

BIOCHIMIE APPLIQUÉE. — *Nouvelles perspectives dans l'identification des Orges et des malts par électrophorèse des protéines.* Noté (*) de **Alain Montembault, Jean-Claude Autran, Philippe Joudrier et Manfred Moll**, présentée par Jean Roche.

Un système simplifié d'électrophorèse en milieu S.D.S. est appliqué après extraction globale des protéines sur des grains individuels de 77 cultivars d'Orge. La méthode permet un élargissement du polymorphisme protéique (hordéines + glutélines + protéines solubles) et une amélioration des possibilités d'identification des cultivars. Les diagrammes sont cohérents avec la classification génétique des Orges et peuvent être utiles pour des travaux de sélection ou de biochimie-génétique. Un système complémentaire fondé sur des diagrammes d'isoenzymes est suggéré dans le cas de groupes de cultivars très fortement apparentés.

APPLIED BIOCHEMISTRY. — *New Perspectives in the Identification Barleys and of Malts by Protein Electrophoresis.*

A simplified S.D.S. electrophoretic system was applied to the whole protein extracts from single kernels of 77 Barley cultivars. The method allowed an increase of the proteic (hordeins + glutelins + soluble proteins) polymorphism and an improvement of the cultivar identification possibilities. The patterns were also consistent with the Barley genetic classification and could be helpful in breeding or biochemical genetics studies. A complementary system based on isoenzyme patterns was suggested in case of very closely related group of genotypes.

Face à l'influence décisive de la variété sur la valeur brassicole d'une Orge, les malteurs et les brasseurs souhaitent pouvoir déterminer la pureté variétale des lots d'Orges et de malts qu'ils utilisent. Les méthodes fondées sur les caractères morphologiques du grain sont d'une interprétation délicate, ne présentent pas toujours une spécificité suffisante et ne sont pas constamment utilisables dans le cas des malts. En revanche, les diagrammes électrophorétiques de certaines protéines (hordéines) ou de certaines enzymes du grain, qui constituent des marqueurs génétiques spécifiques, paraissent mieux adaptés pour résoudre le problème des malteurs et des brasseurs.

Plusieurs systèmes (toujours constitués d'un procédé d'extraction des protéines suivi d'une technique de fractionnement électrophorétique) ont été jusqu'ici explorés : électrophorèse en gel d'amidon ([1], [2], [3]) électrophorèse en gel de polyacrylamide ([4] à [7]), isoélectrofocalisation ([8], [9]). Tous les auteurs se sont cependant heurtés à différents problèmes : forte consanguinité des variétés d'Orge (notamment parmi les Orges à deux rangs de printemps) se traduisant par un polymorphisme protéique relativement limité; pouvoir résolutif insuffisant de la méthode (gel d'amidon); difficulté d'obtenir des diagrammes reproductibles et coût élevé (isoélectrofocalisation); technique trop sophistiquée (polyacrylamide en milieu S.D.S. nécessitant une réduction et une alkylation des protéines). Par ailleurs, l'application aux malts a toujours conduit à des diagrammes de moins bonne qualité, plus difficiles à interpréter, souvent différents de ceux de l'Orge correspondante et rendant impossible l'emploi d'une clé de détermination unique.

L'objet de cette Note est donc de proposer un nouveau système électrophorétique à la fois simplifié et plus performant, applicable indifféremment aux orges et aux malts et permettant, grâce à une résolution améliorée des fractions hordéine et glutéline, de mieux discriminer les variétés les plus cultivées.

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — 1. 77 cultivars d'Orge (semences certifiées) obtenus auprès de 10 sélectionneurs ont été analysés (voir tableau). Des micromaltages ont été réalisés sur 30 de ces cultivars par le Laboratoire de Recherche et Développement TEPRAL (Champigneulle, France) (voir tableau). Parallèlement, 9 malts industriels ont été utilisés.

2. L'extraction des protéines est réalisée à partir du grain d'Orge ou d'Orge maltée au moyen de la solution suivante :

	Orge (ml)	Orge maltée (ml)
Solution stock (Tampon <i>Tris</i> 1 M pH 6,8 : 6,25 ml; dodécylsulfate de sodium, 2,0 g; pyronine, 10 mg; glycérol, 10 ml; eau, q.s.p. 28,30 ml).....	3,40	3,40
β -mercaptoéthanol.....	0,95	1,20
Diméthylformamide.....	1,80	2,00
Eau q. s. p.	12,00	12,00

3. Chaque grain, préalablement décortiqué et écrasé au moyen d'un marteau est mis en contact de la solution d'extraction (à raison de 50 mg pour 400 μ l) dans un tube à hémolyse. Après homogénéisation et contact durant 2 à 3 h à température ambiante, le tube est plongé pendant 2 mn 30 s dans un bain-marie bouillant, puis centrifugé (15 mn à 3 500 tr/mn).

4. La séparation électrophorétique est réalisée dans un appareil « Havana » (DESAGA) permettant l'analyse simultanée de 4 \times 12 échantillons en plaques verticales de polyacrylamide de 120 \times 120 \times 1,5 mm.

Chaque plaque est constituée d'un gel de séparation et d'un gel de concentration dont les compositions s'apparentent à celles décrites par Payne et coll. (1979). Le gel de séparation est obtenu en mélangeant 46 ml d'une solution A (acrylamide 22,6 g, méthylène-*bis*-acrylamide 0,186 g, eau q. s. p. 100 ml) 30 ml de tampon *Tris* 1 M, pH 8,8 et, après dégazage, 2 ml de persulfate d'ammonium 1 p. 100, 0,8 ml de dodécylsulfate de sodium 10 p. 100, 40 μ l de TEMED. Le gel de concentration est obtenu en mélangeant 16,8 ml d'une solution B (acrylamide 0,6 g, méthylène-*bis*-acrylamide 8,66 mg), 2,5 ml de tampon *Tris* 1 M, pH 6,8 et, après dégazage, 0,75 ml de persulfate d'ammonium 1 p. 100, 0,2 ml de dodécylsulfate de sodium 10 p. 100, 15 μ l de TEMED.

Le tampon (pH 8,4) utilisé dans les bacs à électrodes est obtenu en diluant 10 fois la solution mère suivante : glycine 141,1 g, *Tris* 30,0 g, dodécylsulfate de sodium 10,0 g, eau q. s. p. 1 000 ml.

Les extraits protéiques sont déposés par série de 12 à l'aide d'une multiseringue Havana (12 \times 10 μ l) et la migration est réalisée pendant une nuit (16 h sous une intensité constante de 15 mA/4 gels à la température déterminée comme optimale de 18°C. La durée de migration peut être réduite à 8 h ou moins en utilisant une intensité plus élevée à condition de stabiliser la température à 18°C au moyen d'un cryostat.

5. Les protéines sont ensuite fixées par immersion des gels durant 30 mn dans l'acide trichloracétique 15 p. 100 (P/V) puis colorées durant 30 mn à une température de 90°C dans une solution à 0,175 p. 100 de Bleu de Coomassie BBR 250 dans l'éthanol-acide acétique-eau (35/10/55 V/V/V). Les diagrammes sont interprétables après seulement 2 h de décoloration dans ce même mélange éthanol-acide acétique-eau.

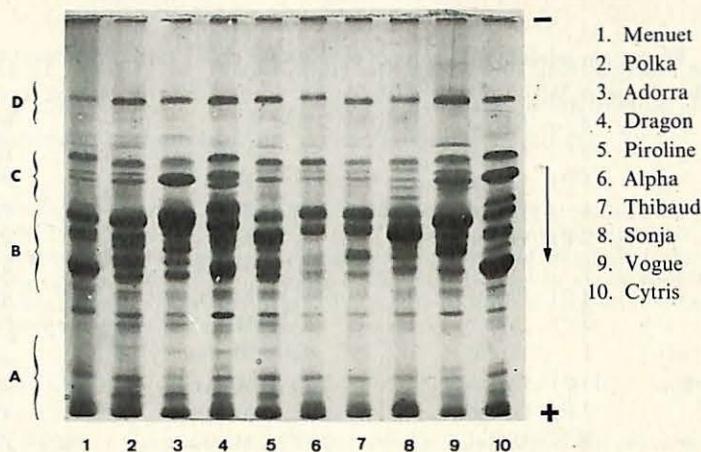
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS. — 1. Comme le montre la figure, les diagrammes apparaissent constitués de 4 zones distinctes : A, B, C et D. Par analogie avec les diagrammes de Shewry et coll. ([6], [7]), de Doll [10] et de Koie et coll. [11], on peut penser que la zone A est constituée d'albumines, de globulines et d'hordéines de faible poids moléculaire et que les zones B et C correspondent aux hordéines. En revanche, la zone D n'existe dans aucun des travaux antérieurs et il s'agit probablement de glutélines que le système particulier de réduction et de coloration utilisé ici permet de révéler.

2. L'examen de variétés d'Orge de différentes provenances montre que les diagrammes ainsi obtenus sont totalement indépendants des facteurs agroclimatiques (5 variétés en 10 lieux). Il en est de même pour les malts (3 variétés en 3 lieux).

3. A l'exception de la zone A, toutes les zones du diagramme présentent un important polymorphisme qualitatif intervariétal.

Ainsi, après analyse des diagrammes des 77 variétés d'Orge, 3 classifications indépendantes peuvent être obtenues :

- 13 types à partir de la seule zone B;
- 13 types à partir de la seule zone C;
- 4 types à partir de la seule zone D.



Electrophoregrammes des 10 premières zones B (B_1 à B_{10}),
de 6 zones C et de 2 zones D.

*Electrophoregrams of the 10 first B zones (B_1 to B_{10}),
of 6 C zones and of 2 D zones.*

4. En prenant en compte l'ensemble des zones du diagramme, 61 % des variétés peuvent être caractérisées soit individuellement (29 %) soit par groupe de 2 (21 %) ou de 3 (11 %) et les autres apparaissent par groupe de 4 à 8 variétés.

Ces résultats n'illustrent cependant que les possibilités minimales de caractérisation car il n'est fait état que des différences qualitatives (mobilités électrophorétiques) des diagrammes. Des différenciations plus poussées sont possibles en utilisant, comme l'ont fait certains travaux antérieurs ([8], [9]), les intensités relatives des constituants.

Il faut également préciser que les groupes de variétés non différenciables individuellement sont constitués d'Orges très apparentées génétiquement. Par exemple, *Igri*, *Viva*, *Pépité* entrent dans un même groupe.

Les variétés les plus cultivées, ainsi que celles recommandées par la chambre Syndicale de la Malterie Française (*Sonja*, *Alpha*, *Astrix*, *Aramir*, *Menuet*, *Bérénice* et *Nymphe*) ont un diagramme différent et, dans plusieurs cas, des variétés non séparées à partir des diagrammes d'électrofocalisation (*Aramir*, *Athos* et *Julia*, *Betina*) ou d'électrophorèse en gel d'amidon (*Nymphe*, *Sonja*, *Sympa*) sont ici différenciables.

5. L'examen des malts semble présenter *a priori* des difficultés supplémentaires et requérir une technique plus sensible. En effet, la germination conduit à une diminution d'environ 40 % de la teneur en hordéine tandis que le touraillage provoque une insolubilisation des protéines. Scriban et coll. [9] avaient par ailleurs noté des modifications non négligeables dans certains diagrammes de malts par rapports aux Orges témoins.

Ces problèmes ont été surmontés par l'emploi d'une solution extractante plus drastique, modifiée notamment par augmentation de la concentration en réducteur (mercaptoéthanol) et en agent dissociant (diméthylformamide). Les protéines sont alors extraites ou resolubilisées sans difficulté et de façon reproductible à partir d'un malt, ce qui permet d'obtenir pour la première fois des diagrammes d'Orges et de malts correspondants, identiques et d'égale qualité.

CONCLUSION. — Un système simplifié et performant d'électrophorèse verticale en gel de polyacrylamide—S.D.S. a été mis au point. A partir d'un grain d'Orge, il est possible d'obtenir un diagramme présentant un important polymorphisme protéique.

TABLEAU

Répartition suivant les 13 groupes de la zone B des 77 variétés d'Orge et de malt.

Distribution of the 77 barley and malt varieties according to the 13 types of the B zone.

Adorra.....	3	Cornel.....	2 (°)	Iris.....	1	Pirate.....	6 (°)
Ager.....	6	Cytris.....	10	Julia.....	8	Piroline.....	5
Alpha.....	6 (°)	Darling.....	10	Katja.....	8	Plaisant.....	8 (°)
Antarès.....	6	Deister.....	1 (°)	Koru.....	1	Polka.....	2
Aramir.....	2 (°)	Dragon.....	4	Kym.....	1	Porthos.....	2 (°)
Asse.....	8	Dram.....	3	Maissonne.....	2	Rika.....	6
Astrix.....	8 (°)	Elsa.....	6	Malta.....	8	Robur.....	6 (°)
Athos.....	2 (°)	Erna.....	2	Marion.....	6	Roxane.....	2
Auréa.....	1	Estelle.....	6 (°)	Mazurka.....	7	Sonja.....	8
Barbe rousse.....	13 (°)	Fannette.....	5	Menuet.....	1	Sympa.....	8 (°)
Béatrice.....	7 (°)	Géorgie.....	1 (°)	Mikado.....	8 (°)	Thibaud.....	7 (°)
Béka.....	9	Gerbel.....	6 (°)	Mogador.....	6 (°)	Triumph.....	3
Bérac.....	7 (°)	Goldspear.....	12 (°)	Monarque.....	8	Viva.....	8 (°)
Bérénice.....	7	Hatif Grignon.....	13	Multum.....	1	Vogue.....	9 (°)
Bétina.....	1 (°)	Havila.....	1	Nicole.....	2	Volla.....	9
Carina.....	4 (°)	Hop.....	13	Nudinka.....	2	Welam.....	10
Céres.....	6 (°)	Hyproly.....	11	Nymphe.....	8 (°)	Yriba.....	2
Cerise.....	1	Igri.....	8 (°)	Ombelle.....	1		
Claret.....	3	Ingrid.....	7	Patty.....	2 (°)		
Coralle.....	2	Irania.....	2 (°)	Pépité.....	8		

(°) Analyse de variétés en micromalt ou malt industriel.

La classification obtenue à partir des zones hordéines B et C (respectivement 13 et 13 types différents sur 77 cultivars analysés) apparaît très discriminante. Contrairement à celles fondées sur l'électrophorèse conventionnelle ou l'électrofocalisation, cette classification présente l'avantage d'être cohérente avec la distinction génétique (gènes Hor 2 : zone B et Hor 1 : zone C) établie par Shewry et coll. [7], Koie et coll. [11] et d'être ainsi précieuse pour le sélectionneur.

La sensibilité du système et l'amélioration des conditions d'extraction permet son application à la détermination de la pureté variétale d'un malt. L'existence d'un diagramme identique pour l'Orge et pour le malt correspondant ouvre par ailleurs la possibilité d'une classification unique d'identification variétale.

Pour le cas des variétés très apparentées génétiquement et entrant dans des groupes non différenciables, des techniques complémentaires fondées sur les diagrammes de certaines enzymes polymorphes peuvent être utilisés. C'est ce que nous étudions actuellement.

(*) Remise le 5 juillet 1982.

[1] J. C. AUTRAN et coll., *Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., Amsterdam*, 1977, p. 47-62.

[2] O. NEYRENEUF, D.E.A., Université Paris-VI, 1978.

[3] MCCAUSLAND et coll., *Australian J. exp. Agric. Animal Husbandry*, 17, 1977, p. 1020-1027.[4] WILTEN et coll., *Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., Munich*, 17, 1979, p. 533-543.[5] MARCHYLO et coll., *Can. J. Plant. Sc.*, 60, 1980, p. 1343-1350.[6] P. R. SHEWRY et coll., *J. Natn. Inst. Agric. Bot.*, 15, 1979, p. 34-50.[7] P. R. SHEWRY et coll., *J. Sc. Fd. Agric.*, 29, 1978, p. 587-596.[8] R. SCRIBAN et coll., *C.R. Soc. Biol.*, 172, n° 4, 1978, p. 647.[9] SCRIBAN et coll., *Proc. Eur. Brew. Conv. Cong., Munich*, 17, 1979, p. 571-586.[10] H. DOLL, *Barley Genetics III*, Thieming, Munich, 1976, p. 542-546.[11] B. KOIE et coll., *J.A. E.A. Vienna*, 1976, p. 56-61.

Centre de Recherches Agronomiques de Montpellier,
Laboratoire de Technologie des Céréales, 9, place Viala, 34060 Montpellier Cedex.

Laboratoire de Recherches et Développement,
TEPRAL, 2, rue Gabriel-Bour, 54250 Champigneulle.