

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Isolement et caractérisation des composants γ gliadines 45 et 42 associés aux caractéristiques viscoélastiques du gluten de Blé dur.* Note (*) de Michel Cottenet, Jean-Claude Autran et Philippe Joudrier, présentée par Jean Roche.

L'isolement des composants gamma gliadines 45 et 42 de Blé dur a permis de caractériser ces constituants dans deux systèmes électrophorétiques différents. Ces deux protéines, de poids moléculaire identique (45 000) ont une composition en acides aminés similaire.

L'hypothèse d'une relation à la fois d'ordre génétique et de type fonctionnel (basée sur l'hydrophobicité globale des protéines) entre les propriétés viscoélastiques du gluten et la présence de la gliadine 45 et 42 est présentée.

PLANT PHYSIOLOGY. — Isolation and Characterization of γ -Gliadins 45 and 42 Compounds Associated to Viscoelastic Characteristics of the Gluten of Durum Wheat.

Gamma gliadin components 45 and 42 isolated from durum Wheat have been clearly characterized through two different electrophoretic systems. These two proteins have the same molecular weight (45 000 daltons) and a similar amino-acid composition.

The hypothesis of a relationship of both a genetic and functional type (based on the hydrophobicity of proteins) with viscoelastic properties of gluten and the presence of 45 and 42 gliadin fractions is discussed.

En raison du rôle important que jouent les protéines sur la qualité boulangère ou pastière, différentes équipes cherchent à établir des relations entre la composition protéique et cette qualité.

Dans le cas du Blé dur (*Triticum durum* Desf.), Damidaux et Feillet [1] ont mis en évidence l'existence d'une relation très étroite entre les propriétés viscoélastiques du gluten, facteur de la qualité culinaire [2], et la présence de constituants gliadine de mobilité électrophorétique 45 (nomenclature internationale [3]) — marqueur d'une viscoélasticité élevée — ou 42 — marqueur d'une viscoélasticité faible. Cette relation a été confirmée par Kosmolak et coll. [4] et Du Cros et coll. [5].

Par ailleurs, les constituants 45 et 42 sont contrôlés par deux allèles co-dominants d'un même gène, localisés sur le chromosome 1 B ([6], [7]).

La question se pose donc de savoir quelle est la nature de la relation existant entre la présence de la bande 45 (ou 42) et les propriétés viscoélastiques du gluten. Trois hypothèses peuvent être actuellement formulées :

— la première, de marquage génétique, suppose que le gène gouvernant la synthèse des gliadines 45 et 42 soit étroitement associé au(x) gène(s) responsable(s) de la synthèse de protéines présentant des propriétés viscoélastiques ;

— la seconde, de type fonctionnel, fait appel à une structure déterminée des protéines 45 et 42 ;

— la troisième enfin, est la synthèse des deux précédentes.

Pour trancher entre ces hypothèses, il est nécessaire de mieux connaître les constituants 45 et 42 d'un point de vue biochimique.

La première étape du travail qui correspond à l'isolement et la caractérisation des constituants γ gliadines 45 et 42 est rapportée dans la présente Note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Deux variétés de Blé dur inscrites au *Catalogue Français* ont été choisies. Agathe, de bonne qualité, possède la gliadine 45 et Calvinor, de qualité médiocre, possède la gliadine 42.

— extraction de la gliadine totale : les gliadines sont extraites selon la technique de Charbonnier [8], modifiée par Autran et coll. [9] ;

— chromatographie d'échanges d'ions : la technique de Simmonds et Winzor [10] développée par Charbonnier [8] et Ewart [11] a été reprise. Deux colonnes sont utilisées ; 3 g de gliadine totale dissoute dans le tampon acétate de sodium 0,005 M sont déposés sur une première colonne (Carboxyméthylcellulose 52, diamètre 5 cm, hauteur de gel 15 cm, débit 70 ml/h). Les fractions ω , γ , β et α gliadines sont séparées après élution par un gradient linéaire croissant (molarité de 0,005 à 0,05). Sur la deuxième colonne (CM 52, diamètre 2 cm, hauteur

de gel 20 cm, débit 40 ml/h) des dépôts de 200 à 400 mg correspondant essentiellement à la fraction γ gliadine sont élués par un gradient linéaire croissant (molarité de 0,005 à 0,038);

— chromatofocalisation (Pharmacia) : une colonne (Poly Buffer Exchanger 94, diamètre 1 cm, hauteur de gel 18 cm, débit 20 ml/h) équilibrée dans un tampon imidazole 0,025 M, diméthylformamide 2 M pH 7,4 est utilisée. L'éluant est le Poly Buffer 74-HCl pH 4,0 dilué 8 fois;

— électrophorèse : deux systèmes différents ont été utilisés : l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (tampon lactate d'aluminium pH 3,1) selon la technique de Bushuk et Zillman [12] et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu sodium-dodécyl-sulfate (SDS) pH 8,4 développée par Laemmli [13], modifiée par Payne et Corfield [14] et Montebault et coll. [15];

— poids moléculaire : l'utilisation de protéines de poids moléculaire connu dans les gels de polyacrylamide-SDS a permis de faire une estimation du poids moléculaire;

— composition en acides aminés ⁽¹⁾ — elle a été déterminée avec un auto-analyseur « Beckman » sur des échantillons ayant subi 24 h d'hydrolyse (HCl 6 N, 110°C, sous atmosphère d'azote). Le tryptophane n'a pas été dosé.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La purification des constituants γ gliadines 45 et 42 est obtenue par une séquence de chromatographies (tableau I). Pour la γ gliadine 45, deux chromatographies d'échanges d'ions sur CM 52 sont successivement utilisées. Les fractions éluées entre 0,035 et 0,045 M d'acétate de sodium à partir de la gliadine totale du blé Agathe et correspondant au groupe des γ gliadines sont récupérées puis redéposées sur la colonne de chromatofocalisation équilibrée par le tampon imidazole. Dans ces conditions, le constituant 45, n'étant pas retenu sur la colonne, peut être récupéré à l'état pur au cours du lavage. En ce qui concerne la γ gliadine 42, l'isolement est obtenu selon un protocole semblable mais simplifié : une seule étape de chromatographie d'échanges d'ions à partir de la gliadine totale du blé Calvinor, suivie d'une chromatofocalisation au cours de laquelle le constituant 42 est également non retenu sur la colonne.

La pureté des constituants 45 et 42 a été contrôlée dans les deux systèmes électrophorétiques décrits : gel de polyacrylamide, pH 3,1 et gel de polyacrylamide-SDS, pH 8,4 (fig. 1 à 4). Ce dernier système a permis en outre d'estimer que les poids moléculaires des deux γ gliadines 45 et 42 étaient pratiquement identiques et de l'ordre de $45\,000 \pm 500$.

Le tableau II fournit les compositions en acides aminés des γ gliadines 45 et 42 purifiées comparativement à une gliadine totale et à deux γ gliadines totales. Ces résultats montrent que les constituants 45 et 42 possèdent les caractéristiques classiques des gliadines (45%

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Caractérisation par électrophorèse en gel de polyacrylamide pH 3,1 de différentes fractions gliadines du Blé Agathe après chromatofocalisation. 1 et 12, gliadine totale; 4, 5 et 6, γ gliadine 45 purifiée.

Fig. 1. — *Electrophoretic characterization in pH 3.1 polyacrylamid gel of different gliadin fractions from Agathe following chromatofocusing. 1 and 12, whole gliadin; 4, 5 and 6, purified γ gliadin 45.*

Fig. 2. — Caractérisation par électrophorèse en gel de polyacrylamide pH 3,1 de différentes fractions gliadines du Blé Calvinor après chromatofocalisation. 1 et 11, gliadine totale; 5 et 6, γ gliadine 42 purifiée.

Fig. 2. — *Electrophoretic characterization in pH 3.1 polyacrylamid gel of different gliadin fractions from Calvinor following chromatofocusing. 1 and 11, whole gliadin; 5 and 6, purified γ gliadin 42.*

Fig. 3. — Caractérisation par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS pH 8,4 de différentes fractions gliadines du Blé Agathe après chromatofocalisation. 1 et 9, gliadine totale; 10, protéines de référence; 5, γ gliadine 45 purifiée.

Fig. 3. — *Electrophoretic characterization in pH 8.4 SDS-polyacrylamid gel of different gliadin fractions from Agathe following chromatofocusing. 1 and 9, whole gliadin; 10, protein standards; 5, purified γ gliadin 45.*

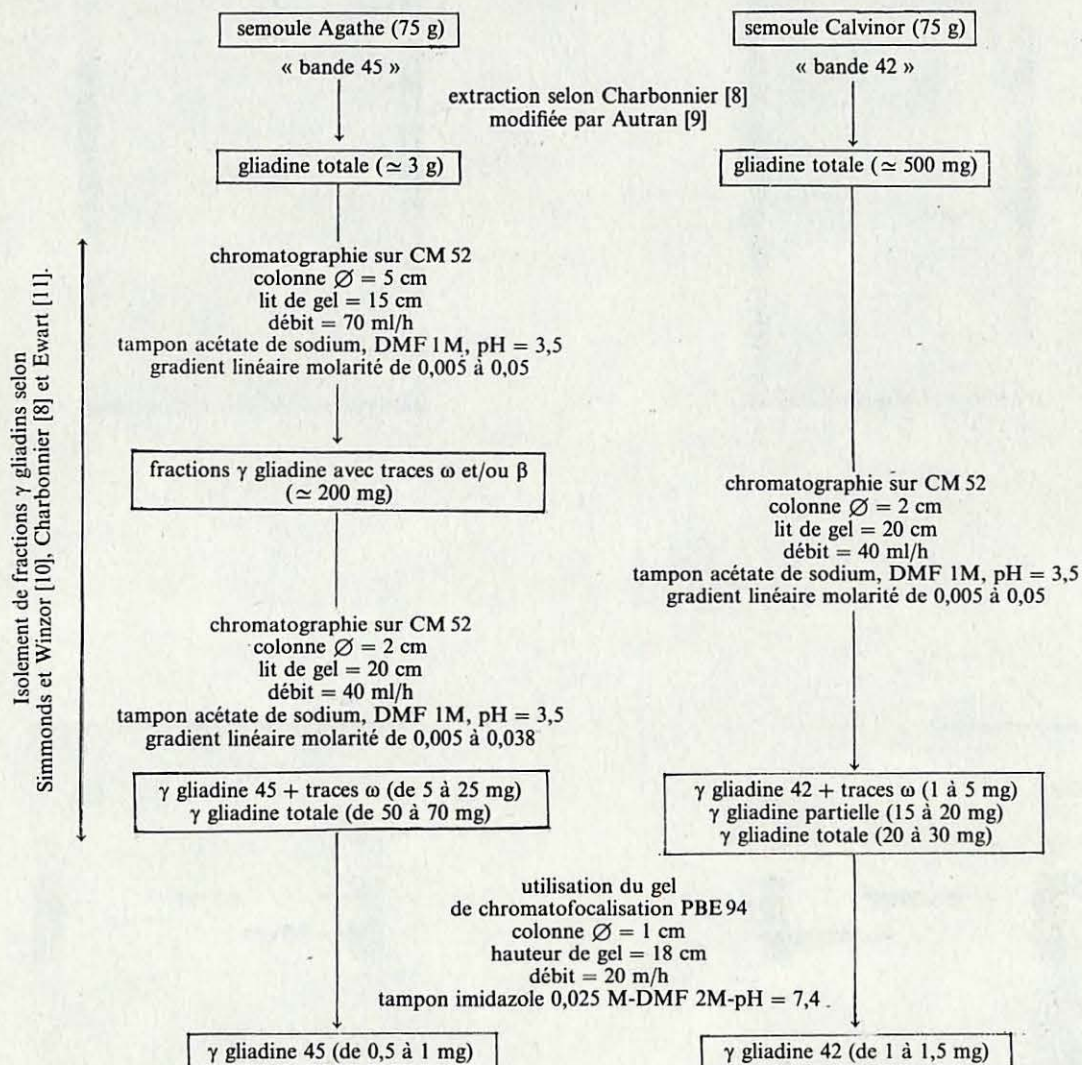
Fig. 4. — Caractérisation par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS pH 8,4 de différentes gliadines du Blé Calvinor après chromatofocalisation. 2 et 11, gliadine totale; 1, protéines de référence; 7, γ gliadine 42 purifiée.

Fig. 4. — *Electrophoretic characterization in pH 8.4 SDS-polyacrylamid gel of different gliadin fractions from Calvinor following chromatofocusing. 2 and 11, whole gliadin; 1, protein standards; 7, purified γ gliadin 42.*

TABLEAU I

Protocole expérimental mis en œuvre pour l'isolement et la purification des constituants γ gliadines 45 et 42.

Experimental procedure for isolation and purification of γ gliadins 45 et 42.



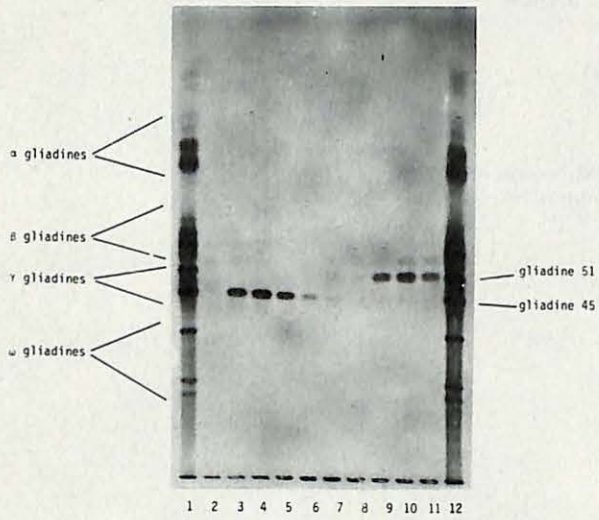


Fig. 1

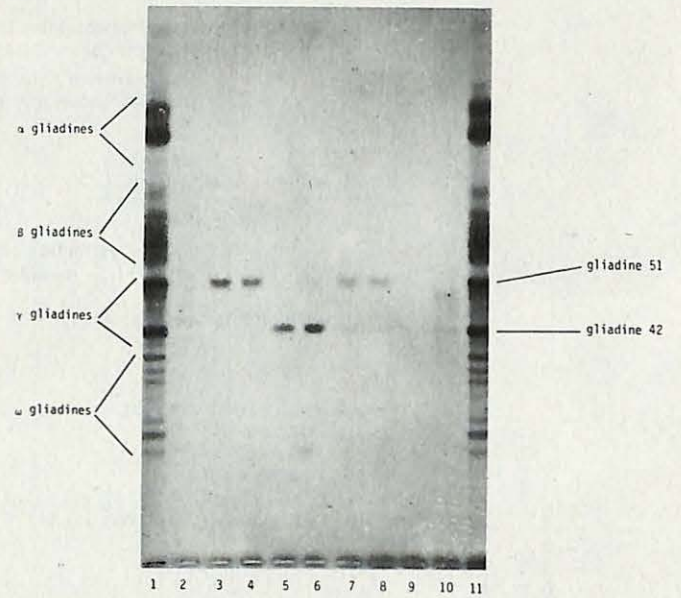


Fig. 2

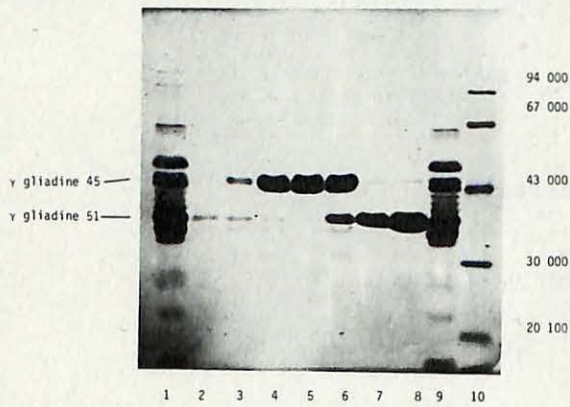


Fig. 3

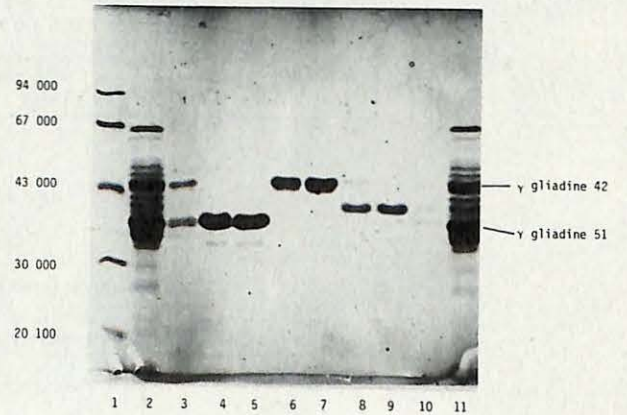


Fig. 4

TABLEAU II

Composition en acides aminés de la gliadine totale, de la fraction γ gliadine et des γ gliadines 45 et 42 purifiées (nombre de résidus pour 1 000).

Amino acid composition of whole-gliadin, γ gliadin fraction and purified γ gliadins 45 and 42 (residues/1,000 total residues).

	Gliadine ^(a) totale	γ gliadine ^(a)	γ gliadine ^(b)	45	42
Gly	43	26	27	23	26
Ser	50	40	47	42	41
Thr	23	15	21	24	25
1/2 Cys	24	22	24	17	14
Tyr	16	8	7	5	6
Total AA neutres	156	111	126	111	112
Glx	378	426	403	457	433
Asx	25	18	18	37	31
Total AA acides ^(c)	403	444	421	494	464
Lys	7	4		10	9
Arg	21	12		25	21
His	19	14		17	21
Total AA basiques	47	30	29	52	51
Ala	29	26	31	26	27
Val	43	39	41	34	29
Leu	68	65	70	57	60
Ile	40	44	49	31	34
Pro	158	178	175	120	140
Phe	44	54	51	75	78
Met	12	9	11	—	7
Total AA hydrophobes	394	415	428	343	375

^(a) Pepin (1981) variété Capitole; ^(b) Charbonnier et Mosse (1980) variété Cappelle; ^(c) total surestimé par le fait que Glx = acide glutamique + glutamine et Asx = acide aspartique + asparagine.

en Glx et 13% en Pro), et certaines caractéristiques du groupe γ gliadine (teneur faible en Tyr et Met, élevée en Phe, Glx et Asx) (16, 17 et 18). Par contre, on ne retrouve pas chez les constituants 45 et 42 certaines autres caractéristiques (teneur élevée en Pro et Ile, teneur faible en acides aminés basiques) lesquelles avaient été observées, il est vrai, chez le Blé tendre et non chez le Blé dur.

Dans l'ensemble, les compositions en acides aminés des constituants 45 et 42 sont très voisines, sauf au niveau des résidus acides et des résidus hydrophobes. L'hydrophobicité ainsi calculée apparaît sensiblement plus élevée pour la protéine 42 (375 résidus pour 1 000) que pour la protéine 45 (343 résidus pour 1 000). Compte tenu toutefois des résultats de Godon et Popineau ([19] et [20]) montrant que les gliadines d'un Blé dur de bonne qualité (type 45) présentent globalement une hydrophobicité de surface plus élevée que celles d'un Blé de mauvaise qualité (type 42) et qu'en particulier le constituant 45 apparaît plus hydrophobe que le constituant 42, il semble difficile de prendre en compte cette différence dans l'hydrophobicité calculée. Mais cette contradiction apparente doit précisément nous amener à penser qu'il existe d'importantes différences au niveau des structures tridimensionnelles. Ainsi, la gliadine 45 qui présente une hydrophobicité de surface plus élevée que la gliadine 42 tout en ayant un nombre plus faible de résidus hydrophobes, en particulier de proline, doit nécessairement se caractériser par une répartition très différente des régions hydrophobes et par une plus grande accessibilité de

ces dernières. Cela renforce l'idée d'une relation de type fonctionnel entre la présence des constituants 45 ou 42 et la viscoélasticité du gluten.

CONCLUSION. — L'isolement des constituants γ gliadines 45 et 42 a pu être réalisé par une séquence classique de chromatographies : échanges d'ions sur carboxyméthylcellulose suivi d'une chromatofocalisation. A notre connaissance, l'isolement de fractions de gliadines n'avait encore jamais été rapporté chez le Blé dur.

Les constituants 45 et 42 dépendant d'allèles d'un même gène, on pouvait s'attendre à une homologie très grande des γ gliadines 45 et 42 ; cela est ici confirmé par la similitude de composition en acides aminés de ces protéines ainsi que par l'identité de leur poids moléculaire. L'absence de relation apparente entre la somme des résidus hydrophobes (plus élevée chez la gliadine 42) et l'hydrophobicité de surface (plus élevée chez la gliadine 45) [21] semble indiquer une différence importante dans les structures tridimensionnelles, la localisation et l'accessibilité des régions hydrophobes des protéines 45 et 42. Cette constatation irait plutôt dans le sens d'une relation de type fonctionnel.

D'autres techniques doivent maintenant être mises en œuvre pour essayer de préciser les différences structurales entre ces deux protéines (cartes d'hydrolyse enzymatique, réactions immunochimiques, séquence N-terminale). Comme il est toutefois peu vraisemblable qu'une protéine à elle seule rende compte de l'ensemble des caractéristiques de qualité d'un Blé, l'étude d'autres constituants (fractions lipidiques et sous-unités gluténines) ne doit pas pour autant être négligée.

(¹) Dosages effectués au Laboratoire d'Analyses Biochimiques et Organiques du G.E.R.D.A.T. Montpellier.

(*) Remise le 30 mai 1983, acceptée le 27 juin 1983.

- [1] R. DAMIDAUX et P. FEILLET, *Ann. technol. Agric.*, 28, (4), 1978, p. 799-808.
- [2] R. DAMIDAUX, J. C. AUTRAN, P. GRIGNAC et P. FEILLET, *Comptes rendus*, 287, série D, 1978, p. 701.
- [3] W. BUSHUK et R. R. ZILLMAN, *Can. J. Plant Sc.*, 58, 1978, p. 505-515.
- [4] F. G. KOSMOLAK, J. E. DEXTER, R. R. MATSUO, D. LEISLE et B. A. MARCHYLO, *Can J. Plant Sc.*, 60, 1980, p. 427-432.
- [5] D. L. DU CROS, C. W. WRIGLEY et R. A. HARE, *Aust. J. Agric. Res.*, 33, 1982, p. 429-442.
- [6] R. DAMIDAUX, J. C. AUTRAN, P. GRIGNAC et P. FEILLET, *Comptes rendus*, 291, série D, 1980, p. 585.
- [7] L. R. JOPPA, K. KHAN et N. D. WILLIAMS, *Theor. Appl. Genet.*, 64, 1983.
- [8] L. CHARBONNIER, *Comptes rendus*, 271, série D, 1970, p. 2042.
- [9] J. C. AUTRAN, J. L. LEW, C. C. NIMMO et D. D. KASARDA, *Nature*, 282, 1979, p. 527-529.
- [10] D. H. SIMMONDS et D. J. WINZOR, *Aust. J. Biol. Sc.*, 14, 1961, p. 680.
- [11] J. A. D. EWART, *J. Sc. Food Agric.*, 26, 1975, p. 1021-1025.
- [12] W. BUSHUK et R. R. ZILLMAN, *Cereal Foods World*, 22, (9), 1977, p. 475.
- [13] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 277, 1970, p. 680-685.
- [14] P. I. PAYNE et K. G. CORFIELD, *Planta*, 145, 1979, p. 83-88.
- [15] A. MONTEBAULT, J. C. AUTRAN, P. JOUDRIER et M. MOLL, *Comptes rendus*, 295, série III, 1982, p. 205.
- [16] D. PÉPIN, *Thèse*, Orsay, n° 3121, 1981, 141 p.
- [17] F. R. HUEBNER, J. A. ROTHFUS et J. S. WALL, *Cereal Chem.*, 1967, 44, p. 221-229.
- [18] L. CHARBONNIER et J. MOSSE, *J. Sc. Food Agric.*, 31, 1980, p. 54-61.
- [19] Y. POPINEAU et B. GODON, *Comptes rendus*, 287, série D, 1978, p. 1051.
- [20] B. GODON et Y. POPINEAU, *Agronomie*, 1, (2), 1981, p. 77-82.
- [21] K. A. CALDWELL, *J. Sc. Food Agric.*, 30, 1979, p. 185-196.

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