

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE



LABORATOIRE DE TECHNOLOGIE

DES BLES DURS ET DU RIZ

9 Place Viala

34060 MONTPELLIER Cedex

Tél. (67) 63 18 38

**MANUEL D'INSTRUCTIONS SUR LA TECHNIQUE
D'IDENTIFICATION DES VARIETES DE BLE
PAR ELECTROPHORESE DES GLIADINES**

1° Partie: *Electrophorèse amidon*

2° Partie: *Electrophorèse polyacrylamide*

Jean - Claude AUTRAN

Février 1979

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

INSTITUT NATIONAL

DE LA

RECHERCHE AGRONOMIQUE

LABORATOIRE DE TECHNOLOGIE
DES BLES DURS ET DU RIZ

9 Place Viala

34060 MONTPELLIER CEDEX

Tél. (67) 63 18 38

MANUEL D'INSTRUCTIONS SUR LA TECHNIQUE
D'IDENTIFICATION DES VARIETES DE BLE
PAR ELECTROPHORESE DES GLIADINES

1° PARTIE : ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON

2° PARTIE : ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

PAR JEAN-CLAUDE AUTRAN

FÉVRIER 1979

I N T R O D U C T I O N

ANCIENNES METHODES DE RECONNAISSANCE DES VARIETES DE BLE

Nous rappelons ci-dessous brièvement les anciennes méthodes qui ont été proposées pour résoudre le problème de l'identification des variétés de blé.

- Caractères botaniques de la plante (port, pilosité des feuilles, aspect de l'épi, couleur des anthères) ou de la plantule (pilosité de la première ou de la deuxième feuille, coloration du coléoptile en lumière artificielle).

- Critères physiologiques : réponse de la plante à certains fongicides ou à l'acide gibbérélique.

- Caractères morphologiques et physiques du grain : rapports longueur/largeur, longueur de la brosse/longueur du grain, longueur du scutellum/longueur du grain ; couleur (roux ou blanc), texture (vitreuse ou farineuse), dureté, poids de 1000 grains.

- Critères chimiques : coloration par l'acide phénique.

- Critères technologiques : caractéristiques de la courbe alvéographique Chopin.

Plusieurs de ces méthodes conservent, aujourd'hui encore, toute leur valeur, notamment en raison de leur simplicité, mais elles présentent différents types d'inconvénients :

- faible spécificité : distinction de classes de variétés et non de variétés uniques (cas de la coloration à l'acide phénique ou de la coloration du coléoptile).

- dépendance à l'égard des facteurs agro-climatiques (caractères morphologiques du grain).

- inapplicabilité dans le commerce des grains ou des produits de leur mouture (cas des caractères botaniques de la plante ou de la plantule).

D'où l'insuffisance de ces différents tests classiques pour identifier avec précision un lot inconnu de grains et la nécessité d'avoir recours à des méthodes très spécifiques, applicables immédiatement au niveau du grain et fondées sur des caractères génétiquement stables.

POURQUOI UTILISER L'ELECTROPHORESE POUR IDENTIFIER LES VARIETES ?

On a pensé à utiliser des caractères physico-chimiques du grain, notamment au niveau des protéines, parce que :

- d'une part, la structure des protéines est extrêmement complexe et offre des possibilités en nombre quasi infini.

- d'autre part, cette structure est étroitement associée au patrimoine héréditaire des blés et elle peut constituer, particulièrement dans le cas des protéines de réserve de type gliadine, un véritable marqueur génétique exploitable pour identifier les genres, espèces et variétés.

Les protéines naturelles n'ont cependant jamais une composition simple et sont toujours, en réalité, des mélanges très complexes d'espèces moléculaires différentes. Toute étude des protéines passe donc nécessairement par des techniques de fractionnement telles que la chromatographie, l'électrophorèse, l'électrofocalisation, etc...

Actuellement, c'est l'électrophorèse qui paraît présenter le maximum d'avantages, tant au plan de la finesse et de la reproductibilité des résultats qu'au plan de la simplicité et du coût de la mise en oeuvre.

PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est une technique de fractionnement d'un mélange de protéines fondée sur les différences de charge électrique et d'encombrement moléculaire entre les constituants du mélange. Soumise à un champ électrique, une protéine naturelle donne ainsi généralement un diagramme de composants parallèles (bandes électrophorétiques), pouvant être caractérisés par leur position (mobilité électrophorétique) et leur intensité.

Appliquée à la fraction gliadine du grain de blé (blé tendre ou blé dur), l'électrophorèse permet d'obtenir un diagramme de séparation constitué d'une vingtaine de sous-unités différentes.

Ce diagramme constitue une véritable caractéristique variétale, une "empreinte digitale" de la variété, et a été reconnu comme totalement indépendant des conditions culturales ou des facteurs du milieu. D'où la possibilité d'identifier les variétés à partir de ces diagrammes gliadines.

On rappelle que les gliadines, caractérisées par leur solubilité dans les alcools dilués, représentent 40 % des protéines de l'albumen du grain de blé et qu'elles constituent, au sein du gluten, une fraction plus particulièrement responsable de l'extensibilité de la pâte. Dans les solutions acides utilisées pour l'électrophorèse, toutes les sous-unités gliadines sont chargées positivement et, sous l'effet d'un champ électrique, elles se déplacent donc vers l'électrode négative. Cependant, chaque sous-unité possède une vitesse de migration qui lui est propre, de sorte qu'après un déplacement de quelques heures dans le champ électrique, une séparation se réalise et le diagramme caractéristique de la variété peut être révélé.

Dans le cas d'un lot variétalement pur, la méthode est appliquée à une mouture de grains et l'interprétation visuelle du diagramme permet, grâce à une clé de détermination, d'identifier la variété du lot. Dans le cas d'un mélange, de variétés, l'identification est au contraire réalisée grain par grain sur un micro échantillon représentatif, ce qui permet de connaître, dans la limite d'un intervalle de confiance, les pourcentages des différentes variétés composantes du lot.

LES SUPPORTS D'ELECTROPHORESE

Le fractionnement électrophorétique se réalise lorsqu'on introduit des protéines dans un support hydraté soumis à un champ électrique. Il y a différents supports possibles (acétate de cellulose, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, gel d'agar, papier, ...) et selon le type de protéine étudié on s'oriente vers le type de support que l'on juge le plus favorable.

En ce qui concerne les gliadines, le support le plus largement utilisé jusqu'ici a été le gel d'amidon. Les conditions expérimentales utilisant ce support sont décrites dans la première partie du manuel : "Electrophorèse en gel d'amidon".

Plus récemment, une formule de gel de polyacrylamide a été mise au point pour le fractionnement des gliadines. D'où l'objet de la deuxième partie du manuel : "Electrophorèse en gel de polyacrylamide".

Les utilisateurs ont donc actuellement le choix entre deux techniques différentes d'électrophorèse pour identifier les variétés de blé. Chacune d'elles présente évidemment des avantages et des inconvénients que nous avons tenté de regrouper dans les Tableaux 1 et 2.

TABLEAU 1 : Avantages et inconvénients du gel d'amidon pour l'électrophorèse des gliadines

AVANTAGES

- Premier support à avoir permis une résolution élevée des gliadines.
- Equipement simple, ne nécessitant pas de système de refroidissement.
- Bonne résolution des fractions oméga.
- Support biologique, non toxique.

INCONVENIENTS

- Résolution influencée par les conditions de chauffage et d'agitation.
- Difficulté de fabriquer des gels de consistance uniforme et reproductible.
- Gels fragiles et difficiles à manipuler.
- Support sensible à l'action des amylases de l'échantillon.
- Précourant généralement nécessaire.
- Nécessité de découper le gel pour le colorer.
- Valeurs de densitométrie discutables.
- Résolution médiocre des fractions alpha.
- Nécessité d'avoir des extraits concentrés : dépôts au moyen de papiers filtres.
- Plusieurs variétés ne sont pas différenciables.

TABLEAU 2 : Avantages et inconvénients du gel de polyacrylamide pour l'électrophorèse des gliadines

AVANTAGES

- Facile à couler et à manipuler.
- Temps de l'expérience et de la coloration plus courts.
- Plus grande sensibilité dans la détection des bandes.
- Possibilité de colorer le gel sans le découper.
- Valeur de densitométrie davantage fiables.
- Bonne résolution des fractions alpha.
- Support insensible à l'action des amylases de l'échantillon.
- Possibilité de différencier davantage de variétés.

INCONVENIENTS

- Toxicité de l'acrylamide non polymérisé et de l'acide trichloracétique.
- Perte progressive de la coloration des diagrammes au Bleu de Coomassie.

Dans l'avenir, cependant, nous pensons que le gel de polyacrylamide - pour des raisons de maniabilité, ainsi que de qualité et de régularité des diagrammes - devrait se substituer progressivement au gel d'amidon pour l'identification des variétés de blé.

OBSERVATIONS PRELIMINAIRES SUR LES DIAGRAMMES ELECTROPHORETIQUES

Lors d'expériences réalisées dans des conditions parfaitement identiques la mobilité électrophorétique d'une protéine apparaît reproductible. Cette mobilité électrophorétique ne doit cependant pas être considérée comme une constante chimique de la protéine (comme pourrait l'être le point de fusion, la densité, ou l'indice de réfraction d'un corps pur).

En effet, la mobilité est fonction à la fois de la charge électrique nette et de l'encombrement moléculaire de la protéine. La charge électrique elle-même, résultante de l'ionisation des différents acides aminés chargés situés à la surface de la molécule, varie nécessairement en fonction du pH du milieu. Le facteur encombrement moléculaire, déjà plus ou moins influencé par la présence d'agents dissociants (urée) dans le milieu peut aussi avoir un effet déterminant sur la séparation de certaines bandes selon le pouvoir séparateur du gel. Or ce pouvoir séparateur, lié à la réticulation du gel, dépend non seulement de sa concentration en amidon (ou en acrylamide) mais aussi des conditions de sa préparation : température de gélification, cinétique de chauffage et de refroidissement, agitation, ... (dans le cas du gel d'amidon), degré de "cross-linking", type de réaction de polymérisation, quantité et type de catalyseur (dans le cas du gel de polyacrylamide).

Le diagramme gliadine d'une variété ne peut donc être reproductible que dans des conditions expérimentales bien déterminées. Toute modification du protocole expérimental (pH du tampon, structure du gel, type d'appareillage, temps de la migration, voltage, ...) est donc susceptible d'entraîner des variations plus ou moins apparentes dans le diagramme obtenu. Il y a à cela plusieurs séries de conséquences :

- Pour permettre d'utiles comparaisons entre laboratoires, il est important que dans tout système électrophorétique choisi (amidon ou polyacrylamide), un protocole expérimental très précis soit défini et que chaque utilisateur le respecte aussi rigoureusement que possible. On rappelle d'ailleurs que la "Clé de détermination ITCF - INRA des variétés" a été établie à partir de diagrammes obtenus dans les conditions actuelles (décrites dans ce document) et que tout laboratoire qui travaillerait dans des conditions différentes risquerait de rencontrer des difficultés, ou de commettre des erreurs, en utilisant la clé de détermination.

- Les conditions présentement retenues pour l'électrophorèse en gel d'amidon intègrent de nombreuses observations réalisées durant des années d'expérimentation. Pour plusieurs paramètres, on a vraisemblablement atteint un certain optimum et il est donc assez improbable que des modifications de la technique se traduisent par d'importantes améliorations dans les diagrammes. Il ne convient pas pour autant que la technique soit définitivement figée mais simplement que tout projet d'amélioration - surtout s'il doit entraîner des remaniements de la clé de détermination - soit largement discuté avant d'être adopté et diffusé, par exemple dans le cadre des circuits BIPEA "Electrophorèse des gliadines".

- La fraction gliadine est en réalité beaucoup plus complexe que ce qu'il ressort d'un simple fractionnement électrophorétique. On considère actuellement que chaque variété renferme, au minimum, 50 à 60 composants gliadines différents, alors qu'un diagramme d'électrophorèse, obtenu à un pH déterminé, permet simplement d'en déceler une vingtaine. La majorité des bandes observées renferme donc deux ou plusieurs espèces moléculaires différentes, non séparées dans les conditions utilisées, mais susceptibles de se séparer ou de se répartir différemment, si les conditions sont légèrement modifiées. Par ailleurs, dans le souci de simplifier l'interprétation des diagrammes, des bandes de mobilités apparemment identiques ont été initialement répertoriées sous le même numéro, mais sans que cela signifie une identité réelle entre ces protéines. Il n'est donc pas surprenant que deux composants appartenant, par exemple, l'un à un blé tendre, l'autre à un blé dur et ayant fortuitement la même mobilité, puissent ultérieurement "diverger" et devenir différenciables, suite à un changement mineur du protocole expérimental.

- Il ne faut donc jamais perdre de vue qu'un diagramme gliadine ne peut être utilisé comme référence que dans le cadre d'un protocole expérimental déterminé. Aucun diagramme gliadine ne peut avoir en soi valeur de référence absolue. Les électrophorégrammes variétaux fournis à la fin de ce document sont donc que purement indicatifs et illustrent simplement ce que l'on peut ordinairement obtenir dans les conditions actuelles de la technique.

DIAGRAMMES GLIADINES ET QUALITE DES BLES

On rappelle que l'électrophorégramme gliadine est avant tout un marqueur de la variété. Il ne doit être utilisé que comme tel chez les blés tendres où aucune relation étroite entre le diagramme et la qualité d'une variété n'a encore été mise en évidence avec certitude.

On signale par contre que, chez les blés durs, une relation entre le type de diagramme gliadine et les propriétés visco-élastiques du gluten (elles-mêmes associées à la qualité intrinsèque des variétés) vient d'être récemment démontrée (DAMIDAUX et coll., 1978). Dans le cas des blés durs, la technique d'électrophorèse des gliadines peut donc être utilisée également pour l'appréciation de la qualité, notamment au niveau de la sélection.

PREMIERE PARTIE : ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON

1.1 - DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA TECHNIQUE

L'extraction de la fraction gliadine est réalisée soit à partir d'une mouture de grains ou d'une farine (cas des variétés pures), soit grain par grain (cas des variétés en mélange), par simple contact dans un solvant alcoolique.

Le milieu dans lequel les gliadines sont séparées est un gel d'amidon, spécial pour électrophorèse, préparé à partir d'un empois d'amidon que l'on coule et que l'on laisse refroidir dans un moule.

Après une phase dite de précourant destinée à éliminer certaines impuretés, les différents échantillons peuvent être déposés dans le gel au moyen de rectangles de papier filtre imbibés chacun d'un extrait gliadine. L'électrophorèse proprement dite commence avec l'application du champ électrique : les protéines migrent alors dans le gel, de l'électrode positive vers l'électrode négative et se séparent.

A la fin de l'électrophorèse, comme le diagramme est toujours plus net à l'intérieur du gel qu'à sa surface, on découpe le gel dans son épaisseur et on révèle les bandes gliadines (initialement invisibles) en immergeant la partie inférieure dans un colorant spécifique des protéines : la nigrosine. Le gel est enfin lavé pour éliminer l'excès de colorant et le diagramme est alors prêt pour l'interprétation. Actuellement, celle-ci est réalisée visuellement, soit à partir du gel lui-même, soit sur une photographie.

1.2 - EQUIPEMENTS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

a - Equipements

- Alimentation stabilisée pour électrophorèse, permettant de délivrer (au minimum) 400 volts sous (au minimum) 80 mA. Les modèles suivants conviennent parfaitement :

SEBIA DG 250 (BIOBLOCK) (500 V - 500 mA)
ISCO 1420 (ROUCAIRE) (400 V - 80 mA)
APELEX ST 3 D (450 V - 200 mA)
GILSON G 500 (500 V - 100 mA)
GELMAN 38250 (500 V - 100 mA) ou 38207 (500 V - 125 mA)
BIORAD 500 (500 V - 200 mA)
PHARMACIA EPS 500/400 (500 V - 400 mA)

Tout modèle ayant des performances supérieures, comme le LKB 2103 (2000 V - 200 mA), le ISCO 493 (1000 V - 400 mA), ou le PHARMACIA ECPS 2000/3000, peut évidemment être utilisé. A titre d'information, un appareil délivrant 80 mA peut permettre d'alimenter au maximum : 3 gels en parallèle contenant en moyenne 8 échantillons chacun, soit 24 échantillons, un appareil délivrant 200 mA : 64 échantillons et un appareil délivrant 400 mA : 128 échantillons.

- Appareil d'électrophorèse AMIDOPHOR, réf. O.S.I. 79.130.000, comprenant : cuvette pour gel (315 x 120 x 8 mm) permettant l'analyse de 6 à 10 échantillons, enceinte plexiglas avec bacs à électrodes de platine et couvercle. On peut également se limiter à l'achat des cuvettes ci-dessus (réf. 79.100.17) en les adaptant aux bacs à électrodes APELEX CT 60 B qui permettent de conduire simultanément 3 ou 4 gels. Un croquis de ces cuvettes est donné Figure 1. Des cuvettes plus larges (315 x 200 x 8 mm) permettant le dépôt d'au moins 13 échantillons existent également (APELEX).

- Plaques de verre : format 290 x 119 mm (ou 290 x 199 mm), épaisseur 2 mm, à adapter aux cuvettes AMIDOPHOR (ou APELEX). Un verre de type dépoli permet une meilleure adhérence du gel d'amidon, notamment au niveau de la coloration et de la décoloration.

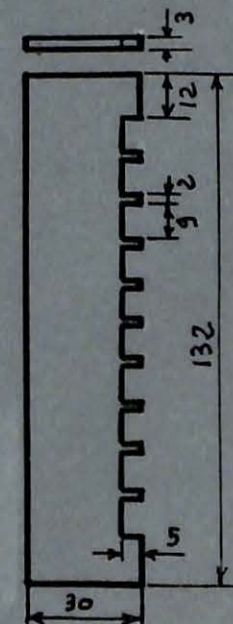
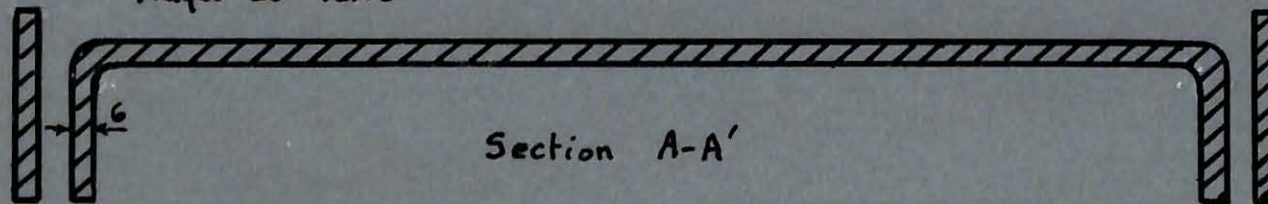
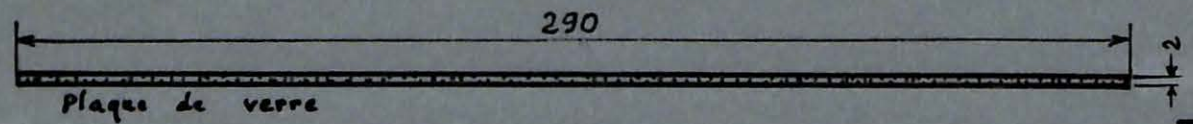
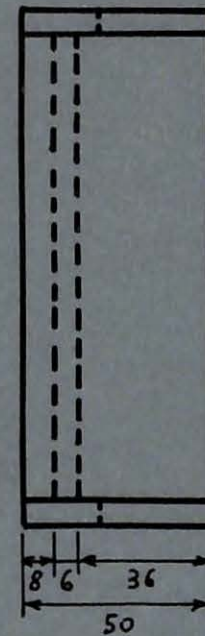
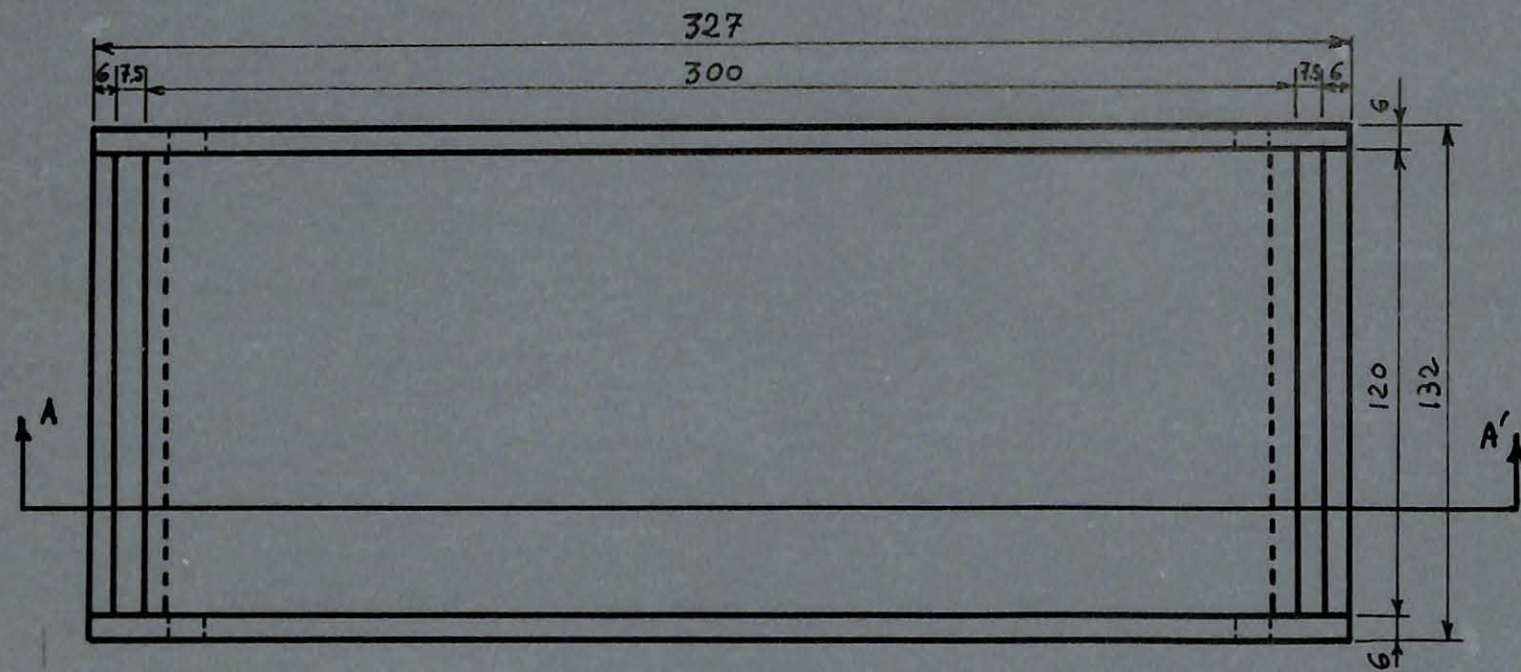
- Centrifugeur permettant de centrifuger de petits volumes (tubes de 6 ou de 15 ml, ou éventuellement des godets plastiques de 2 ml). Un simple centrifugeur de paillasse (3500 t/mn) type JOUAN BB ou STELLA R (APELEX) est suffisant.

- Tubes à centrifuger de 6 ou de 15 ml, ou tubes à hémolyse.

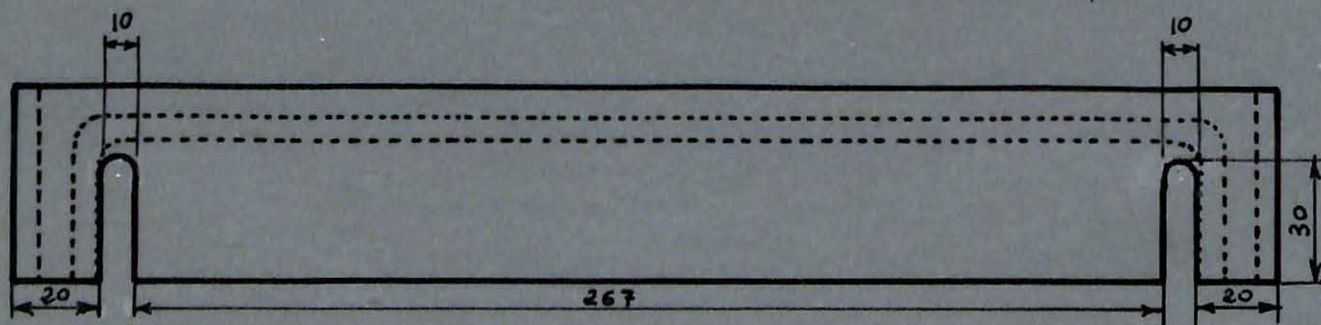
- Godets d'auto-analyseurs, jetables après usage, de 2 ml avec capes, type 311150 C (POLY LABO).

- Portoirs pour les tubes et les godets précédents, réf. RS 21 (POLY LABO).

- Diviseur d'échantillons à rifles ou conique (TRIPETTE ET RENAUD) ou répartition d'échantillons RETSCH type PTZ (LABO MODERNE).



10 crans de 5mm espacés de 2mm



Guide pour les fentes

Figure 1 : Schéma d'une cuvette Amidophon pour gel d'amidon

- Numigral micro diviseur (TRIPETTE et RENAUD).
- Broyeur à marteaux ou simple moulin à café.
- Mixer type MOULINEX 365.
- Niveau circulaire à bulle (BHV).
- Fil d'acier type "corde à piano", diam. 6/100 mm ou fil de pêche, nylon, diam. 6/100 mm.
- Contrôleur universel de tension METRIX modèle 462 ou 453 (PROLABO). Inutile si on dispose du générateur APELAB ST 3D.
- Fils électriques avec fiches mâles.
- Bistouris, type E(11) (POLY LABO).
- Papier WHATMAN n° 4 (PROLABO). A découper en rectangles de 12 x 5 mm, ou 10 x 5 mm, ou 9 x 5 mm (cf. ci-dessous § 1.6.b).
- Film plastifié SCELOFRAIS, SARAN WRAP ou similaire.
- Bacs TUPPERWARE, réf. A 15 (330 x 220 mm).
- Appareillage de photographie : appareil 24 x 36 mm à objectif macro, statif de prise de vue, lampes floods. Eventuellement, matériel de développement et de tirage des photos. Autre possibilité : appareil POLAROID permettant l'utilisation de films de type 52 (image de 9 x 11.5 cm).
- Matériel courant de laboratoire : balance, pipettes, fioles, éprouvettes, béchers, pinces, marteau, scalpels, baguettes de verre, ...

b - Produits chimiques

- Amidon hydrolysé pour électrophorèse CONNAUGHT (distribué par TOUZART et MATIGNON, O.S.I., APELEX).

- Lactate d'aluminium O.S.I., réf. 2405.

- Acide lactique pur (d = 1.24).

- Urée purifiée.

- Chloro-2-éthanol pur : $\text{CH}_2\text{Cl} - \text{CH}_2 \text{OH}$.

- Ethanol pur à 95° GL.

- Acide trichloracétique pur cristallisé.

- Chlorure mercurique pur.

- Nigrosine à l'eau Edward GURR (distribué par TOUZART et MATIGNON).

- Pyronine G PROLABO.

- Charbon animal.

- Eau distillée ou désionisée.

c - Références des fournisseurs

APELEX (Matériel d'électrophorèse), 29 rue Salvador Allende, 92220 BAGNEUX - Tél. 655.63.36.

B.H.V. (Bazar de l'Hotel de Ville), 1 rue des Archives, 75004 PARIS - Tél. 508.20.02.

BIORAD, distribué par TOUZART et MATIGNON.

BIOBLOCK Scientific, B.P. 111, 67047 STRASBOURG CEDEX, Tél. (88) 66 40 40

GELMAN (Electrophorèse), 14 boulevard Edouard Vaillant, 93300 AUBERVILLIERS - Tél. 834.91.80.

GILSON (Electrophorèse), 72 rue Gambetta, BP 5, 95400 VILLIERS-LE-BEL - Tél. 990.54.41.

GUILLEMINOT BOESFLUG et Cie (Photo), 22 rue de Chateaudum, 75009 PARIS - Tél. 878.42.07.

JOUAN, BP 403, 44608 SAINT-NAZAIRE CEDEX - Tél. (40) 22.01.01.

LABO MODERNE, 37 rue Dombasle, 75015 PARIS - Tél. 532.62.54.

L.K.B., 69 rue de Paris, 91400 ORSAY - Tél. 928.65.07.

O.S.I., 141-145 rue de Javel, 75739 PARIS CEDEX 15 - Tél. 533.74.87.

PHARMACIA, rue de Marly, Parly 2, BP 67, 78150 LE CHESNAY - Tél. 954.90.60.

POLY LABO P. BLOCK et Cie, 305 Route de Colmar, 67100 STRASBOURG MEINAU - Tél. (88) 39.13.10.

PROLABO, 12 rue Pelée, BP 200, 75526 PARIS CEDEX 11 - Tél. 355.44.88.

ROUCAIRE (Service ISCO), BP 65, 20 Avenue de l'Europe, 78140 VELIZY - Tél. 946.96.33.

TOUZART et MATIGNON, 8 Rue Eugène Hénaff, 94400 VITRY S/SEINE - Tél. 680.85.21.

TRIPETTE et RENAUD, 39 Rue J. J. Rousseau, 75039 PARIS CEDEX 01 - Tél. 231.21.45.

1.3 - PREPARATION DES SOLUTIONS

Il est important, notamment pour la qualité des diagrammes, que toutes les solutions (particulièrement le tampon d'électrophorèse, cf. § 1.3.c) soient préparées avec de l'eau parfaitement désionisée ou distillée. De même, la verrerie et tout particulièrement les bacs à électrodes et les cuvettes à gel doivent être, après nettoyage, soigneusement rincés à l'eau désionisée ou distillée.

a - Solution d'extraction des gliadines

C'est du chloro-2-éthanol à 25 % dans l'eau, contenant en outre 0,02 % de pyronine G PROLABO, soit par exemple, pour 1 litre de solution :

Chloro-2-éthanol pur	250 ml
Pyronine G PROLABO	200 mg
Eau désionisée q.s.p.	1000 ml.

Cette solution peut se conserver indéfiniment à la température du laboratoire. La pyronine qu'elle contient est un colorant destiné simplement à visualiser la migration sous l'effet du champ électrique. On a noté que les différentes pyronines du commerce ne renfermaient pas toujours les mêmes constituants, d'où la recommandation d'utiliser ici la pyronine G PROLABO, afin de faciliter les comparaisons entre laboratoires.

Habituellement, l'extraction est réalisée durant une nuit. Exceptionnellement, cette durée peut être réduite à 2 heures seulement, mais dans ce cas il convient d'ajouter à la solution d'extraction du chlorure mercurique (250 mg/litre) dans le but d'inhiber les bêta-amylases. La solution d'extraction ne doit alors pas se conserver au delà d'une semaine en raison de l'instabilité du sel mercurique.

b - Solution mère de lactate d'aluminium

Peser 54,55 g de lactate d'aluminium. Transvaser dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajouter 164 ml d'acide lactique (d = 1.24). Compléter à 1000 ml avec de l'eau désionisée.

On obtient 1 litre de solution mère qui peut se conserver indéfiniment à la température du laboratoire et qui a la composition suivante :

0,185 M en lactate d'aluminium ($\mu^* = 1.11$)
2.25 N en acide lactique
pH 2.05

* μ = force ionique.

c - Solution diluée de lactate d'aluminium (tampon d'électrophorèse)

On l'utilise à la fois pour préparer le gel et comme liquide des bacs à électrodes. Il doit être renouvelé à chaque expérience. On le prépare en diluant 250 fois, avec de l'eau désionisée, la solution mère et en y incorporant 0.5 M d'urée. Il est important, vu la très faible force ionique de ce tampon, que l'eau soit parfaitement désionisée ou distillée.

Pour préparer, par exemple, 5 litres de tampon on prendra :

Solution mère	20 ml
Urée	150 g
Eau désionisée q.s.p.	5000 ml

Ce tampon ne doit pas être conservé au delà d'une semaine à la température du laboratoire. Sa composition est la suivante :

- 0,00074 M en lactate d'aluminium ($\mu = 0.0045$)
- 0,0089 N en acide lactique
- 0.5 M en urée.

Le tampon ainsi préparé a habituellement un pH compris entre 3.15 et 3.25. Il peut arriver, notamment en raison de différences dans les lots d'urée, que le pH atteigne 3.30 ou 3.35. Il est cependant déconseillé dans ce cas de chercher à acidifier le tampon par addition supplémentaire d'acide lactique, la modification de force ionique entraînée risquant d'être très préjudiciable à la séparation des bandes.

d - Solutions de coloration des gliadines

Pour colorer une plaque de gel, on utilise successivement 2 solutions :

- 1) 50 ml d'acide trichloracétique 20 % (200 grammes/litre) dont on recouvre simplement le gel et que l'on laisse agir quelques secondes.
- 2) 450 ml de solution aqueuse de nigrosine préparée en dissolvant 250 mg de nigrosine dans 450 ml d'eau, dont on recouvre le gel, sans avoir éliminé l'acide trichloracétique et que l'on laisse agir une nuit (ou éventuellement un week-end).

La composition finale du colorant est donc :

Nigrosine Ed. GURR 0.05 % dans l'eau.
Acide trichloracétique 2 %

e - Solution de lavage des gels

C'est de l'éthanol à 40-45° que l'on préparera en mélangeant 1000 ml d'éthanol à 95° GL et 1600 ml d'eau. Après usage, ce bain peut être régénéré en y incorporant du noir animal et en filtrant. On vérifiera périodiquement le degré d'alcool et on rajustera si nécessaire avec de l'éthanol à 95°.

f - Solution de conservation des gels

A condition d'être décollés de leur plaque, les gels peuvent être conservés indéfiniment dans l'éthanol à 95° GL.

1.4 - EXTRACTION DES GLIADINES

a - Cas d'une variété pure : extraction sur mouture ou sur farine

Broyer l'échantillon au moyen d'un broyeur à marteaux ou d'un simple moulin à café (le type de mouture n'a aucune importance). Peser environ 600 mg de mouture (500 mg dans le cas des blés durs) dans un petit tube à centrifuger ou dans un tube à hémolyse. Ajouter 1.5 ml de solution d'extraction : chloro-2-éthanol 25 % + pyronine. Mettre en suspension au moyen d'une baguette de verre. Laisser reposer une nuit à température ordinaire. Centrifuger 10 mn à 3000 t/mn.

Décanter le surnageant dans un godet plastique de 2 ml. L'extrait ainsi obtenu contient les gliadines du grain. Il est utilisé directement pour le dépôt de l'échantillon dans le gel.

N.B. 1) Cet extrait n'est pas exhaustif mais il est représentatif de la fraction gliadine. Pour le rendre exhaustif, il conviendrait d'opérer au moins 3 extractions successives, par exemple : 1 ml (1 nuit) + 0.75 ml (5 heures) + 0.5 ml (1 heure).

2) Des "protéines solubles" (albumines - globulines) sont extraites en même temps que les gliadines, mais elles ne perturbent pas le fractionnement électrophorétique de ces dernières en raison de leur mobilité plus élevée.

3) Exceptionnellement, l'extraction peut être réalisée en 2 heures seulement, à condition d'agiter plusieurs fois la suspension et d'utiliser un solvant contenant du chlorure mercurique (cf. § 1.3.a), afin d'éviter toute dégradation du gel par la β -amylase. Lorsque l'extraction dure une nuit, le chlorure mercurique n'est pas nécessaire car ce temps est suffisant pour assurer l'inhibition de l'enzyme par le chloro-2-éthanol seul.

4) La fraction gliadine peut, par définition, être extraite au moyen d'éthanol dilué. Le chloro-2-éthanol 25 % a néanmoins été retenu car il apparaît sensiblement plus efficace que l'éthanol et car il permet, contrairement à ce dernier, d'inhiber la β -amylase durant l'extraction d'une nuit.

b - Cas d'un mélange de variétés : extraction grain par grain

Suivre la méthode de sous-échantillonnage en laboratoire décrite par LE BRUN et BEAUX (1978) qui consiste en une division primaire de l'échantillon jusqu'à obtention d'une fraction intermédiaire d'environ 650 grains par des appareils classiques (diviseur à rifles, ou conique, ou répartiteur d'échantillons), puis en une reprise de cette fraction par un numigral micro diviseur. Cette deuxième opération doit permettre de prélever les 50 grains qui seront soumis à l'analyse électrophorétique, plus environ 8 grains destinés, en cas d'incident, à une analyse supplémentaire.

Placer les 50 grains, un par un, dans des godets de 2 ml après avoir écrasé grossièrement chacun d'eux avec un marteau ou une pince. Ajouter la solution d'extraction selon des quantités tenant compte de la taille des grains. Il faut compter en moyenne 3,3 fois le poids du grain (100 microlitres pour 30 mg de grain).

Boucher les godets et laisser reposer une nuit à température ordinaire. Homogénéiser alors soigneusement la suspension au moyen de petits agitateurs en verre. Si la suspension n'est pas assez liquide, rajouter une petite quantité de solvant (et homogénéiser de nouveau) jusqu'à atteindre une consistance permettant le prélèvement de l'échantillon (cf. § 1.6.b). Il est important (sous peine d'obtenir des diagrammes de faible intensité) de ne pas trop diluer l'extrait et il est donc préférable d'introduire une quantité minimale de solvant au début en ajustant ensuite, uniquement si cela est nécessaire.

La suspension obtenue peut être utilisée telle quelle pour le dépôt de l'échantillon, mais il est préférable de centrifuger par exemple 5 mn à 3000 t/mn de façon à avoir un surnageant débarrassé de fragments de grain.

1.5 - PREPARATION DU GEL D'AMIDON

La concentration du gel en amidon est de 10 %. Compte tenu du volume (350 ml) de chaque cuvette AMIDOPHOR, les quantités d'amidon et de tampon lactate d'aluminium (§ 1.3.c) à prévoir sont les suivantes :

<u>Pour préparer</u>	<u>Peser</u>	<u>Mesurer</u>	<u>Volume final</u>
1 gel	35 g d'amidon	335 ml de tampon	350 ml
2 gels	70 g "	670 ml "	700 ml
3 gels	105 g "	1005 ml "	1050 ml
4 gels	140 g "	1340 ml "	1400 ml

S'assurer tout d'abord de la préparation des cuvettes.

- Fermer la partie inférieure des ponts avec du ruban adhésif.
- Placer une plaque de verre (290 x 119 x 2 mm) sur la cuvette.
- Contrôler la parfaite horizontalité de la plaque au moyen d'un niveau à bulle et s'assurer de sa parfaite propreté.

Fractionner alors la quantité prévue de tampon lactate en 2 parties : 1/4 et 3/4 et porter à ébullition la fraction des 3/4 pendant que l'on met l'amidon en suspension homogène, à température ordinaire dans le 1/4 restant. Lorsque l'ébullition est atteinte, mélanger les deux fractions en agitant au moyen du mixer, ce qui provoque instantanément la formation de l'empois, vers 65-67°C.

Il est important que la suspension d'amidon (dans le volume 1/4) soit bien homogène au moment où l'on réalise le mélange. On a ainsi intérêt à avoir le mixer fixé à un statif et la suspension d'amidon placée dans un bécher forme haute. Le tampon bouillant est versé rapidement en une seule fois et le bécher est amené aussitôt jusqu'au mixer. Celui-ci n'est actionné que lorsque l'hélice a atteint le fond du récipient et l'empois devient homogène sans qu'il soit nécessaire de remuer le bécher de haut en bas. Eviter surtout que l'hélice ne tourne dans le vide, ce qui favoriserait la formation de nombreuses bulles.

La durée d'agitation est très importante pour obtenir une consistance de gel déterminée, la viscosité de l'empois étant progressivement abaissée au cours de l'agitation. On retiendra une durée d'agitation de 30 secondes exactement pour un volume de mélange de 700 ml (2 gels). Pour un seul gel : 15 secondes et pour 3 gels : 45 secondes.

L'empois est alors coulé immédiatement dans les cuvettes AMIDOPHOR. Ces cuvettes seront remplies à ras bord de façon à ce que le gel ait une épaisseur de 6 mm. Lorsque plusieurs gels sont coulés à la suite, il est important qu'ils aient sensiblement la même épaisseur afin d'être traversés, lors de l'électrophorèse, par la même intensité de courant, particulièrement si les gels sont alimentés en parallèle par un même générateur.

Dès que l'empois est coulé, il est conseillé d'exercer une pression sur la plaque de verre au moyen de deux fines baguettes tenues verticalement afin de chasser l'air se trouvant sous la plaque et d'obtenir ainsi un gel d'épaisseur uniforme.

On laisse ensuite le gel refroidir (15 mn à la température du laboratoire puis 15 mn au réfrigérateur). Le fait que la surface du gel soit irrégulière (bulles, ondulations ...) est sans importance car la partie supérieure du gel est éliminée en fin d'expérience. Il est par ailleurs inutile, à ce stade, de recouvrir le gel.

Lorsque le gel est refroidi, on découvre les ponts en enlevant le ruban adhésif et on place la cuvette dans l'enceinte plexiglas (ou sur la paire de bacs à électrodes). On remplit les 2 bacs de tampon lactate d'aluminium (§ 3.1.c) de façon à assurer le contact avec les extrémités du gel. Le précourant peut alors commencer.

Il est important de savoir que les résultats obtenus sont d'autant meilleurs que le gel utilisé est de préparation récente. On a donc nettement intérêt à préparer le gel le matin même de l'expérience.

1.6 - ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE

ATTENTION : LA TECHNIQUE D'ÉLECTROPHORÈSE UTILISE DES VOLTAGES ÉLEVÉS. AVANT MANIPULATION DE L'APPAREILLAGE OU DU GEL, TOUJOURS S'ASSURER QUE LE COURANT A ÉTÉ COUPÉ (VOYANT ROUGE ÉTEINT).

a - Précourant

Le fait de faire passer le courant dans le gel avant le dépôt des échantillons a pour but de purifier le gel, de le débarrasser de certains ions nuisibles à une bonne séparation des bandes protéines. Beaucoup d'impuretés, ainsi déplacées par le courant, s'éliminent en se concentrant sous la forme d'une "ligne de front" que l'on découvrira sur les diagrammes après coloration.

Après avoir placé le gel dans l'enceinte, au contact des bacs à électrodes, on relie les électrodes aux bornes de sortie du générateur (montage en parallèle si plusieurs gels sont alimentés par le même générateur).

Le générateur doit être placé en "voltage constant". Au moyen du contrôleur METRIX, régler la tension de manière à avoir 8 volts/cm de longueur de gel, soit encore 250 volts entre les extrémités du gel. L'intensité du courant doit être de l'ordre de 20-25 mA pour un gel de 12 cm de largeur et de 6 mm d'épaisseur, donc de l'ordre de 3 mA/cm² de section de gel. L'intensité trouvée sera évidemment différente si l'épaisseur du gel n'est pas de 6 mm. De légers écarts peuvent également être observés entre différents lots d'amidon ou d'urée, ou encore si les gels ont été préparés dans des conditions non identiques (température de l'empois, durée de l'agitation, vieillissement du gel).

Le gel est ensuite recouvert de film plastique pour éviter la déshydratation et le précourant est ainsi poursuivi durant 1h15 exactement.

b - Dépôt des échantillons

Lorsque le temps de précourant est écoulé, on coupe le courant, on relève une partie du film plastique et on s'apprête à introduire les échantillons dans le gel. Pour cela, à l'aide d'un bistouri, on pratique des fentes verticales régulièrement espacées dans le gel, à environ 4 cm du bord relié au pôle +. Pour cette opération il est recommandé de s'aider d'une règle graduée ou d'un guide en plexiglas portant des dents taillées à la dimension des fentes (voir croquis Figure 1). Selon le nombre de dépôts à effectuer par gel, la longueur des fentes (et celle des papiers qu'on y introduit) peut aller de 9 à 12 mm. Ainsi,

pour 6 échantillons par gel	:	6 fentes de 12 mm	et papiers de 12 x 5 mm
7	"	" : 7 "	12 mm " 12 x 5 mm
8	"	" : 8 "	10 mm " 10 x 5 mm
10	"	" : 10 "	9 mm " 9 x 5 mm

Les solutions gliadines sont alors déposées au moyen de rectangles de papier calibré (WHATMAN n° 4) imbibés des extraits contenus dans les différents godets. On utilise pour chaque échantillon deux épaisseurs de papier WHATMAN n° 4. Les deux épaisseurs de papier, maintenues accolées au moyen d'une pince, sont plongées dans le godet, imbibées du surnageant avec précaution, légèrement égouttées, puis introduites dans une fente du gel.

Cette phase expérimentale doit évidemment être accomplie avec beaucoup de soin car elle conditionne pour une large part la qualité et la régularité des diagrammes. Mieux elle sera conduite, plus la lecture des bandes sera aisée. Il faut notamment veiller à ne pas plier les rectangles de papier au moment où on les imbibe et lors de leur introduction dans les fentes du gel. Des papiers insérés pliés donneront des bandes présentant la même déformation et donc difficiles à localiser par rapport aux témoins. Par ailleurs, si un excès de liquide a été prélevé, les papiers doivent être égouttés avec précaution et toujours de la même manière, afin que les différents dépôts aient des concentrations comparables.

c - Conditions de migration des protéines

Aussitôt après le dépôt des échantillons, recouvrir de nouveau le gel de film plastique et rétablir le courant. Vérifier le réglage à 8 volts/cm. Il est à noter que le couvercle de verre vendu avec les enceintes AMIDOPHOR peut être utilisé pour des raisons de sécurité, mais qu'il ne suffit pas, à lui seul, pour empêcher l'évaporation à la surface du gel. L'emploi d'un film plastique est absolument nécessaire.

Les cuvettes AMIDOPHOR ne comportent pas de système de refroidissement. C'est un avantage au point de vue de la simplicité et du coût de l'appareillage, ainsi que de la commodité des manipulations et du nettoyage. Mais c'est également un inconvénient du fait que le passage du courant provoque un échauffement par effet Joule, qui se dissipe uniquement par diffusion autour du gel, c'est-à-dire de façon difficile à contrôler. La température atteinte par le gel (30-35°C dans des conditions normales) dépendra donc en fait, non seulement de l'intensité initiale du courant (dont on a vu § 1.6a qu'elle peut varier en fonction de l'épaisseur du gel ainsi que de sa structure, de ses conditions de préparation), mais aussi de la température du laboratoire (à moins de pouvoir opérer dans une enceinte climatisée). Comme une élévation de température provoque en retour un abaissement de la résistivité du tampon et donc une augmentation de l'intensité qui traverse le gel, il peut se produire une sorte de réaction en chaîne amenant à un niveau relativement élevé la température d'équilibre entre le gel et le milieu extérieur.

Comme la vitesse de migration se trouve influencée par la température du gel, il faut s'attendre, pour de faibles écarts de température (dus soit à des différences d'intensité initiale du courant, soit à des différences journalières ou saisonnières de la température extérieure), à des écarts non négligeables de temps de migration des protéines. D'où la nécessité d'utiliser un marqueur coloré de la migration et d'arrêter l'expérience, non pas après un temps déterminé mais après une distance de parcours déterminée du marqueur.

On laisse ainsi migrer les protéines jusqu'à ce que le colorant pyronine G (PROLABO) ait parcouru une distance de 17 cm exactement. Les bandes gliadines les plus rapides ont alors parcouru 15 cm environ. En moyenne, cela demande 5 heures, mais des temps de migration compris entre 4 h 30 à 5 h 30 peuvent être considérés comme normaux.

Arrêter alors le courant, débrancher les fils électriques et découper le gel avec un scalpel mouillé tout autour de la plaque de verre qui le supporte. Soulever cette plaque, nettoyer la cuvette (retirer les fragments de gel ayant pu se glisser sous le verre), replacer la plaque de verre et son gel après avoir intercalé au dessous une plaquette de verre de 4 mm d'épaisseur.

Découper le gel dans son épaisseur au moyen d'un fil d'acier ou de nylon de 6/100 mm que l'on fait glisser sur les bords de la cuvette. La partie supérieure du gel (qui dépasse de la cuvette d'environ 4 mm) est ensuite éliminée, en bloc ou par fragments, au moyen d'un scalpel.

La partie inférieure (qui reste collée sur la plaque de verre et qui mesure environ 2 mm d'épaisseur) est récupérée pour être aussitôt colorée en vue de la détection des bandes gliadines.

1.7 - COLORATION DU GEL

Préparer un bac type TUPPERWARE pour chaque gel à colorer. Noter les références du gel sur le bac. Y placer la plaque de verre supportant le gel. Verser avec précaution les 50 ml d'acide trichloracétique 20 % sur le gel, cette opération ayant pour but de précipiter et de fixer les protéines. Ajouter ensuite les 450 ml de nigrosine à l'eau et laisser le gel ainsi immergé durant une nuit (ou éventuellement un week-end).

Le lendemain, retirer la plaque de verre et égoutter le gel avec précaution. Eliminer le bain de coloration (qui ne doit servir qu'une fois).

Verser de l'alcool dilué (40-50° GL) dans le bac. Replacer la plaque avec précaution. L'excès de colorant s'élimine progressivement et les bandes protéiques apparaissent. En quelques minutes, le gel est prêt pour l'interprétation.

Si l'on désire photographier le gel rapidement, il convient de renouveler au moins 3 fois le bain d'alcool, afin d'obtenir un contraste suffisamment élevé.

Le gel peut être conservé dans cet alcool dilué et on observe qu'il perd peu à peu sa fragilité initiale. Il ne faut jamais utiliser de concentration en alcool supérieure à 45° GL (risque de contraction et de fissuration) tant que les gels restent collés à leur plaque de verre. On peut cependant, après les avoir décollés de la plaque de verre (en faisant glisser un fil entre le gel et la plaque), placer les gels dans l'alcool à 95° GL, dans lequel ils durcissent encore davantage et peuvent se conserver indéfiniment.

1.8 - PRINCIPALES FAUTES POSSIBLES DE MANIPULATION

On a énuméré ci-dessous les principales fautes possibles de manipulation en essayant d'explicitier les causes probables des symptômes observés et en signalant les vérifications et les contrôles à effectuer.

- Fuite lors du coulage du gel : S'assurer d'une meilleure adhérence du ruban adhésif sur les ponts de la cuvette.

- Présence de bulles au coeur du gel : La température de formation de l'empois a été insuffisamment élevée. La viscosité est alors trop forte et les bulles (qui doivent normalement remonter en surface, où elles ne gênent pas la séparation) demeurent au coeur du gel. Mieux s'assurer des proportions du mélange tampon bouillant/tampon froid et du temps de mixage. Contrôler éventuellement la température (cf. § 1.5).

- Hétérogénéités dans la consistance du gel ou présence de grumeaux : L'agitation a été insuffisante lors de la formation de l'empois, ou bien la température de gélification n'a pas été suffisamment dépassée. Attention également à homogénéiser parfaitement la suspension d'amidon dans le tampon froid avant de verser le tampon bouillant.

- Présence de nombreuses bulles à la surface du gel : Ce phénomène n'est pas préjudiciable à la séparation des bandes dans le gel, comme l'est la présence de bulles au coeur du gel, mais peut cependant rendre difficile le dépôt des échantillons. La cause est généralement, soit l'utilisation d'un mixer de construction différente de celle conseillée § 1.2.a, soit une mauvaise manipulation. On rappelle que l'hélice ne doit être actionnée que profondément immergée dans le béccher d'empois d'amidon (§ 1.5), des bulles étant inévitablement engendrées si l'hélice tourne dans le vide. Pour le cas où on ne parviendrait pas à préparer un gel sans bulles, on pourrait, à la rigueur, repousser la couche de bulles hors du gel (ou seulement hors de la zone où les dépôts sont à effectuer) au moyen d'une baguette de verre.

- Intensité du courant très faible ou nulle, migration trop lente : Il peut s'agir d'un mauvais contact dans le branchement électrique, d'une électrode cassée ou d'un oubli d'enlever le ruban adhésif des ponts. Il peut y avoir également erreur (par défaut) dans la dilution du tampon (oubli de l'urée, ou oubli de lactate). Vérifier donc le pH. Signalons enfin qu'un gel d'amidon préparé dans des conditions différentes de celles indiquées § 1.5 (gélification incomplète par suite d'une température trop faible ou d'une agitation insuffisante) ou un gel d'amidon vieilli (préparé le jour précédent) peut présenter une résistance plus élevée et être donc traversé à épaisseur égale par une intensité plus faible que la normale.

- Gel anormalement fragile avec parfois effondrement des ponts : Vérifier qu'on a bien utilisé une concentration de 10 % en amidon et que le gel a bien été préparé dans les conditions du § 1.5 (agitation 30 secondes exactement pour 700 ml de mélange, température : 67-69°C). S'assurer également (notamment en été, si le laboratoire n'est pas climatisé) que le gel n'a pas trop chauffé durant la migration. Travailler éventuellement à un voltage légèrement inférieur.

- Intensité du courant très supérieure à la normale, le gel chauffe, la migration est trop rapide : Il se peut qu'il y ait eu erreur par excès dans la préparation du tampon ou dans sa dilution et que la force ionique ou la concentration en urée soient trop élevées. Vérifier le pH et repréparer éventuellement la solution. Vérifier également que l'eau a été convenablement désionisée ou distillée. On rappelle également (cf. § 1.6.a et 1.6.c) que l'intensité qui traverse le gel dépend de plusieurs paramètres et notamment de l'épaisseur. Il y a davantage d'échauffement dans un gel épais, d'une part car la dissipation des calories s'effectue plus mal, d'autre part car il y a réaction en chaîne (cf. § 1.6.c) entre la température, l'intensité et la vitesse de migration. D'où des migrations et des intensités supérieures à la normale si le laboratoire n'est pas climatisé durant la saison chaude.

- Front des bandes fortement arqué, les diagrammes du centre du gel migrant plus loin que ceux du bord : Ce défaut est lié au problème de température évoqué ci-dessus et au § 1.6.c (on a vu que de faibles écarts de température peuvent entraîner des différences de migration non négligeables). Comme le plus souvent la température du centre du gel est légèrement supérieure à celle des bords, on observe presque toujours une certaine courbure des diagrammes. Lors d'un échauffement excessif, qui accentue encore les écarts de température entre les différentes parties du gel, la courbure peut devenir gênante pour la lecture des diagramme. On a donc intérêt, si la température ambiante est trop élevée, à limiter l'échauffement, par exemple en diminuant légèrement le voltage. Ne jamais omettre également de recouvrir le gel de film plastique car une évaporation excessive contribue aussi à la courbure des diagrammes.

- Diagrammes perturbés par la présence d'une "ligne de front" ; Omission du précourant, ou durée de précourant trop courte (cf. § 1.6.a).

- Zones rapides du diagramme trop tassées par rapport aux zones lentes : Durée de précourant trop courte : les bandes rapides sont comprimées à l'approche de la "ligne de front". Paradoxalement, un précourant d'une durée supérieure à la normale (2 à 3 heures, par exemple) peut conduire également à un tassement des zones rapides.

- Front des bandes très irrégulier, sinueux, avec déformation de la "ligne de front" : Il peut s'agir d'une hétérogénéité du champ électrique liée à une épaisseur irrégulière du gel. Avant de couler le gel, mieux vérifier l'horizontalité de la plaque de verre. Après avoir coulé le gel, s'assurer également que la plaque n'a pas été soulevée par une trop grande quantité d'amidon qui se serait glissée au dessous (cf. § 1.5). Il peut aussi s'agir d'hétérogénéités dans la structure, dans le degré de gélification de l'amidon, l'empois ayant peut-être été incomplètement homogénéisé avant d'être coulé. S'assurer aussi du parfait état de propreté des plaques de verre.

- Après coloration, certains diagrammes sont faiblement concentrés : Cela peut être dû à une extraction insuffisante ou trop courte des gliadines, ou à une mauvaise inhibition des papiers WHATMAN, notamment dans le cas de petits grains pour lesquels il y a peu de surnageant.

- Après coloration, tous les diagrammes du gel sont faiblement concentrés : Le lot de colorant utilisé est impropre à la coloration des gliadines. Jusqu'à ce jour, la seule marque de nigrosine donnant des colorations satisfaisantes est Ed. GURR (TOUZART et MATIGNON). Les autres marques (R.A.L., MERCK, EASTMAN KODAK, ...) peuvent être difficilement employées, à moins de doubler la concentration du colorant ou de colorer au moins 48 heures.

- Régions du diagramme ayant mal pris le colorant, ou colorant mal fixé sur certaines bandes : Défaut provoqué par une fixation insuffisante des protéines avant action du colorant et qui peut se produire lorsqu'on omet d'introduire de l'acide trichloracétique dans la solution de nigrosine.

- Les bandes protéiques révélées sont floues : C'est un défaut dont il est parfois difficile de trouver la cause exacte. Il peut s'agir tout d'abord d'un défaut du générateur de courant (courant non correctement redressé). On peut également vérifier si la découpe a bien été réalisée au 1/3 inférieur du gel (une découpe trop haute donne parfois des diagrammes flous, la finesse des séparations étant meilleure vers les couches inférieures du gel). Lorsque le flou touche plus particulièrement les fractions rapides, dites α - et β -gliadines, on peut incriminer le tampon utilisé (l'eau a-t-elle été parfaitement désionisée ? la force ionique et le pH ont-ils été respectés ? cf. § 1.3.c) ou les conditions de préparation du gel (il y a davantage de diffusion dans un gel de faible consistance, trop chauffé ou trop mixé, que dans un gel normal et la diffusion touche d'ailleurs davantage les fractions α et β , de faible poids moléculaire, que les fractions ω). Enfin, on a observé que le dépôt au moyen de papier WHATMAN trop épais (par exemple : 2 épaisseurs de n° 3) peut donner des diagrammes flous.

- Bandes non parallèles au dépôt, ou en forme de croissant : Cela peut se produire si la solution d'extraction ou si le blé contiennent des impuretés, notamment des sels, si le chloro-2-éthanol utilisé n'est pas à 25 %, ou encore si on utilise une solution trop ancienne de chloro-2-éthanol 25 % + chlorure mercurique (cf. § 1.3.a). Vérifier également que le dépôt a bien été effectué au moyen de 2 papiers WHATMAN n° 4.

- Certains dépôts donnent des trainées : La quantité de protéine déposée est peut-être trop élevée. Vérifier que les papiers WHATMAN ont été régulièrement égouttés avant le dépôt. Recommencer éventuellement avec des concentrations inférieures. Se rappeler que la concentration de l'extrait est à réduire de 20 % environ dans le cas des blés durs (cf. § 1.4.a). Cela est parfois nécessaire avec certains blés "hard" nord-américains. Autres causes de trainées : rectangles de papier souillés, ou pliés lors de leur insertion ; fragments de grains entraînés dans la fente avec le papier, plaque de verre non correctement nettoyée.

- Trainées à partir du dépôt, avec dégradation du gel : Il s'agit d'une attaque amylasique du gel d'amidon. Cela ne doit normalement pas se produire si on utilise un extrait au chloro-2-éthanol 25 % pendant une nuit. En cas d'extraction de 2 heures, ajouter du chlorure mercurique (cf. § 1.3.a).

- Débordement latéral des bandes vers les autres diagrammes :

Le papier a pu être déplacé après avoir été inséré dans la fente, ou bien la fente est trop longue et il y a migration latérale, par capillarité, de la solution de dépôt.

- Gel qui adhère mal à la plaque de verre et qui se décolle pendant la coloration : Cela peut se produire avec des plaques taillées dans certains verres spéciaux. Utiliser un autre type de verre, notamment du verre dépoli, ou essayer de traiter les plaques avec un abrasif.

- Gel qui se contracte et se fissure lors de la décoloration :

Ce phénomène est très gênant dans le cas de gels qui adhèrent mal à la plaque de verre (cf. § précédent) et qui alors se déchirent. La contraction elle-même peut être cependant due, soit au degré de l'alcool utilisé (qui ne doit pas être supérieur à 45° GL), soit à la structure du gel. Les empois préparés à une température trop faible, ou avec une agitation insuffisante (gélification incomplète) ont ainsi tendance à se contracter fortement lors de leur immersion dans l'alcool.

1.9 - PHOTOGRAPHIE DES GELS

Les gels d'amidon peuvent se conserver indéfiniment dans l'alcool, mais une telle collection devient rapidement encombrante. Ils peuvent être également conservés à l'état sec mais avec évidemment un contraste plus médiocre. Il est donc souvent nécessaire de réaliser un cliché des diagrammes et cela permet d'ailleurs de conserver une trace dans les cahiers expérimentaux et une preuve matérielle des analyses variétales effectuées.

Les conditions exactes de photographie dépendent de l'équipement que l'on possède. On se bornera donc ici à donner des conseils d'ordre général.

a - Choix de l'équipement et des produits photo

Il est conseillé d'utiliser un appareil photo type reflex 24 x 36 avec, de préférence, un objectif macroscopique ou, à la rigueur, des lentilles additionnelles. La prise de vue nécessite un statif réglable pour l'appareil et un éclairage par lampes floods d'au moins 4 x 150 watts. Si on réalise soi-même le développement des films et le tirage des photos, il convient d'avoir une chambre noire avec bacs à réactifs, eau courante, agrandissement, etc...

Comme il est parfois difficile d'obtenir des contrastes suffisamment élevés avec les films courants, on signale l'existence des produits suivants qui, en particulier pour les non spécialistes de la photo permettent d'obtenir de bons résultats dans des conditions d'emploi simples et rapides (développement en lumière rouge).

- Film ORTHOCHROMATIQUE type MF IV en rouleaux de 30 m x 3.5 cm perforés (GUILLEMINOT).

- Révélateur rapide concentré et fixateur concentré (GUILLEMINOT) utilisables à la fois pour le traitement des films et des papiers.

- Papiers 8.9 x 12.7 cm ou 12.7 x 17.8 cm GUILLEMINOT ou ILFORD, semi-mat, avec gamme de contraste 1 (doux) à 5 (super contraste).

Une autre possibilité est l'utilisation d'un appareil POLAROID permettant de réaliser des tirages de photos instantanés. On obtiendra difficilement des tirages de bonne qualité avec les modèles POLAROID courants. Par contre, un modèle permettant l'emploi de films de type 52 (image de 9 x 11.5 cm), peut donner de bons résultats.

b - Prise de vue

On peut photographier les gels dès que leur décoloration est suffisante (au moins 2 à 3 heures dans l'éthanol dilué).

On tiendra compte des recommandations suivantes :

- Rincer avec précaution la plaque de gel sous l'eau du robinet.
- Photographier le gel immergé dans un bac d'eau après avoir réglé l'angle et la distance des lampes floods (plage lumineuse homogène).
- En cas de reflets apparaissant sur les clichés et dus à l'appareil photo, utiliser un cache noir mat ou un pare soleil.

c - Développement et tirage

Conditions classiques d'un laboratoire photo, avec possibilité, grâce au film ORTHOCHROMATIQUE, de développer en lumière rouge et en 1-2 minutes seulement.

1.10 - INTERPRETATION DU DIAGRAMME

a - Caractéristiques du diagramme

Comme le montrent les photos en annexe, le diagramme de chaque variété est constitué d'une vingtaine de bandes protéiques gliadines. Ces bandes (appelées aussi sous unités, ou composants du diagramme) peuvent être caractérisées par leur mobilité électrophorétique et par leur concentration.

La mobilité électrophorétique a été exprimée à l'origine par un nombre compris entre 0 (ligne de dépôt) et 100 (bande la plus rapide). La mesure des mobilités des différentes bandes a été réalisée pour l'ensemble des blés français. Initialement, 43 composants considérés comme significativement différenciables avaient été répertoriés. Depuis cette époque plusieurs composants nouveaux (dont un n° 105) ont été décelés, notamment chez les blés durs, de sorte que, dans les conditions actuelles de la technique, le nombre des bandes retenues est de 50.

La concentration relative des bandes a été exprimée simplement à l'aide de l'échelle suivante : +++, ++, +, traces, 0. Tout diagramme variétal peut alors être présenté sous la forme d'un schéma, rendant compte à la fois de la mobilité des composants et de leur concentration relative.

Il faut également souligner que les composants du diagramme variétal ne sont pas distribués au hasard, mais qu'ils constituent souvent des groupes caractéristiques aisément repérables. On a ainsi l'habitude de diviser le diagramme en 4 régions distinctes : les α -gliadines (mobilité 105 à 88), les β -gliadines (85 à 77), les γ -gliadines (75 à 62) et les ω -gliadines (60 à 21).

On a également observé que :

- Certains composants sont communs à toutes les variétés et peuvent servir de repères sûrs : c'est le cas des bandes 65, 79, 81, 96.

- D'autres composants sont moins universels mais permettent une discrimination rapide des diagrammes variétaux : c'est le cas des bandes 22, 26, 30, 37, 39, 44, 46, 49, 74, 83, 85.

- D'autres composants enfin, ne se rencontrent qu'exceptionnellement et ne sont utilisés que très rarement dans les interprétations : c'est le cas des bandes 33, 41, 50, 52, 55, 57, 59, 60, 75, 88, 100.

b - Principe de l'interprétation

L'interprétation du diagramme peut se réaliser soit sur le gel décoloré, soit sur une photo de ce gel. Il ne faut pas cacher que pour les non initiés, cette opération apparaîtra délicate. Elle consiste en effet, en une analyse visuelle des diagrammes et requiert une certaine mémoire visuelle. En outre, la possibilité de déterminer avec facilité les variétés ne sera pas acquise instantanément, mais apparaîtra après un entraînement progressif que chacun devra effectuer personnellement à partir des conseils et des documents fournis ici. Il convient donc de se familiariser avec la constitution des diagrammes, de s'entraîner à reconnaître tout d'abord les 5 ou 6 variétés les plus cultivées, ce qui est facile, et d'accroître ensuite peu à peu le champ de ses possibilités.

Les photos fournies en annexe mettent en évidence de nombreuses différences variétales et on observe que pratiquement chaque variété possède un diagramme particulier. Il est donc possible, à partir d'un diagramme quelconque, de retrouver l'identité de la variété correspondante. Tel est l'objectif du travail d'interprétation.

On pourrait essayer, pour cela, à partir du catalogue complet des photos, de comparer un à un les diagrammes, mais on préfère à cette solution fastidieuse, l'utilisation d'une clé de détermination. (Voir la "clé de détermination des variétés de blé" établie par l'ITCF et l'INRA). Ce tableau construit selon le principe d'une flore, permet grâce à l'examen de quelques caractéristiques importantes du diagramme (présence ou absence de certains composants très discriminants), de retrouver rapidement et sans ambiguïté le nom de chacune des variétés.

L'utilisation de la clé de détermination n'offre pas de difficulté particulière lorsqu'on dispose déjà d'un schéma du diagramme ou d'un diagramme dont les bandes ont été décodées. La partie délicate de l'interprétation réside donc évidemment dans le repérage des composants du diagramme, c'est-à-dire dans la détermination exacte de leur mobilité.

Pour différentes raisons, il n'est pas question d'essayer de recalculer toutes les mobilités des bandes du diagramme à partir de mesures directes sur les gels ou sur les photos. La solution que nous préconisons consiste, au contraire, en une utilisation systématique de diagramme témoins dont les composants sont déjà parfaitement connus. Pour une meilleure efficacité du travail il est même conseillé d'avoir en mémoire les mobilités des bandes de quelques variétés courantes (par exemple : Capitole, Rex, Maris Huntsman, Montferrier). Lorsque l'un de ces diagrammes témoins se trouve situé sur le gel, à côté d'un diagramme inconnu, il deviendra alors aisé d'établir les mobilités des bandes de ce dernier, en s'aidant éventuellement du répertoire complet des 50 composants possibles.

Lorsqu'on se sera peu à peu familiarisé avec les diagrammes des blés courants, on vérifiera que plusieurs bandes ou groupes de bandes se retrouvent très souvent dans les diagrammes, notamment chez les blés d'hiver et leur repérage se fera alors quasi instantanément. Par exemple, les ω -gliadines de Capitole se retrouvent sans changement chez Top, Hardi, Joss, Ducat, etc... Celles de Champlein se retrouvent aussi pratiquement chez Talent, Maris Huntsman, Charles-Péguy, etc... De même, les α -gliadines sont les mêmes chez Hardi, Joss, Magali, Top, Heima, d'une part, chez Capitole, Charles-Péguy, et Talent d'autre part.

On observera également qu'il est inutile de déterminer la mobilité de toutes les bandes, mais seulement de certaines d'entre elles, parmi les plus discriminantes ; celles, précisément, que la clé de détermination utilise.

Il faut ainsi s'entraîner à analyser, dans un premier temps, la région des ω -gliadines, dont les bandes sont très bien résolues et chez laquelle les différences variétales sont très nettes ; dans un second temps seulement, les autres régions (α , β , γ) du diagramme, chez lesquelles les différences sont parfois moins évidentes.

Au sein des ω -gliadines, il est important de savoir distinguer :

- Le groupe 22.26.30. (caractéristique des diagrammes de type A), du groupe 21.25.28 (caractéristique des diagrammes de type B).
- Le groupe 44.46.49 (rencontré chez Capitole, Top, Hardi, Joss, Ducat, Magali ...) du groupe 44.46 (Champlein, Talent, Maris Huntsman ...).
- Le composant 39 (présent chez Capitole, Top, Hardi, Heima, Florence-Aurore ... et absent chez Champlein, Talent, Rex, Charles-Péguy, Chrismar ...).
- Quelques composants relativement exceptionnels tels que le 60 (caractéristique d'Etoile de Choisy) ou le 37 (rencontré chez Clément, Courtot, Lutin ...).

Dans les régions α -, β - et γ -gliadines, la discrimination portera essentiellement sur les bandes :

- 74 (dont l'absence caractérise les blés : Capitole, Talent, Ducat, Charles-Péguy, ...).
- 77 (fortement représenté chez Champlein, Hardi, Talent, Joss ...).
- 83/85 (permettant de différencier : Joss-Hardi, Champlein-Maris Huntsman ...).

- 90/91 (permettant de différencier : Top-Capitole, Champlein-Talent ...).
- 93 (qui caractérise plusieurs blés de printemps : Rex, Kolibri, Florence Aurore ...).

Lorsqu'on aura ainsi établi la présence ou l'absence de ces composants principaux, il suffira de suivre la clé de détermination jusqu'à aboutir au nom de la variété. On pourra alors éventuellement confirmer le résultat, en recherchant, dans un catalogue de clichés ou de schémas si le diagramme analysé correspond bien à celui de la variété que l'on a déterminé. (cf. annexe 1).

c - Cas des variétés pures

Lorsqu'on est certain d'avoir affaire à un lot de variété pure, on opère selon le protocole suivant :

- Mouture de quelques grammes de l'échantillon inconnu.
- Extraction des gliadines sur cette mouture (voir § 1.4.a).
- Dépôt de cet extrait dans le gel, à côté de celui d'un blé courant dont les positions des bandes sont parfaitement connues (Capitole, Rex, ...).
- Après électrophorèse, coloration du gel, repérage des principaux composants du diagramme inconnu en s'aidant de ceux du diagramme témoin.
- Lecture de la clé de détermination jusqu'à identification de la variété.
- Vérification à l'aide d'un diagramme ou d'un schéma de référence.

Généralement, on pourra affirmer avec certitude que le lot inconnu appartient à la variété ainsi déterminée. Il faut cependant signaler que dans quelques cas, deux ou plusieurs variétés présentent le même diagramme gliadine (voir la clé de détermination) et qu'il y a alors lieu de faire certaines réserves. Pratiquement, parmi les variétés les plus cultivées, le cas ne se présente que pour Capitole et Ducat. Si l'on trouve ainsi, par exemple, le diagramme de Capitole, il y aura lieu de dire : "Capitole, ou Ducat", une différenciation plus poussée de ces deux blés nécessitant la mise en oeuvre de techniques complémentaires (électrophorèse en gel de polyacrylamide, ou électrophorèse d'autres protéines ou d'enzymes).

Dans l'ensemble, on observera que la différenciation de deux variétés est d'autant plus aisée que les diagrammes présentent davantage de différences.

Comme l'analogie des diagrammes est une forme d'expression de la parenté génétique des blés, il est toujours plus simple de distinguer des variétés génétiquement éloignées (cas des blés de printemps), que des variétés génétiquement voisines (cas de nombreux blés d'hiver).

d - Cas des mélanges variétaux

Lorsqu'on est en présence d'un mélange de variétés, il est inutile de procéder à l'analyse des gliadines sur mouture, car l'additivité des bandes provenant de différents diagrammes, déjà complexes par eux-mêmes, rendrait le plus souvent ininterprétable le diagramme du mélange. On a alors recours à une détermination, grain par grain, de la variété, à partir d'un micro-échantillon représentatif, selon le protocole suivant :

- Homogénéisation de l'échantillon et divisions successives, jusqu'à la taille désirée pour le micro-échantillon (50 grains en général).
- Extraction des gliadines grain par grain (voir § 1.4.b) sur ce micro-échantillon.
- Dépôt des extraits dans les gels, au cours d'expériences pouvant être étalées sur 1 ou plusieurs jours.
- Identification (comme pour le cas des variétés pures) des différentes variétés présentes à partir des diagrammes donnés par chaque grain.
- Bilan du nombre de grains appartenant à chacune des variétés trouvées.
- Calcul de leur pourcentage relatif, d'où la composition variétale qualitative et quantitative du lot analysé.

Il faut évidemment préciser que les pourcentages trouvés après analyse du micro échantillon ne peuvent être considérés comme des valeurs rigoureusement exactes. Comme pour toute autre analyse de populations, ces pourcentages ne représentent que la valeur correspondant à une probabilité maximum, les pourcentages réels des variétés dans l'échantillon se trouvant selon des tables statistiques et dont le tableau ci-dessous fournit un exemple simplifié (d'après WRIGLEY et BAXTER, 1974).

Pourcentage trouvé	Intervalle de confiance pour 1 probabilité de 95 %			
	20 grains	50 grains	100 grains	200 grains
1 %	-	-	0- 5 %	0- 3 %
2 %	-	0-10 %	0- 7 %	0- 4 %
3 %	-	-	1- 8 %	1- 5 %
4 %	-	1-13 %	1-10 %	2- 7 %
5 %	0-25 %	-	2-11 %	2- 9 %
6 %	-	1-16 %	2-12 %	3-10 %
8 %	-	2-19 %	3-13 %	4-12 %
10 %	1-32 %	3-22 %	5-17 %	6-14 %
20 %	6-44 %	10-34 %	13-29 %	15-25 %
30 %	12-54 %	18-45 %	21-40 %	24-36 %
40 %	19-64 %	26-55 %	30-50 %	33-47 %
50 %	27-73 %	35-65 %	40-60 %	43-57 %

Les valeurs trouvées par ce procédé sont en fait des pourcentages en nombre de grains et il convient donc, pour connaître les pourcentages en poids, de corriger les résultats en fonction du poids de 1000 grains des variétés.

Exemples d'analyse :

1) Sur 50 grains analysés dans un mélange commercial, on trouve 48 grains de Hardi et 2 grains de Maris Huntsman.

Quelle-est la composition du lot ?

2 Grains sur 50 représentent 4 %. Lire la table pour 4 % et pour 50 grains : on trouve qu'à une probabilité de 95 %, le lot contient 1 à 13 % de grains Maris Huntsman.

2) Sur 100 grains analysés dans un mélange commercial, on trouve 60 grains Capitole, 30 grains Top et 10 grains Clément. La table donne la composition du lot (valeurs médianes et "fourchettes" correspondantes, à 95 % de probabilité) :

60 % (50 à 70 %) de grains Capitole

30 % (21 à 40 %) de grains Top

10 % (5 à 17 %) de grains Clément.

B I B L I O G R A P H I E

- AUTRAN J.C., 1973. L'identification des variétés de blé. Bull. Anc. Elèves EFM, 256, 163-169.
- AUTRAN J.C., 1975. Nouvelles possibilités d'identification des variétés françaises de blé par électrophorèse des gliadines du grain. Indus. Agric. Alim., 8, 9-10, 1075-1094.
- AUTRAN J.C., 1975. Identification des principales variétés communautaires de blé tendre par électrophorèse des gliadines. Bull. Anc. Elèves EFM, 270, 3-11.
- AUTRAN J.C., BOURDET A., 1975. Nouvelles possibilités de contrôle variétal qualitatif et quantitatif dans les lots de blé commerciaux. Techniques des Industries Céréalières, 150, 7-13.
- AUTRAN J.C., 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.
- BOURDET A., FEILLET P., METTAVANT F., 1963. Sur le comportement électrophorétique des prolamines en gel d'amidon. C.R. Acad. Sci. Paris, 256, Sér. D, 4517-4520.
- DOEKES G.J., 1968. Comparison of wheat varieties by starch gel electrophoresis of their grain proteins. J. Sci. Food Agric., 19, 169-176.
- ELLIS J.R.S., BEMINSTER C.M., 1977. The identification of U.K. wheat varieties by starch gel electrophoresis of gliadin proteins. J. natn. Inst. agric. Bot., 14, 221-231.
- ELLIS R.P., 1971. The identification of wheat varieties by the electrophoresis of grain proteins. J. nat. Inst. agric. Bot., 12, 223-235.
- ELTON G.A.M., EWART J.A.D., 1962. Starch gel electrophoresis of cereal proteins. J. Sci. Food. Agric., 13, 62-72.
- FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, technologiques et agronomiques. Ann. Technol. agric., 14, HS 1, 1-94.
- FEILLET P., BOURDET A., 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 10, 1273-1283.

- HUEBNER F.R., ROTHFUS J.A., 1968. Gliadin proteins from different varieties of wheats. Cereal Chem., 45, 3, 242-253.
- MEYER D., NIERLE W., 1977. Zur Differenzierung von Weizensorten aufgrung morphologischer und chemischer Unterschiede. Getreide, Mehl und Brot, 10, 258-261.
- SOZINOV A.A., POPERELLIA F.A., STAKANOVA A.I., 1973. Polymorphisme intervariétal des gliadines de quelques variétés de blé (en russe). Dokl. Vses. Akad. Sel'Skokhoz. Nauk., 2, 9-11.
- WRIGLEY C.W., SHEPHERD K.W., 1974. Identification of australian wheat cultivars by laboratory procedures : examination of pure samples of grain. Aust. J. of Exptl. Agric. Anim. Husb., 14, 796-804.
- WRIGLEY C.W., BAXTER R.I., 1974. Identification of australian wheat cultivars by laboratory procedures : grain samples containing a mixture of cultivars. Aust. J. of Exptl. Agric. Anim. Husb., 14, 805-810.

DEUXIEME PARTIE : ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

2.1 - DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA TECHNIQUE

L'extraction de la fraction gliadine est réalisée soit à partir d'une mouture de grains ou d'une farine (cas des variétés pures), soit grain par grain (cas des variétés en mélange), par simple contact dans un solvant alcoolique.

Le milieu dans lequel les gliadines sont séparées est un gel de polyacrylamide. Ce gel est préparé dans un moule, aménagé dans la cuve même d'électrophorèse, par polymérisation d'une solution d'acrylamide au moyen d'un catalyseur. Quelques minutes après la polymérisation, les échantillons constitués par les extraits gliadines peuvent être déposés dans le gel au moyen d'une micropipette. Il n'y a pas de phase de précourant. L'électrophorèse proprement dite commence avec l'application du champ électrique : les protéines migrent alors dans le gel de l'électrode positive vers l'électrode négative et se séparent.

A la fin de l'électrophorèse, on révèle les bandes gliadines en immergeant le gel tout entier dans un colorant spécifique des protéines : le bleu de Coomassie. Il n'est pas nécessaire de décolorer le gel, la coloration s'effectuant ici de façon progressive. L'interprétation est réalisée visuellement, soit à partir du gel lui-même, soit sur une photographie.

2.2 - EQUIPEMENTS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES

a - Equipements

- Alimentation stabilisée pour électrophorèse, permettant de délivrer (au minimum) 400 volts sous (au minimum) 80 mA. Les modèles suivants conviennent parfaitement :

SEBIA DG 250 (BIOBLOCK) (500 V - 500 mA)

ISCO 1420 (ROUCAIRE) (400 V - 80 mA)

APELEX ST 3 D (450 V - 200 mA)

GILSON G 500 (500 V - 100 mA)

GELMAN 38520 (500 V - 100 mA) ou 38207 (500 V - 125 mA)

BIORAD 500 (500 V - 200 mA)

PHARMACIA EPS 500/400 (500 V - 400 mA)

Tout modèle ayant des performances supérieures, comme le LKB 2103 (2000 V - 200 mA), le ISCO 493 (1000 V - 400 mA), ou le PHARMACIA ECPS 2000/300, peut évidemment être utilisé. A titre d'information, un appareil délivrant 80 mA peut permettre d'alimenter au maximum un gel contenant 10 à 12 échantillons, un appareil délivrant 200 mA : 20 à 24 échantillons et un appareil délivrant 400 mA : 50 à 60 échantillons.

- Appareil d'électrophorèse type BUSHUK et ZILLMAN (1978).

Cet appareil n'est pas commercialisé mais des croquis permettant sa reproduction sont donnés sur les Figures 2 et 3. Il consiste en :

- 1 cuve inférieure comprenant bacs à électrodes et plateau de refroidissement par circulation d'eau,

- 1 couvercle de refroidissement,

- 1 grille "slot former" destinée à imprimer des fentes dans le gel lors de la polymérisation,

- 3 blocs de plexiglas permettant de délimiter le volume dans lequel l'acrylamide est coulé.

- Centrifugeur permettant de centrifuger de petits volumes (tubes de 6 ou de 15 ml, ou éventuellement des godets plastiques de 2 ml). Un simple centrifugeur de paillasse (3500 t/mn) type JOUAN BB est suffisant.

- Tubes à centrifuger de 6 ou de 15 ml, ou tubes à hémolyse.

- Godets d'auto-analyseurs, jetables après usage, de 2 ml avec capes, type 311150 C (POLY LABO).

- Portoirs pour les tubes et les godets précédents, réf. RS 21 (POLY LABO).

- Cryothermostat à circulation, type MINISTAT 86101 ou HAAKE F2-C (BIOBLOCK).

- Distributeur REPETMAN R 1000 (GILSON) (facultatif).

- Micropipette EPPENDORF, capacité 15 microlitres, avec pointes jaunes (POLY LABO) ou encore seringues polyéthylène de 1 ml, auxquelles on peut adapter des micropipettes capillaires CORNING de 15 microlitres (POLY LABO).

- Seringue multiple DESAGA DH 146381 (0-120 μ l) avec plaque de microtitration DH 146384 (ROUCAIRE) (facultatif).

- Diviseur d'échantillons à rifles ou conique (TRIPETTE et RENAUD) ou répartiteur d'échantillons RETSCH type PTZ (LABO MODERNE).

- Numigral micro diviseur (TRIPETTE et RENAUD),

- Broyeur à marteaux ou simple moulin à café,

- Fils électriques avec fiches mâles.

- Bacs TUPPERWARE, réf. A 15 (330 x 220 mm) ou A 11 (290 x 180 mm).

- Négatoscope pour l'observation des gels.

- Appareillage de photographie : appareil 24 x 32 mm à objectif macro, statif de prise de vue. Eventuellement, matériel de développement et de tirage des photos. Autre possibilité : appareil POLAROID permettant l'utilisation de films de type 52 (image de 9 x 11.5 cm).

- Matériel courant de laboratoire : balance, pipettes, fioles, éprouvettes, béchers, pinces, marteau, scalpels, baguettes de verre,

b - Produits chimiques

- Acrylamide Eastman Kodak (TOUZART et MAGIGNON),

- NN'-Méthylène-bis - acrylamide Eastman Kodak,

- Acide ascorbique pour analyse.

- Sulfate ferreux pour analyse.

- Eau oxygénée (hydrogène peroxyde 110 volumes, pour analyse).
- Acide lactique pur (d = 1.24).
- Lactate d'aluminium OSI, réf. 2405.
- Acide trichloracétique pur cristallisé.
- Bleu de Coomassie R 250 (à ne pas confondre avec le G 250)
Eastman Kodak.
- Chloro-2-éthanol pur : $\text{CH}_2 \text{Cl} - \text{CH}_2 \text{OH}$.
- Pyronine G (PROLABO).
- Saccharose pour analyse.
- Ethanol absolu.
- Graisse au silicone RHODORSIL.
- Eau distillée ou désionisée.

c - Références des fournisseurs

APELEX (Matériel d'électrophorèse), 29 rue Salvador Allende, 92220
BAGNEUX - Tél. 655.63.36.

BIOBLOCK Scientific, B.P. 111, 67047 STRASBOURG CEDEX - Tél. (88)
66.40.40.

GELMAN (Electrophorèse), 14 boulevard Edouard Vaillant, 93300
AUBERVILLIERS - Tél. 834.91.80.

GILSON (Electrophorèse), 72 rue Gambetta, BP 5, 95400 VILLIERS-LE-
BEL - Tél. 990.54.41.

GUILLEMINOT BOESFLUG et Cie (Photo), 22 rue de Chateaudun, 75009
PARIS - Tél. 878.42.07.

JOUAN, BP 403, 44608 SAINT NAZAIRE CEDEX - Tél. (40) 22.01.01.

LABO MODERNE, 37 rue Dombasle, 75015 PARIS - Tél. 532.62.54.

L.K.B., 69 rue de Paris, 91400 ORSAY - Tél. 928.65.07.

O.S.I., 141-145 rue de Javel, 75739 PARIS CEDEX 15 - Tél. 533.74.87.

PHARMACIA, rue de Marly, Parly 2, BP 67, 78150 LE CHESNAY - Tél. 954.90.60.

POLY LABO P. BLOCK et Cie, 305 Route de Colmar, 67100 STRASBOURG
MEINAU - Tél. (88) 39.13.10.

PROLABO, 12 rue Pelée, BP 200, 75526 PARIS CEDEX 11 - Tél. 355.44.88.

ROUCAIRE (Service ISCO), BP 65, 20 avenue de l'Europe, 78140 VELIZY -
Tél. 946.96.33.

TOUZART et MATIGNON, 8 rue Eugène Hénaff, 94400 VITRY S/SEINE -
Tél. 680.85.20.

TRIPETTE et RENAUD, 39 rue J.J. Rousseau, 75039 PARIS CEDEX 01 -
Tél. 231.21.45.

2.3 - PREPARATION DES SOLUTIONS

Il est important, notamment pour la qualité des diagrammes, que toutes les solutions (particulièrement le tampon d'électrophorèse cf. § 2.3.c) soient préparées avec de l'eau parfaitement désionisée ou distillée. De même, la verrerie et la cuve d'électrophorèse doivent être, après nettoyage, soigneusement rincées à l'eau désionisée ou distillée.

a - Solution d'extraction des gliadines

C'est le chloro-2-éthanol à 25 % dans l'eau, contenant en outre 0.02 % de pyronine G (PROLABO) et 30 % de saccharose, soit par exemple, pour 1 litre de solution :

Chloro-2-éthanol	250 ml
Pyronine G (PROLABO)	0.2 g
Saccharose	300 g
Eau désionisée q.s.p.	1000 ml

La solution peut se conserver indéfiniment au froid. La pyronine qu'elle contient est un colorant destiné simplement à faciliter le dépôt de l'échantillon et à visualiser la migration sous l'effet du champ électrique.

On a noté que les différentes pyronines du commerce ne renfermaient pas toujours les mêmes constituants, d'où la recommandation d'utiliser ici la pyronine G PROLABO afin de faciliter les comparaisons entre laboratoires. La saccharose introduit dans la solution a pour effet d'accroître la densité de l'extrait et de faciliter les conditions de dépôt dans le gel.

b - Solution mère de lactate d'aluminium

Peser 50 grammes de lactate d'aluminium. Transvaser dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajouter 55 ml d'acide lactique (44.4 grammes). Compléter à 1000 ml avec de l'eau désionisée. On obtient un litre de solution mère qui peut se conserver indéfiniment de préférence au froid et qui a la composition suivante :

0.17 M en lactate d'aluminium ($\mu = 1.0$)

0.75 N en acide lactique

pH 2.50

μ = force ionique

c - Solution diluée de lactate d'aluminium (tampon d'électrophorèse)

On l'utilise à la fois pour préparer le gel et comme liquide des bacs à électrodes. Il doit être renouvelé à chaque expérience. On le prépare en diluant 20 fois la solution mère précédente avec de l'eau désionisée. Exemple :

Solution mère	100 ml
---------------	--------

Eau désionisée	1900 ml
----------------	---------

<hr/>	
2000 ml de tampon.	

Ce tampon ne doit pas être conservé au delà de quelques jours, même au réfrigérateur. Sa composition est la suivante :

0.0085 M en lactate d'aluminium ($\mu = 0.05$)

0.0375 N en acide lactique

pH 3.10

d - Solution de coloration des gliadines

On prépare tout d'abord une solution mère de colorant à 1 % dans l'éthanol absolu. Pour cela 10 grammes de Bleu de Coomassie R 250 sont agités durant 30 minutes (barreau magnétique) dans 1 litre d'éthanol absolu. La solution obtenue, filtrée, constitue la solution mère, que l'on conserve indéfiniment à température ordinaire.

Le colorant lui-même est préparé au moment de l'emploi en diluant 20 fois la solution mère ci-dessus dans l'acide trichloracétique 12 %.

Pour éviter de peser quotidiennement de l'acide trichloracétique, il peut être commode de préparer une solution mère d'acide trichloracétique 60 % en amenant tout le contenu d'un flacon de 1 kg à 1666 ml, solution qui sera ensuite diluée 5 fois pour obtenir l'acide 12 %. Pour colorer un gel, on prendra par exemple :

20 ml solution mère de Bleu de Coomassie R 250 à 1 %
80 ml d'acide trichloracétique à 60 %
300 ml d'eau désionisée

400 ml de colorant.

La composition exacte du colorant est donc :

Bleu de Coomassie R 250	0,05 %
Ethanol	5 %
Acide trichloracétique	12 %

e - Solution de conservation des gels

C'est l'acide trichloracétique 12 %.

2.4 - EXTRACTION DES GLIADINES

a - Cas d'une variété pure : extraction sur mouture ou sur farine.

Broyer l'échantillon au moyen d'un broyeur à marteaux ou d'un simple moulin à café (le type de mouture n'a aucune importance). Peser 100 mg de mouture dans un petit tube à centrifuger ou dans un tube à hémolyse. Ajouter (au moyen d'une pipette ou d'un distributeur REPETMAN) 0.6 ml (0.8 ml dans le cas des blés durs) de solution d'extraction : chloro-2-éthanol + pyronine + saccharose. Mettre en suspension au moyen d'une fine baguette de verre. Laisser reposer au moins une heure à température ordinaire. Centrifuger 10 mn à

3000 t/mn. Décanter le surnageant dans un godet plastique de 2 ml. L'extrait ainsi obtenu contient les gliadines du grain. Il est utilisé directement pour le dépôt de l'échantillon dans le gel.

N.B. - Des "protéines solubles" (albumines-globulines) sont extraites en même temps que les gliadines mais elles ne perturbent pas le fractionnement électrophorétique de ces dernières en raison de leur mobilité plus élevée.

b - Cas d'un mélange de variétés : extraction grain par grain

Suivre la méthode de sous-échantillonnage en laboratoire décrite par LE BRUN et BEAUX (1978) qui consiste en une division primaire de l'échantillon jusqu'à obtention d'une fraction intermédiaire d'environ 650 grains par des appareils classiques (diviseur à rifles, ou conique, ou répartiteur d'échantillons), puis en une reprise de cette fraction par un Numigral micro diviseur. Cette deuxième opération doit permettre de prélever les 50 grains qui seront soumis à l'analyse électrophorétique, plus environ 8 grains destinés, en cas d'incident, à une analyse supplémentaire.

Placer les 50 grains, un par un, dans des godets de 2 ml après avoir écrasé grossièrement chacun d'eux avec un marteau ou une pince. Ajouter (pipette ou distributeur REPETMAN) la solution d'extraction selon des quantités tenant compte de la taille des grains. On compte 6 fois le poids du grain (300 microlitres pour 50 mg de grain), 8 fois dans le cas des blés durs (400 microlitres pour 50 mg de grain).

Boucher les godets et laisser reposer une heure à température ordinaire. Homogénéiser la suspension au moyen de petits agitateurs en verre. Centrifuger les godets 5 mn à 3000 t/mn. Les surnageants obtenus peuvent alors être utilisés pour le dépôt des échantillons (cf. § 2.6.a).

Dans le cas où les dépôts sont effectués au moyen d'une seringue multiple DESAGA une quantité suffisante de chaque surnageant devra être transvasée dans les alvéoles de la plaque de microtitration.

2.5 - PREPARATION DU GEL DE POLYACRYLAMIDE

ATTENTION : LES SOLUTIONS D'ACRYLAMIDE (NON POLYMERISE) SONT TRES TOXIQUES. EVITER TOUTE MANIPULATION AVEC LES MAINS NUES. EN CAS DE CONTACT, LAYER ABONDAMMENT A L'EAU.

a - Nature du gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est le produit obtenu par polymérisation d'un monomère, l'acrylamide $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ et d'un comonomère ("cross-linking reagent"), le NN'-méthylène-bis-acrylamide $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$. Il s'agit d'une polymérisation de type vinylique au cours de laquelle, sous l'action d'un système catalyseur, l'acrylamide forme des chaînes linéaires, elles mêmes pontées par des molécules de NN'-méthylène-bis-acrylamide. Le gel ainsi formé, élastique et transparent, possède la structure d'un réseau tridimensionnel et constitue un support pour l'électrophorèse permettant à la fois de limiter la diffusion des protéines et d'exercer un effet de tamisage moléculaire lors de la séparation.

b - Préparation du moule

Le gel est coulé dans un moule aménagé directement dans la cuve d'électrophorèse (Figure 2). On s'assurera donc préalablement de la préparation de la cuve :

- Connecter les tubes de circulation d'eau du bain-marie au plateau et au couvercle de refroidissement.

- Mettre en route le courant d'eau thermostaté à 21°C.

- Placer les deux blocs de plexiglas 134 x 25 x 6 mm au bord des réservoirs à tampon, de façon à délimiter un volume intérieur de 222 x 134 x 6 mm. Pour éviter toute fuite lors du coulage de la solution d'acrylamide, assurer éventuellement l'étanchéité au moyen de graisse au silicone.

- Préparer, à portée de la main, la grille "slot former" et le troisième bloc de plexiglas : 171 x 38 x 10 mm.

c - Formule du gel

Le gel utilisé a une concentration de 6 % d'acrylamide et de 0.3 % de méthylène-bis-acrylamide. Le système catalyseur est ici celui de JORDAN et RAYMOND (1969) et comprend l'acide ascorbique, le sulfate ferreux et l'eau oxygénée. Ce dernier constituant, qui déclenche la réaction de polymérisation, ne doit évidemment être ajouté qu'au moment précis de couler le gel.

Pour préparer un gel dans l'appareil type BUSHUK et ZILLMAN (1978), décrit § 2.2, 200 ml de solution sont à prévoir :

Acrylamide	12	g
NN'-méthylène- <u>bis</u> -acrylamide	0.6	g
Acide ascorbique	0.2	g
Sulfate ferreux	0.005	g
Solution mère de lactate d'aluminium	10	ml
Eau distillée ou désionisée q.s.p.	200	ml

Au moment de couler le gel, on ajoute :

Eau oxygénée à 3 %	1.0	ml
--------------------	-----	----

N.B. - La polymérisation étant très rapide (de l'ordre de la minute), il est préférable de préparer le mélange ci-dessus (sauf l'eau oxygénée) la veille et de le conserver une nuit au froid (car le froid retarde la polymérisation), ce qui permet d'opérer dans de meilleures conditions.

d - Coulage du gel

Après avoir ajouté l'eau oxygénée, homogénéiser rapidement la solution et verser aussitôt les 200 ml dans le moule.

Recouvrir immédiatement au moyen du couvercle de refroidissement, de manière à ne pas emprisonner de bulle d'air. Le couvercle doit être bien parallèle aux bords de la cuve (utiliser pour cela les deux repères d'alignement). Positionner alors la grille "slot former" contre le bord libre du couvercle de refroidissement et refermer le moule au moyen du dernier bloc de plexiglas (171 x 38 x 10 mm). Bien s'assurer que la grille "slot former" est coincée entre ce dernier bloc et le couvercle. Ne plus toucher à l'ensemble tant que la polymérisation n'a pas eu lieu (1 à 2 minutes).

2.6 - ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE

ATTENTION : LA TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE UTILISE DES VOLTAGES ELEVES. AVANT MANIPULATION DE L'APPAREILLAGE OU DU GEL, TOUJOURS S'ASSURER QUE LE COURANT A ETE COUPE (VOYANT ROUGE ETEINT)

Environ 10 minutes après polymérisation, l'électrophorèse proprement dite peut commencer. Il n'y a pas de phase préalable de précurant.

a - Dépôt des échantillons

On commence par démouler partiellement le gel en enlevant avec précaution les 3 blocs amovibles de plexiglas, ainsi que la grille "slot former", dégageant ainsi les extrémités du gel ainsi que les fentes à échantillons. Il n'est pas obligatoire d'enlever le couvercle.

Dans chacun des réservoirs à tampon, la solution diluée de lactate d'aluminium (§ 2.3.c) est ajoutée (environ 2 x 250 ml) jusqu'à réaliser le contact avec les extrémités du gel.

Les différents échantillons sont alors déposés dans les fentes au moyen d'une micropipette EPPENDORF de 15 microlitres, avec pointes jaunes, ou bien de micropipettes capillaires CORNING de 15 microlitres adaptées à une simple seringue de 1 ml, ou encore au moyen d'une seringue multiple DESAGA. Ce dernier accessoire permet de réaliser 12 dépôts simultanément. Il est à signaler que l'opération de dépôt est toujours accomplie plus aisément si les fentes sont préalablement remplies de tampon, car ainsi, la solution d'échantillon, de plus grande densité, se dépose uniformément dans la fente, déplaçant le tampon.

Cette phase expérimentale doit évidemment être accomplie avec beaucoup de soins car elle conditionne pour une part, la qualité des diagrammes. Il faut notamment veiller à introduire la totalité de l'échantillon au fond de la fente, à ne pas en répandre à la surface du gel et à éviter, lors de chaque dépôt, de contaminer les fentes voisines. La présence de pyronine dans l'échantillon facilite d'ailleurs grandement la régularité de l'opération.

b - Conditions de migration des protéines

Aussitôt les dépôts effectués, les électrodes sont connectées à la sortie du générateur de courant, en ayant soin de relier à la borne + le côté où les dépôts ont été effectués.

Le générateur est placé sur la position "intensité constante" et réglé sur $i = 72-74$ mA. Ceci correspond approximativement à une différence de potentiel de 14 volts/cm. Au cours du temps, cette valeur diminue légèrement pour atteindre environ 13 volts/cm en fin d'expérience.

Comme la vitesse de migration est fortement influencée par la température, le liquide de refroidissement est maintenu à 21°C. Cette température constitue un compromis entre des valeurs plus élevées pour lesquelles il y a migration rapide mais diffusion excessive des bandes et des valeurs plus faibles pour lesquelles il y a faible diffusion mais migration très lente.

La migration est maintenue pendant exactement 5 heures. Au bout de ce temps les fractions gliadines les plus rapides ont parcouru la longueur du gel et l'expérience peut donc être arrêtée. On note que les fractions de type albumines et globulines, solubilisées en même temps que les gliadines, lors de l'extraction chloro-2-éthanol migrent bien au delà, sortent donc du gel sans perturber le diagramme des gliadines. A noter que le marqueur pyronine atteint l'extrémité du gel après environ 4h30; on peut donc également adopter comme règle l'arrêt de l'expérience 30 minutes après la "sortie" de la pyronine.

2.7 - COLORATION DU GEL

Préparer un bac TUPPERWARE pour chaque gel à colorer. Noter les références du gel sur le bac.

Enlever le gel de la cuve d'électrophorèse avec précaution en faisant glisser au dessous une plaque de verre ou de plexiglas, transporter le gel et le faire glisser dans le bac TUPPERWARE. Eviter tout contact du gel avec les doigts car des empreintes digitales apparaîtraient après coloration.

Verser alors dans le bac 400 ml de colorant Bleu de Coomassie dont la préparation est décrite § 2.3.d. Laisser le gel immergé durant une nuit (ou éventuellement un week-end). Les bandes du diagramme qui commencent à apparaître au bout d'une heure, s'intensifient progressivement pendant la nuit. Un premier examen des résultats est possible après 2-3 heures mais l'interprétation définitive et la photographie ne peuvent se faire qu'après une nuit dans le colorant.

Contrairement à ce qui a lieu avec la nigrosine pour les gels d'amidon, il y a, avec le Bleu de Coomassie en milieu trichloracétique, fixation préférentielle de colorant sur les bandes protéiques sans coloration importante du fond. Il y a ainsi une sorte de palier atteint après environ 24 heures et il n'est pas nécessaire de "décolorer" le gel pour observer les diagrammes.

Pour réduire le temps de coloration il est possible de découper le gel de polyacrylamide dans son épaisseur, comme dans le cas du gel d'amidon. On colore alors seulement une section inférieure de 3 mm d'épaisseur ce qui permet au Bleu de Coomassie de diffuser plus rapidement dans le gel. La lecture des diagrammes devient alors possible moins de 2 heures après l'arrêt de l'expérience.

La solution de colorant ne peut être utilisée qu'une seule fois (il y a précipitation progressive du Bleu de Coomassie au cours de la coloration).

La conservation des gels se fait dans l'acide trichloracétique 12 %. On peut utiliser pour cela le bain de coloration, après passage au charbon animal (selon le procédé employé pour l'éthanol 40 % dans le cas des gels d'amidon).

Il faut cependant signaler que la coloration des bandes au Bleu de Coomassie est relativement labile et que les gels se décolorent progressivement en quelques semaines. On peut néanmoins les recolorer si nécessaire.

Les gels de polyacrylamide peuvent également être séchés en les abandonnant à l'air, après les avoir enveloppés dans de la cellophane enduite de glycérol dilué.

2.8 - PRINCIPALES FAUTES POSSIBLES DE MANIPULATION

On a énuméré ci-dessous les principales fautes possibles de manipulation en essayant d'explicitier les causes probables des symptômes observés et en signalant les vérifications et les contrôles à effectuer.

- Fuite lors du coulage du gel : Dans un appareil bien construit, les blocs de plexiglas 133 x 25 x 6 mm doivent s'adapter parfaitement (en hauteur et en longueur) à la cuve. On peut éventuellement utiliser un peu de graisse au silicone pour parfaire l'étanchéité, mais vu la vitesse de polymérisation le risque de fuite est limité.

- La polymérisation est trop rapide (moins de 30 secondes après addition de l'eau oxygénée) : Erreur dans la composition du gel (excès de sulfate ferreux ou d'eau oxygénée) ou température de travail trop élevée. Il y a intérêt à utiliser une solution d'acrylamide préalablement réfrigérée et à thermostatier (21°C) la cuve d'électrophorèse avant de couler.

- La polymérisation n'a pas lieu : Erreur dans la composition du gel (oubli du NN'-méthylène-bis-acrylamide ; oubli ou quantité insuffisante de sulfate ferreux ou d'eau oxygénée).

- Impossibilité d'ajuster voltage et intensité aux valeurs recommandées : Il y a pu avoir erreur ou omission dans la composition du gel ou erreur dans la dilution du tampon.

- Gel de consistance anormale, difficile à manipuler : Erreur dans les quantités d'eau oxygénée ou de sulfate ferreux. Une réduction de la quantité d'eau oxygénée entraîne un allongement du temps de polymérisation mais donne un gel moins consistant.

- Front des bandes irrégulier ou sinueux : Cuve mal construite, ne permettant pas de mouler des gels d'épaisseur régulière ; ou bien électrode de platine non parallèle aux extrémités du gel. Autres explications : composition du gel non homogène (eau oxygénée mal mélangée avant de couler le gel), champ électrique déformé par des impuretés dans une cuve mal nettoyée, ou encore température non homogène (débit du liquide de refroidissement insuffisant, présence de bulles dans le circuit, présence de poches d'air entre le gel et le plateau ou le couvercle).

- Faible coloration de l'ensemble des diagrammes : Vérifier si la formule de colorant, a bien été respectée. Sinon, précipitation du colorant dans le bac, due à des impuretés (bac mal nettoyé), faisant perdre au colorant son efficacité.

- Les bandes protéiques révélées sont floues : Vérifier que les formules du gel et du tampon ont été respectées ainsi que les conditions de voltage et d'intensité. Sinon, s'assurer que l'eau utilisée a été correctement désionisée ou distillée, que les produits chimiques ont bien la pureté recommandée et qu'on a travaillé avec du matériel très propre. Autre cause possible : diffusion des bandes suite à un arrêt prolongé du courant ou à une attente anormale entre dépôt et début de migration ou entre fin de migration et coloration. Autre cause : le grain a été laissé trop longtemps au contact de la solution d'extraction (chloro-2-éthanol-saccharose-pyronine) ; 1 heure suffit, 1 nuit est acceptable, mais une conservation de l'extrait durant plus de 24 heures peut donner des diagrammes de qualité inférieure.

- Bandes déformées, en forme de V, avec parfois des traînées à partir du dépôt : S'assurer que le dépôt a bien été effectué selon les recommandations du § 2.6.a. Dans le cas où le couvercle de refroidissement a été enlevé pour effectuer les dépôts, vérifier qu'on n'a pas emprisonné de petites bulles d'air dans les fentes en remettant le couvercle. Parfois, à la suite d'une mauvaise manipulation, de la solution est déposée en dehors de la fente, ce qui occasionne des traînées sur le gel. A noter que beaucoup de traînées de surface sont éliminées si on découpe le gel avant coloration comme il est dit § 2.7.

- Contamination d'un diagramme par des bandes d'un diagramme voisin :
Le dépôt a été mal effectué et une partie de la solution d'un échantillon a pénétré dans les fentes voisines.

2.9 - PHOTOGRAPHIE DES GELS

Aucun procédé de conservation des gels n'étant idéal, il est préférable de photographier les diagrammes dans les 1 à 4 jours qui suivent l'expérience. Cela permet de conserver une trace dans les cahiers expérimentaux et une preuve matérielle des analyses variétales effectuées.

Les conditions exactes de photographie dépendent de l'équipement que l'on possède. On se bornera donc ici à donner des conseils d'ordre général.

a - Choix de l'équipement et des produits photo

Il est conseillé d'utiliser un appareil photo type reflex 24 x 36 avec, de préférence, un objectif macroscopique ou, à la rigueur, des lentilles additionnelles. La prise de vue nécessite un statif réglable pour l'appareil et un négatoscope. Si on réalise soi même le développement des films et le tirage des photos, il convient d'avoir une chambre noire avec bacs à réactifs, eau courante, agrandisseur, etc...

Pour les non spécialistes de la photo, on signale l'existence des produits suivants qui permettent d'obtenir de bons résultats dans des conditions d'emploi simples et rapides (développement en lumière rouge),

- Film ORTHOCHROMATIQUE type MF IV en rouleaux de 30 m x 3,5 cm perforés (GUILLEMINOT),

- Révélateur rapide concentré et fixateur rapide concentré (GUILLEMINOT) utilisables à la fois pour le traitement des films et des papiers,

- Papiers 8,9 x 12,7 cm ou 12,7 x 17,8 cm GUILLEMINOT ou ILFORD, semi-mat, avec gamme de contraste 1 (doux) à 5 (super contraste),

Une autre possibilité est l'utilisation d'un appareil POLAROID permettant de réaliser des tirages de photos instantanés. On obtiendra difficilement des tirages de bonne qualité avec les modèles POLAROID courants. Par contre, un modèle permettant l'emploi de films de type 52 (image de 9 x 11,5 cm), peut donner de bons résultats.

b - Prise de vue

On peut photographier le gel, dès que l'intensité des bandes est suffisante (après au moins une nuit dans le colorant), dans les conditions suivantes :

- Laver rapidement le gel dans l'eau ordinaire.
- Placer le gel sur la plage lumineuse du négatoscope.
- S'assurer que toute particule de colorant a été éliminée avant de prendre le cliché.

c - Développement et tirage

Conditions classiques d'un laboratoire photo, avec possibilité, grâce au film ORTHOCHROMATIQUE, de développer en lumière rouge et en 1-2 minutes seulement.

2-10 - INTERPRETATION DU DIAGRAMME

On peut se reporter, pour l'essentiel, au chapitre correspondant de la première partie (§ 1.10), car l'interprétation dans le cas du gel de polyacrylamide repose sur le même principe que dans le cas du gel d'amidon.

On se limitera donc ici à ce qui diffère entre polyacrylamide et amidon, c'est-à-dire la nomenclature des composants gliadines utilisés dans les clés de détermination.

a - Caractéristiques du diagramme en gel de polyacrylamide

Pour une variété donnée, le diagramme gliadine en gel de polyacrylamide est sensiblement différent du diagramme amidon. Il apparaît des composants nouveaux (non différenciés en gel d'amidon) et dont il devient possible de tenir compte vu la plus grande finesse des bandes. Le nombre de bandes rencontrées dans un diagramme variétal est de 25-30 en moyenne (au lieu de 17-25 en gel d'amidon). Dans un ensemble de variétés on en a dénombré plus de 75 (au lieu de 50 en gel d'amidon). Pour un diagramme ramené à une longueur de 100 mm, il y a donc presque un composant possible par millimètre.

Comme en gel d'amidon, la mobilité électrophorétique a été exprimée par un nombre compris entre 0 et 100. Cependant, en raison de l'accroissement de la résolution, on ne trouve plus dans les diagrammes en gel de polyacrylamide de bande de référence commune à toutes les variétés. En particulier, le composant amidon 65 ne peut plus être pris comme repère car il se dédouble, et de différentes façons, dans beaucoup de blés. Pour rester en accord avec la nomenclature internationale des gliadines, proposée par BUSHUK, on a donc retenu comme référence un composant γ -gliadine (auquel on a attribué une mobilité de 50) facile à reconnaître et présent dans les principales de nos variétés : Capitole, Top, Hardi, Clément, Wattines, Etoile de Choisy, Ducat, Eloï, Darius, Heima, Joss, ...

Dans la Figure 4, on a tenté d'établir une relation entre les composants d'un diagramme amidon et d'un diagramme polyacrylamide. Une correspondance exacte apparaît possible au niveau des ω -gliadines mais demeure difficile -presque impossible- dans les régions α , β et même γ . En effet, la résolution obtenue y est différente, car l'effet tamisage moléculaire est beaucoup plus marqué dans le polyacrylamide. On observe ainsi :

- des bandes qui se dédoublent (exemple : bandes amidon 65, 90, 96) ;
- des composants qui se détachent, sans qu'il soit toujours possible de dire de quelle bande amidon ils se sont détachés (exemple : bandes polyacrylamide 47, 49, 67, 69, 71).
- des bandes appartenant à des variétés différentes, ayant fortuitement même mobilité apparente en gel d'amidon, mais ne présentant plus la même mobilité en polyacrylamide (exemple : bande amidon 44 entre Champlein et Hardi).
- des bandes qui présentent des intensités relatives différentes, car le Bleu de Coomassie utilisé en polyacrylamide colore surtout les fractions α et β , contrairement à la nigrosine utilisée en gel d'amidon qui se fixe davantage sur les fractions ω .

Dans l'ensemble, on retrouve donc dans les diagrammes polyacrylamide les 4 régions ω , γ , β et α , mais ces deux dernières sont nettement plus étalées et mieux résolues qu'en gel d'amidon. La division peut alors se faire de la façon suivante : α -gliadines (mobilité 100 à 69), β (68 à 56), γ (55 à 41) et ω (40 à 11) et on observe donc que la région γ se trouve vers le milieu du diagramme au lieu d'être aux 2/3 comme en gel d'amidon.

b - Principe de l'interprétation cf. § 1.10.b

Comme pour le gel d'amidon, on s'attachera à repérer les composants du diagramme, c'est à dire à déterminer leur mobilité et leur concentration (+++, ++, +, traces) en utilisant des diagrammes témoins. On remarquera

encore que plusieurs bandes ou groupes de bandes, se retrouvent souvent dans les diagrammes, notamment chez les blés d'hiver, ce qui facilitera leur repérage. Ainsi les ω -gliadines de Capitole se retrouvent chez Top, Hardi, Ducat, Joss, ... Celles de Champlein se retrouvent chez Talent et Maris Huntsman. De même, les principales α -gliadines sont les mêmes chez Hardi, Joss, Magali, Wattines, Lutin, Clément.

En se gardant bien de confondre les mobilités amidon et les mobilités acrylamide on s'entraînera à distinguer, au sein des ω -gliadines :

- Le groupe 12-15-18 (caractéristique des diagrammes de type A), du groupe 11-14-16 (caractéristique des diagrammes de type B : Magali, Kolibri, César).

- Le groupe 28-31 (rencontré chez Capitole, Top, Hardi, Joss, Ducat, Eloi, Darius, ...), du groupe 25-28 (Champlein, Talent, Maris Huntsman, ...).

- Le composant 23 (présent chez Capitole, Top, Hardi, Heima, Florence-Aurore, ... et absent chez Champlein, Talent, Rex, Chrismar, ...).

- Quelques composants relativement exceptionnels tels que le 40 (caractéristique d'Etoile de Choisy) ou le 22 (rencontré chez Clément, Courtot, Lutin, ...).

Dans les régions α -, β - et γ -gliadines, la discrimination portera essentiellement sur les bandes ;

- 83/85 (permettant de différencier Capitole de Ducat)

- 69/71 (permettant de différencier Top, Champlein de Capitole, Ducat, Talent)

- 54/55 (permettant de différencier Capitole, Ducat, Eloi de Top, Wattines)

- 50 (permettant de différencier Top, Capitole, Wattines de Hardi, Talent, Lutin, Maris Huntsman)

- 42/45 (permettant de différencier la famille des blés durs Tomclair, Wells, Lakota de la famille Agathé, Bidi 17, Montferrier, Valdur).

Lorsqu'on aura ainsi établi la présence ou l'absence de ces composants principaux, il suffira de suivre la clé de détermination jusqu'à aboutir au nom de la variété qu'il s'agisse de l'analyse d'une variété pure (cf. § 1.10.c) ou d'un mélange de variétés (cf. § 1.10.d), on pourra alors confirmer les résultats en recherchant, dans un catalogue de clichés ou de schémas si le diagramme analysé correspond bien à celui de la variété que l'on a déterminé.

Un exemple de clé de détermination pour le gel de polyacrylamide, limité aux 30 variétés de blé les plus cultivées (hiver, printemps, durum) est fourni sur la Figure 5. Des exemples de diagrammes en gel de polyacrylamide de ces 30 variétés se trouvent sur les figures données dans l'Annexe 2.

Ces résultats montrent qu'en raison de l'amélioration de la résolution des bandes, les 30 variétés ci-dessus donnent toutes des diagrammes différents. En particulier les variétés Capitole et Ducat, qui apparaissent identiques en gel d'amidon sont différenciables en gel de polyacrylamide.

Figure 5:

CLE DE DETERMINATION DES PRINCIPALES VARIETES DE BLE TENDRE D'HIVER,

DE BLE TENDRE DE PRINTEMPS ET DE BLE DUR

A PARTIR DU DIAGRAMME ELECTROPHORETIQUE DES GLIADINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

□ PRESENCE DE 2 OU DE 3 COMPOSANTS DANS LA ZONE DE MOBILITE 11-17 : Type Blé Tendre

● PRESENCE (++) DU COMPOSANT 15 : GROUPE A

◆ Présence du groupe 12-15-18 : Type A₁

△ Présence (+++) de 40 → Etoile de Choisy

△ Absence ou tr. de 40

■ Présence (+) de 22, ou tr. de 22 associée à une 23 (Heima et Rudi)

○ Présence (+++) de 27 et de 33 → Clément

○ Absence de 27 et de 33

▼ Présence de 31 et de 23 (+)

✕ Présence de 30 et de 44 → Heima

✕ Absence de 30 et de 44 → Rudi

▼ Absence de 31 et de 23

✕ Présence de 28 → Bastion

✕ Absence de 28 → Lutin

■ Absence de 22

○ Présence de 23

▼ Présence (++) de 30 → Réso

▼ Absence de 30 : oméga-gliadines semblables à celles de Capitole et constituées des bandes 12-15-18-23-26-28-31-34-36

✕ Présence de 71 et non de 69

□ Présence (++) de 54

+ Présence de 85 et non de 83 → Capitole

- + Présence de 83 et non de 85→ Ducat
- Absence de 54→ Eloi
- × Présence de 69 et non de 71
- Présence (++) de 58
- + Présence (++) de 66→ Joss
- + Absence ou tr. de 66→ Hardi
- Absence ou tr. de 58
- + Présence de 85 et non de 84→ Top
- + Présence de 84 et non de 85→ Wattines

○ Absence de 23

- ▼ Présence (++) de 28 et absence de 30
- × Présence de 71 et non de 69→ Talent
- × Présence de 69 et non de 71
- Présence de 62 et de 67→ Champlein
- Absence de 62 et présence de 66→ Maris Huntsman
- ▼ Absence de 28 et présence (+++) de 30
- × Présence de 26→ Rex
- × Absence de 26→ Chrismar

◆ Présence du groupe 15-18 : Type A₂→ Florence-Aurore

● ABSENCE DU COMPOSANT 15 ET PRESENCE DU GROUPE 11-14-16-20 : GROUPE B

- ◆ Présence (+++) de 30→ Kolibri
- ◆ Absence de 30
- △ Présence de 28 (++) et de 44 (+++), absence de 35→ Magali
- △ Absence de 28 et de 44, présence (++) de 35→ César

□ ABSENCE DE COMPOSANT DANS LA ZONE DE MOBILITE 11-17 : Type Blé Dur

- Présence (++) de 28 et absence de 20→ Darius
- Absence de 28 et présence (++) de 20 : Blés durum

◆ Présence (+++) de 45 et absence de 42

△ Présence (+++) de 65 et de 73

- Présence (+++) de 89→ Montferrier
- Absence ou tr. de 89→ Bidi 17

△ Absence de 65 et de 73

- Présence du groupe 76 (+++) - 78 (+) - 80 (+) - 82 (+++)→ Agathe
- Présence du groupe 75 (+++) - 78 (++) - 81 (+++)→ Valdur

◆ Absence de 45 et présence (+++) de 42

△ Présence de 65 et du groupe 76 (+++) - 78 (+) - 80 (+) - 82 (+++)→ Tomclair

△ Absence de 65 avec présence du groupe 75 (+++) - 78 (++) - 81 (+++)→ Wells

B I B L I O G R A P H I E

- AUTRAN J.C., BUSHUK W., WRIGLEY C.W., ZILLMAN R.R., 1979. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. IV. International comparison of electrophoretic methods. Can. J. Plant Sci. (sous presse).
- BUSHUK W., ZILLMAN R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant Sci., 58, 505-515.
- BUSHUK W., ZILLMAN R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II. Gliadin nomenclature. Can. J. Plant Sci. (sous presse).
- DAMIDAUX R., AUTRAN J.C., GRIGNAC P., FEILLET P., 1978. Mise en évidence de relations applicables en sélection entre l'électrophorégramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de Triticum durum Desf., C.R. Acad. Sc. Paris, 287, Série D, 701-704.
- GUBAREVA N.K., GAVRILYUK I.P., CHERNOBUROVA A.D., 1975. The testing of authenticity and cultivar purity of wheat seeds on electrophoretical spectrum of gliadin. Technique and catalogue cultivar formulas (en russe), Leningrad, VIR.
- GUNZEL G., 1976. Zur Problematik der elektrophoretischen Sortenunterscheidung am Gliadinmuster des Weizens. Getreide, Mehl und Brot, 30, 210-212.
- JODLBAUER H.P., 1969. Trennung von Weizengliadin durch Polyacrylamidegelelektrophorese. Getreide und Mehl, 6, 47.
- JORDAN E.M., RAYMOND S., 1969. Gel electrophoresis : a new catalyst for acid system. Anal. Biochem., 27, 205-211.
- KASARDA D.D., BERNARDIN J.E., QUALSET C.O., 1976. Relationship of gliadin protein components to chromosomes in hexaploid wheats (Triticum aestivum L.). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 10, 3646-3650.
- LE BRUN J., BEAUX Y., 1978. Méthode de sous-échantillonnage en laboratoire. Bull. BIPEA, Mars, 2 p.
- LEE J.W., 1963. Zone electrophoresis of wheat gluten on polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta, 69, 1, 159-160.

B I B L I O G R A P H I E

- AUTRAN J.C., BUSHUK W., WRIGLEY C.W., ZILLMAN R.R., 1979. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. IV. International comparison of electrophoretic methods. Can. J. Plant Sci. (sous presse).
- BUSHUK W., ZILLMAN R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. Can. J. Plant Sci., 58, 505-515.
- BUSHUK W., ZILLMAN R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. II. Gliadin nomenclature. Can. J. Plant Sci. (sous presse).
- DAMIDAUX R., AUTRAN J.C., GRIGNAC P., FEILLET P., 1978. Mise en évidence de relations applicables en sélection entre l'électrophorégramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de Triticum durum Desf., C.R. Acad. Sc. Paris, 287, Série D, 701-704.
- GUBAREVA N.K., GAVRILYUK I.P., CHERNOBUROVA A.D., 1975. The testing of authenticity and cultivar purity of wheat seeds on electrophoretical spectrum of gliadin. Technique and catalogue cultivar formulas (en russe), Leningrad, VIR.
- GUNZEL G., 1976. Zur Problematik der elektrophoretischen Sortenunterscheidung am Gliadinmuster des Weizens. Getreide, Mehl und Brot, 30, 210-212.
- JODLBAUER H.P., 1969. Trennung von Weizengliadin durch Polyacrylamidegelelektrophorese. Getreide und Mehl, 6, 47.
- JORDAN E.M., RAYMOND S., 1969. Gel electrophoresis : a new catalyst for acid system. Anal. Biochem., 27, 205-211.
- KASARDA D.D., BERNARDIN J.E., QUALSET C.O., 1976. Relationship of gliadin protein components to chromosomes in hexaploid wheats (Triticum aestivum L.). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 10, 3646-3650.
- LE BRUN J., BEAUX Y., 1978. Méthode de sous-échantillonnage en laboratoire. Bull. BIPEA, Mars, 2 p.
- LEE J.W., 1963. Zone electrophoresis of wheat gluten on polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta, 69, 1, 159-160.

TABLE DES MATIERES

	Page
<u>INTRODUCTION</u>	1
ANCIENNES METHODES DE RECONNAISSANCE DES VARIETES DE BLE	
POURQUOI UTILISER L'ELECTROPHORESE POUR IDENTIFIER LES VARIETES ?	
PRINCIPE DE L'ELECTROPHORESE	
LES SUPPORTS D'ELECTROPHORESE	
OBSERVATIONS PRELIMINAIRES SUR LES DIAGRAMMES ELECTROPHORETIQUES	
DIAGRAMMES GLIADINES ET QUALITE DES BLES	
<u>PREMIERE PARTIE : ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON</u>	
1.1 - DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA TECHNIQUE	6
1.2 - EQUIPEMENTS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES	6
a - Equipements	
b - Produits chimiques	
c - Références des fournisseurs	
1.3 - PREPARATION DES SOLUTIONS	10
a - Solution d'extraction des gliadines	
b - Solution mère de lactate d'aluminium	
c - Solution diluée de lactate d'aluminium (tampon d'électrophorèse)	
d - Solutions de coloration des gliadines	
e - Solution de lavage des gels	
f - Solution de conservation des gels	

1.4 - EXTRACTION DES GLIADINES	13
a - Cas d'une variété pure : extraction sur mouture ou sur farine	
b - Cas d'un mélange de variétés : extraction grain par grain	
1.5 - PREPARATION DU GEL D'AMIDON	15
1.6 - ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE	16
a - Précourant	
b - Dépôt des échantillons	
c - Conditions de migration des protéines	
1.7 - COLORATION DU GEL	19
1.8 - PRINCIPALES FAUTES POSSIBLES DE MANIPULATION	20
1.9 - PHOTOGRAPHIE DES GELS	24
a - Choix de l'équipement et des produits photo	
b - Prise de vue	
c - Développement et tirage	
1.10 - INTERPRETATION DU DIAGRAMME	26
a - Caractéristiques du diagramme	
b - Principe de l'interprétation	
c - Cas des variétés pures	
d - Cas des mélanges variétaux	
BIBLIOGRAPHIE	33

DEUXIÈME PARTIE : ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

2.1 - DESCRIPTION SOMMAIRE DE LA TECHNIQUE	35
2.2 - EQUIPEMENTS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES	35
a - Equipements	
b - Produits chimiques	
c - Référence des fournisseurs	
2.3 - PREPARATION DES SOLUTIONS	39
a - Solution d'extraction des gliadines	
b - Solution mère du lactate d'aluminium	
c - Solution diluée de lactate d'aluminium (tampon d'électrophorèse)	
d - Solution de coloration des gliadines	
e - Solution de conservation des gels	
2.4 - EXTRACTION DES GLIADINES	41
a - Cas d'une variété pure : extraction sur mouture ou sur farine	
b - Cas d'un mélange de variétés : extraction grain par grain	
2.5 - PREPARATION DU GEL DE POLYACRYLAMIDE	42
a - Nature du gel de polyacrylamide	
b - Préparation du moule	
c - Formule du gel	
d - Coulage du gel	

2.6 - ELECTROPHORESE PROPREMENT DITE	44
a - Dépôt des échantillons	
b - Conditions de migration des protéines	
2.7 - COLORATION DU GEL	46
2.8 - PRINCIPALES FAUTES POSSIBLES DE MANIPULATION	47
2.9 - PHOTOGRAPHIE DES GELS	49
a - Choix de l'équipement et des produits photo	
b - Prise de vue	
c - Développement et tirage	
2.10 - INTERPRETATION DU DIAGRAMME	50
a - Caractéristiques du diagramme en gel de polyacrylamide	
b - Principe de l'interprétation	

BIBLIOGRAPHIE