrat imposeraient une teneur du lot en variétés exclues inférieures à 5 %, il y aura lieu d'appliquer l'électrophorèse à un micro-échantillon d'au moins 100 grains et de ne pas détecter plus de 1 grain d'une variété exclue, ce qui correspondra à une teneur probable du lot comprise entre 0 et 5 %.

Si la méthode électrophorétique permet à coup sûr de contrôler la composition variétale qualitative et quantitative d'un lot de blé, elle ne fournit évidemment aucune indication sur la qualité de ce lot.

En outre, elle ne peut être utilisée pour une reconnaissance instantanée à la livraison, mais uniquement comme moyen de contrôle a posteriori. Le fait qu'elle sera surtout utilisée comme méthode d'expertise devrait la rendre néanmoins suffisamment dissuasive pour qu'elle contribue indirectement mais

efficacement à la valorisation de notre production en blés de panification.

INFORMATIONS PRATIQUES

Conscients de l'intérêt qu'a déjà suscité dans divers secteurs, et notamment près de la meunerie, l'apparition de cette méthode moderne permettant d'identifier les variétés de blé, nous nous sommes déjà préoccupés de sa diffusion dans les milieux professionnels. C'est ainsi qu'entre décembre 1975 et avril 1976, notre laboratoire, sous le couvert de l'Association pour la Formation Professionnelle dans les Industries Céréalières (AFPI-Céréales), a organisé quatre stages d'initiation et de formation théorique et pratique.

Il est prévu que ces stages, dont l'INRA restera responsable, seront repris ultérieurement dans des délais et sous une forme non encore précisés.

A notre connaissance, trois ou quatre laboratoires professionnels seulement sont actuellement en mesure de pratiquer la méthode dans des conditions satisfaisantes. Il est évident qu'une telle situation ne permet pas pour l'immédiat de répondre aux besoins en analyse qui vont en s'accroissant à l'approche de la prochaine récolte. Il est donc urgent que les professions concernées se préoccupent de développer les possibilités actuelles dans le domaine de la formation professionnelle.

Pour ce qui concerne la meunerie, il apparaîtrait peu réaliste que chaque moulin, quelle que soit son importance, envisage de pratiquer cette nouvelle méthode pour son propre compte : l'électrophorèse, outre le fait de pouvoir disposer d'un laboratoire, implique l'intervention d'un personnel suffisamment qualifié possédant un minimum de connaissances de base. On peut, en revanche, concevoir au niveau du département ou de la région, l'implantation de laboratoires professionnels qui assureraient les analyses pour le compte d'un groupe plus ou moins large d'entreprises.

Dans les conditions où elle est actuellement pratiquée, l'électrophorèse nécessite les équipements suivants (*) :

— 1 diviseur d'échantillons à rifles	2.000 F
— 1 générateur de courant stabilisé 0 - 450 V - 0 à 200 mA.	4.500 F
— 2 jeux de 4 cuves à gel (chaque cuve permet l'analyse de 8 grains)	1.500 F
— 2 bacs à électrodes (pour 4 cuves)	780 F
— 1 homogénéiseur pour préparation gel	50 F
— petit matériel de labo	170 F
	9.000 F TTC

Sur la base d'un amortissement réparti sur 5 ans et à raison de 200 journées de travail/an, le coût journalier de l'équipement équivaut à 10 francs.

Si l'on prend, d'autre part, comme base l'analyse de 100 grains, l'équipement décrit permet de tester 32 grains par jour (4 cuves de 8 grains) soit pour 100 grains (en fait 96 grains) trois jours de travail pour un opérateur.

On peut estimer, par ailleurs, à 50.000 F/an (salaires + charges) les dépenses de personnel correspondant à un bon technicien.

Sur la base de 200 journées de travail/an, les frais de personnel par jour seront de 250 F, soit pour trois jours nécessaires à l'analyse de 100 grains : 750 F.

Les frais de fonctionnement (amidon spécial, produits chimiques divers, etc.) peuvent être évalués à 10.000 F/an, ce qui équivaut à une dépense d'environ 50 F pour chaque série de 100 grains.

Dans les conditions actuelles, le prix de revient d'une analyse pour 100 grains s'établira donc en définitive de la façon suivante :

— personnel 3 x 250 F ..	750 F
— équipement 3 x 10 F ..	30 F
— fonctionnement	50 F
	830 F

La firme internationale Technicon, spécialisée dans les problèmes d'automatisation et qui s'est intéressée à la méthode, termine la construction d'un prototype qui pourra être commercialisé à partir de novembre 1976.

(*) Les personnes désirant connaître les références des fournisseurs de ces équipements pourront appeler le Laboratoire de l'INRA à 535.54.72.

L'appareil a été conçu de telle sorte que plusieurs étapes du protocole expérimental ont été à la fois semi-automatisées et abrégées. L'équipement lui-même, qui comporte, outre le générateur, un bloc de 4 cuves permettant de recevoir chacune 13 dépôts, offre la possibilité d'analyser simultanément $4 \times 13 = 52$ grains dans un délai de 5 heures, la durée de l'électrophorèse proprement dite étant elle-même de 2 h 30. En ordonnant les opérations dans le temps, deux séries de 52 grains (soit 104 grains) peuvent être analysées par un même opérateur dans la même journée.

Le coût de l'équipement complet serait de l'ordre de 83.000 F (TTC).

Il convient d'y ajouter le coût du diviseur à rifles (2.000 F) pour la préparation du micro-échantillon, ce qui porterait le prix total de l'équipement nécessaire à 85.000 F.

Pour un amortissement réparti sur 5 ans et à raison de 200 jours de travail/an, on aboutit à un coût journalier de 85 F.

En fixant comme précédemment les dépenses journalières en personnel à 250 F et celles de fonctionnement à 50 F, cette formule impliquerait donc, sur la base de 100 grains analysés, un coût journalier de 385 F ainsi répartis :

— personnel	1 x 250 F
— équipement	1 x 85 F
— fonctionnement	50 F
	385 F

Avec ce nouvel équipement, le prix de revient des analyses sur une base de 100 grains représenterait moins de la moitié de celui de la méthode de laboratoire actuellement pratiquée.

Précisons enfin que l'emploi de cette nouvelle méthode pour le contrôle de la composition variétale des lots de blé au niveau du commerce, n'a pour l'instant aucun caractère officiel. Sa validité est cependant reconnue par l'Association Nationale de la Meunerie Française ainsi que par le Groupement des Associations Meunières des pays de la CEE. Son officialisation éventuelle, dans des délais qu'il est actuellement difficile de préciser, impliquera la mise en place, au moins au plan national, de laboratoires suffisamment compétents, capables d'assurer les analyses de contrôle que ne manquera pas de provoquer la nouvelle réglementation arrêtée par les instances de Bruxelles pour différencier les lots de blé panifiables des lots fourragers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUTRAN J. C. et BOURDET A., 1975. — Nouvelles possibilités de contrôle variétal qualitatif et quantitatif dans les lots de blés commerciaux. C.R. Acad. Agric., 11 juin, 661-669 ; Techn. Ind. Céréali., n° 150, 7-13.
- AUTRAN J. C. et BOURDET A., 1975. — L'identification des variétés de blé : établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain. Ann. Amélior. Plantes, 25 (3), 277-301.
- AUTRAN J. C., 1975. — Identification des principales variétés communautaires de blé tendre par électrophorèse des gliadines du grain. Bull. Anc. E.F.M., n° 270, 3-11.
- BOURDET A., 1976. — Un symposium INRA - Meunerie européenne. L'identification des variétés de blé par électrophorèse. Meunerie Française, n° 322, 15-21.
- AUTRAN J. C., 1976. — Nouvelles possibilités d'identification des variétés de céréales dans les lots commerciaux par électrophorèse des prolamines du grain. 9^e Congrès de l'Association Internationale de Chimie Céréalière, 12-14 mai à Vienne (Autriche).
- BOURDET A. et AUTRAN J. C., 1976. — Elektrophoretische Bestimmung des Gliadins zur Erkennung von Weizenmischungen. 27 Getreidechemiker Tagung 18-20 Mai - Detmold (Allemagne Fédérale).