

Synthèse préliminaire des différentes recherches analytiques sur la chimiotaxonomie des orges et des malts

par R. SCRIBAN *, J.C. AUTRAN **, B. STROBBEL *, M. NICOLAIDIS *

En 1977, au dernier Congrès de l'EBC (1), nous avons présenté nos tous premiers résultats de recherche sur la chimiotaxonomie des orges obtenus au moyen de l'électrophorèse de zones sur gel d'amidon de la fraction protéique complexe alcool soluble.

Depuis, l'objectif des travaux poursuivis au moyen de différentes méthodes a été de pouvoir déterminer *a posteriori*, ou même *a priori*, la pureté variétale des orges et surtout des malts utilisés en brasserie dans les relations possibles avec leurs qualités technologiques ainsi que leur homogénéité selon le cahier des charges demandé ; ces travaux peuvent également venir confirmer des déterminations botaniques sur orge en cas de contre-expertise et, enfin, sur un plan plus fondamental, de permettre de suivre la stabilité génétique de la variété, l'éventuel polymorphisme biochimique et d'étudier les aspects phylogéniques.

En premier lieu, la technique d'électrophorèse en gel d'amidon a été exploitée au maximum de ses possibilités. L'extraction des protéines est réalisée à 20° C, durant 2 heures par une solution d'éthanol (50 %), de chloro-2-éthanol (25 %) et d'eau distillée (25 %). Après centrifugation, l'extrait est soumis à l'électrophorèse (tampon de pH 3,30 à base de lactate d'aluminium, d'acide lactique et d'urée) durant 4 à 4 h 30 sous 8 Volts/cm. Les bandes protéiques migrées sont fixées à l'acide trichloracétique (20 %) et, après son élimination, sont colorées par la nigrosine (1 g/l) ;

le gel est ensuite décoloré dans l'éthanol à 40 %. Seules les bandes de vitesse de migration lente et moyenne, par rapport au dépôt et à la cathode, sont prises en considération, les bandes très rapides et floues assimilables aux albumines sont éliminées.

Nous avons étudié 30 orges (20 à 2RP, 3 à 2RH, 6 à 6RH et 1 à 6RP). La variété étalon choisie a été Aramir, variété brassicole très cultivée en France (sa bande protéique la plus rapide a été dénommée 100).

La photo n° 1 représente l'électrophorégramme de variétés à 2RP cultivées en France, parmi lesquelles les variétés Bérac et Bérénice sont recommandées par la Chambre Syndicale de la Malterie Française. Nous avons constaté que l'orge ne comportait que de 6 à 10 bandes protéiques identifiables alors que le blé pouvait en présenter une vingtaine (travaux d'AUTRAN et BOURDET de 1975). Nous avons établi un tableau chimiotaxonomique des 30 variétés d'orge en utilisant d'abord comme clé d'entrée les bandes lentes (2, 3 ou 4) et en combinant ensuite les bandes moyennes (de 2 à 5) avec la clé d'entrée. La figure n° 2 représente, de façon très simplifiée, le tableau de détermination variétale obtenu. En raison du nombre limité de bandes protéiques figurées, cette méthode présente des limites certaines quant à son utilisation en malterie-brasserie.

* ENSIA - Chaire de Malterie-Brasserie, Eaux et Boissons Gazeuses, 59509 DOUAI.

** INRA - 34060 MONTPELLIER.

GROUPE BÉRAC

(1)

100 →

(-)



Photo n° 1
Electrophorogramme sur gel d'amidon d'orges de brasserie
(Groupe "Bérac")
(de gauche à droite : variétés Aramir (T), Ager, Robur, Bérac, Bérénice, Carmen, Rika, Alpha)

CLÉ CHIMIO-TAXONOMIQUE DE 30 VARIÉTÉS D'ORGES
GEL D'AMIDON

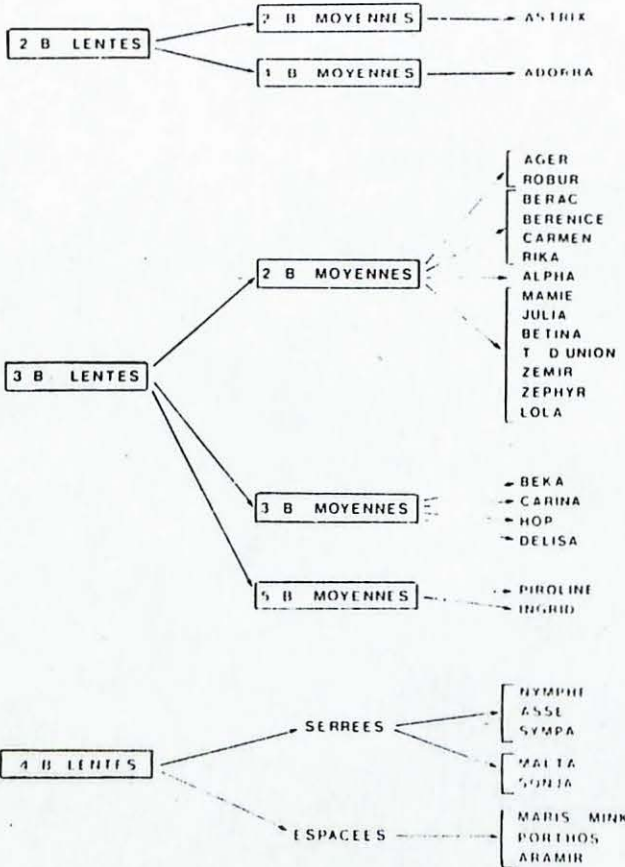


Figure n° 2
Clé chimiotaxonomique d'orges de brasserie
étudiées en électrophorèse sur gel d'amidon

Nous avons tenté ensuite de l'appliquer à la détermination de la pureté variétale des malts. Après de multiples expériences, nous avons constaté malheureusement que la méthode électrophorétique en gel d'amidon était trop peu sensible pour permettre une discrimination variétale précise des malts. En effet, la germination industrielle des orges brassicoles élimine environ 40 % des hordéines de l'orge alcool solubles, représentant en grande partie les protéines de réserve soumises à la désagrégation azotée.

Nous avons alors adapté et exploité une autre méthode beaucoup plus sensible et plus résolutive, c'est-à-dire l'électrofocalisation sur gel (acrylamides, urée 6M — après une étude des concentrations 2 puis 4 et 6M — ampholines R permettant un gradient de pH de 5 à 9). Différents solvants ont été systématiquement étudiés et celui finalement retenu a été le mélange suivant : isopropanol (50 ml) - mercapto-éthanol (0,6 ml) - eau (50 ml). L'extraction s'opère, grain par grain (pour l'orge comme pour le malt), ainsi que l'électrofocalisation sur gel.

Le mode opératoire très détaillé a été décrit dans trois communications déposées en octobre 1978 et publiées à ce jour (2). La révélation des bandes protéiques se faisait alors uniquement par l'acide trichloracétique (12,5 %). Elle a été bien améliorée par la technique suivante ainsi résumée : le colorant utilisé est composé de solution de Bleu de Coomassie, violet R 150 Eastman Kodak (1 g/100 ml) et d'acide trichloracétique à 12 % ; il est mis en contact une nuit avec le gel qui est ensuite rincé à l'acide trichloracétique. Les bandes protéiques apparaissent en fines raies bleu foncé sur le fond bleu pâle du gel et peuvent être photographiées en Polacolor ou en Agfachrome 50L avec un bon pouvoir de résolution (photo n° 3).

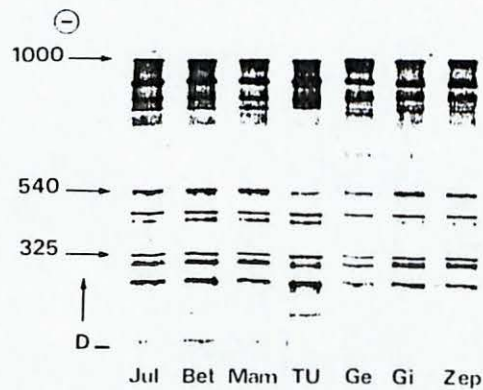


Photo n° 3
Electrophorogramme d'orges étudiées en gel électrofocalisation
(de gauche à droite : variétés Julia (T), Bétina, Mamie, Trait d'Union, Georigle, Gitane, Zephyr)

Les électrophorogrammes peuvent être soumis à l'analyse densitométrique au moyen d'un photomètre intégrateur enregistreur Vernon. La comparaison systématique entre le densitogramme, la photographie, le

gel, permettent de calculer, pour chaque bande du spectre, la vitesse de migration absolue sur le gel et la vitesse de migration relative par rapport à la bande cathodique la plus rapide et la plus colorée 1000 de Julia, orge choisie comme témoin, et enfin son intensité relative. Une fiche du spectre protéique par variété peut alors être ainsi constituée (photo n° 4).

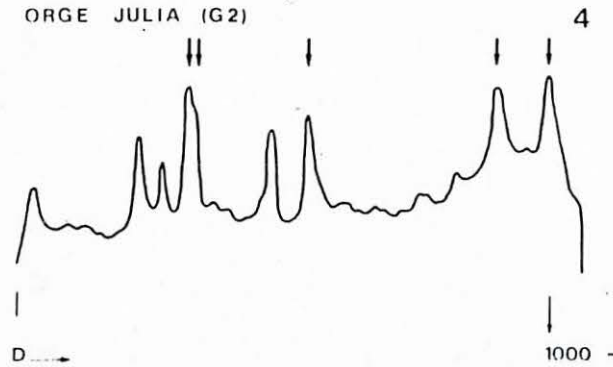


Figure n° 4

Orge Julia témoin : densitogramme du spectre protéique après gel électroforesis

Nous avons étudié expérimentalement la répétabilité du spectre protéique sur des grains isolés d'une orge Julia (semence de départ = G2).

Une légère variabilité de la vitesse relative au niveau des bandes a été observée, mais peu ou pas sur les bandes rapides, mais cela ne modifie en rien l'image globale et spécifique du spectre protéique. Nous en avons tiré les conséquences pour l'interprétation des autres densitogrammes et l'établissement d'une clé chimiotaxonomique.

Nous avons étudié 77 variétés d'orges dont 41 cultivées ou cultivables en France et 36 variétés étrangères dont 28 européennes, 4 de l'Amérique du Nord et 4 de l'Australie et dont certaines sont susceptibles d'être importées. Il y a parmi ces 77 variétés d'orges 54 variétés de 2 rangs de printemps, 7 de 2 rangs d'hiver et 16 à 6 rangs.

Nous avons étudié ensuite les variations possibles du spectre protéique au cours de la germination de l'orge et de sa désagrégation plus ou moins poussée. Une orge Multum a été examinée après 1, 3, 5 et 7 jours de germination (l'indice Kolbach variant de 27 à 48 %) (photo n° 5). 10 bandes protéiques intenses très caractéristiques demeurent inchangées ; certaines, absentes ou à l'état de traces dans l'orge, apparaissent dans le malt désagrégé ; d'autres s'affaiblissent par contre. La comparaison de séries de grains à chaque stade est cependant nécessaire pour bien saisir l'évolution possible. Des observations du même type ont été réalisées sur des orges et malts correspondants des variétés Julia, Aramir, Bérénice, Robur, Nympha et Sympa. Les modifications du spectre protéique seront plus marquées en cas d'emploi excessif de gibbérelline. En conclusion, il apparaît intéressant de disposer de micromalts correspondants aux orges étalons, à titre de référence, dans le cas d'expertises.

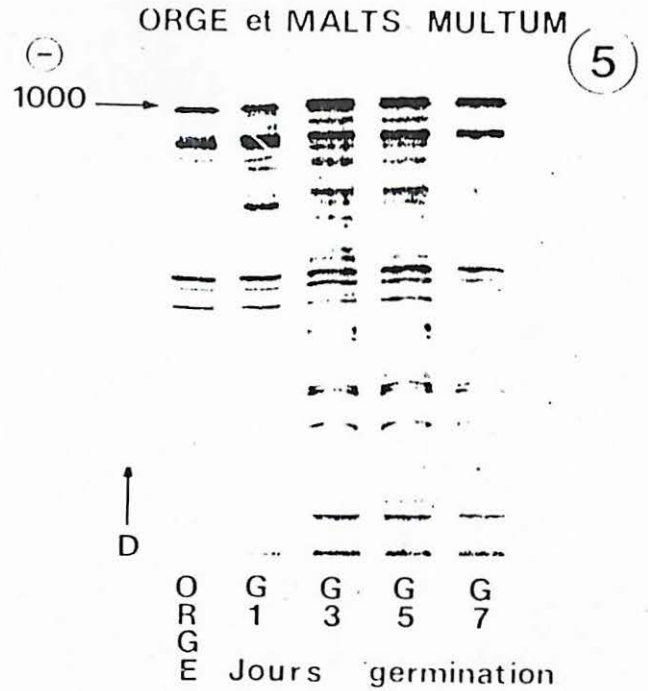


Photo n° 5

Etude du spectre protéique en gel électroforesis de l'orge Multum après 0, 1, 3, 5 et 7 jours de germination

Nous avons étudié également l'influence possible des conditions agrométéorologiques sur 10 échantillons de la même variété d'orge Multum cultivée dans 10 régions agricoles très dispersées géographiquement en France (distance maximum de 400 km) et caractérisés par une fourchette de la teneur en protéines de 9,5 à 13 % m.s. La photo n° 6 et l'analyse densitométrique démontrent que les modifications du spectre protéique sont absolument insignifiantes entre les 10 échantillons, ce qui est fort intéressant ici sur les rôles respectifs du génotype et du milieu sur le phénotype.

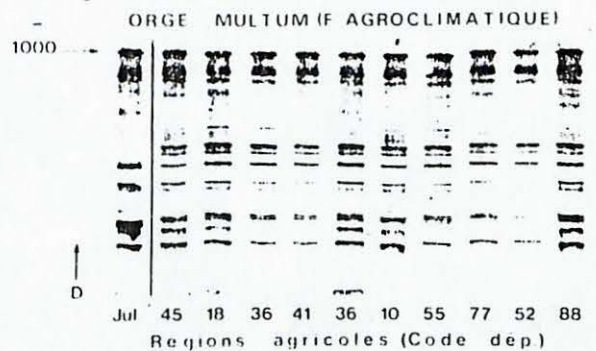


Photo n° 6

Etude de l'influence des facteurs agroclimatiques sur le spectre protéique en gel électroforesis de l'orge Multum

Afin d'éclairer la construction d'une clé chimiotaxonomique pratique et valable, nous avons été conduits en premier lieu à inventorier et classer près de 2.000 bandes de l'ensemble des spectres protéiques des 77 variétés d'orges, par leur mobilité relative et leur

5) fréquence, en utilisant l'analyse informatique. Nous avons utilisé trois méthodes sur un ordinateur IBM 370/158 : la première est une analyse par récurrence avec un pouvoir de discrimination progressif de certaines bandes conduisant à une « arborescence » ; la seconde, tout au contraire, est une recherche des bandes immédiatement les plus discriminantes (2 ou 3 bandes seulement donc à faible fréquence), la troisième, complémentaire, fait entrer la notion d'association de bandes très marquées en intensité et caractéristiques, par groupe unique ou par 2 ou 3 groupes comportant chacun en général 2 bandes, mais parfois 3.

La confrontation permanente et progressive entre les photographies (vision globale), les densitogrammes et les indications des analyses informatiques successives nous permettent de proposer une clé chimio-taxonomique préliminaire. 21 « groupes électrophorétiques » ont été mis en évidence (tableau annexe).

L'ensemble détaillé de la clé chimio-taxonomique sera publié dans les comptes rendus du Congrès EBC de mai 1979 à Berlin (3).

Nous avons ensuite expérimenté la méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide horizontal selon la méthode de Bushuk et Zillman (1978) (4) que nous avons adaptée. Une douzaine de bandes protéiques peuvent être mises en évidence mais il apparaît, dès à présent, que cette méthode présentera moins de pouvoir de discrimination que celle en électrofocalisation sur gel, sur l'orge comme sur le malt.

Une dernière méthode d'électrophorèse en gel de polyacrylamide vertical en milieu sodium dodecylsulfate (SDS) est en cours d'étude par Autran sur l'orge et sur le malt, selon la méthode de Shewry, Ellis, Pratt et Mifflin (1978) (5).

La photo n° 7 représente les couples orge et malt des variétés Sonja et puis Nympe.

La méthode serait d'une grande sensibilité pour l'étude des malts.

En conclusion, pour le moment, c'est la méthode en gel électrofocalisation exploitée à l'ENSIA qui nous semble la plus intéressante afin de déterminer la pureté variétale des malts (et des orges) en liaison avec les problèmes de technologie brassicole.

Nous continuons à étudier l'influence des conditions agroclimatiques, des conditions de la germination sur le spectre protéique variétal. Des directions de recherche ont été abordées également en phylogénie.

Nous remercions vivement les différents sélectionneurs français publics (INRA) et privés, les organismes étrangers qui nous ont fourni aimablement tout le matériel botanique dont nous avons besoin pour nos recherches.

Nous remercions la Chambre Syndicale de la Malterie Française et l'Union Générale de la Brasserie Française pour leur aide financière.

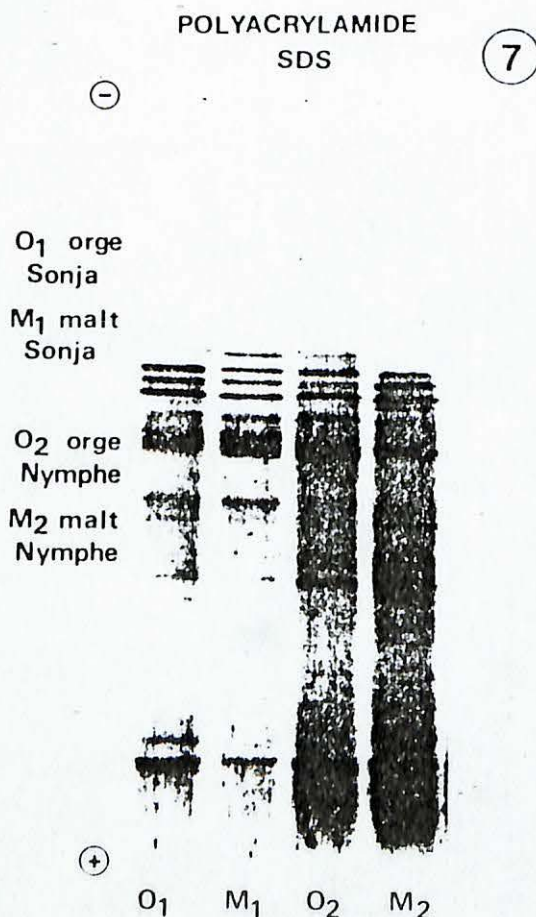


Photo n° 7

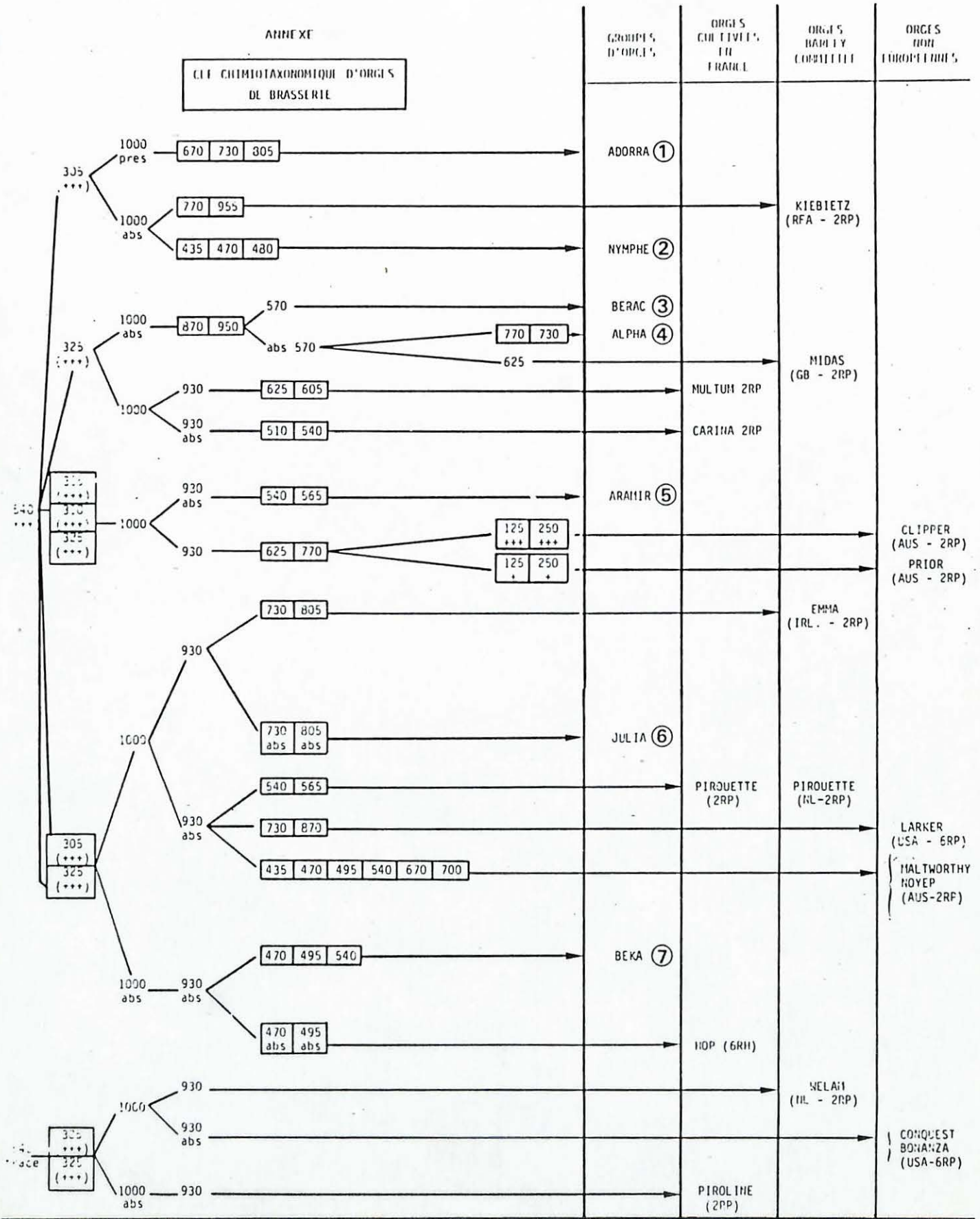
Electrophorèse en gel de polyacrylamide vertical, en milieu SDS, d'orges et de malts Sonja et Nympe

BIBLIOGRAPHIE

- (1) AUTRAN J.C. et SCRIBAN R. — Proc. European Brewery Convention, 1977, 47.
- (2) SCRIBAN R. et STROBBEL B. — C.R. Acad. Sc. Paris, 1978, 287, Série D, n° 8, 841
C.R. Séances de la Société de Biologie, 1978, 172, n° 4, 647
Technical Quarterly, MBAA, 1979, n° 1.
- (3) SCRIBAN R., AUTRAN J.C., STROBBEL B. et NICOLAIDIS M. — Proc. European Brewery Convention, 1979 (sous presse).
- (4) BUSHUK W. et ZILLMAN R.R. — Can. J. Plant Sci., 1978, 58, 505.
- (5) SHEWRY P.R., ELLIS J.R.S., PRATT H.M., MIFFLIN B.J. — J. Sci. Ed. Agric., 1978, 29, 433.

ANNEXE

CLE CHIMIOTAXONOMIQUE D'ORGES DE BRASSERIE



LEGENDE DE L'ARBORESCENCE

1000 : vitesse relative de la bande protéique
 abs : absence
 540 | 565 : exemple d'association de bandes

+++ : forte intensité de coloration
 ③ : n° du "Groupe d'orge"