

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — Isolement et caractérisation de deux gliadines de faible poids moléculaire du Blé dur : GFPM 45 et GFPM 42. Comparaison avec les γ -gliadines 45 et 42.

Note de Michel Cottenet, Pierre Feillet et Jean-Claude Autran, présentée par Jean Roche.

Remise le 30 janvier 1984, acceptée le 19 mars 1984.

Deux gliadines de faible poids moléculaire, GFPM 45 et GFPM 42, ont été isolées. Bien que leurs mobilités électrophorétiques à pH acide soient respectivement identiques à celles des γ -gliadines 45 et 42, il ressort des analyses effectuées (poids moléculaire, composition en acides aminés, hydrophobicité théorique, cartes tryptiques) que les GFPM 45 et 42 ne présentent aucune analogie de structure avec les γ -45 et 42.

PLANT PHYSIOLOGY. — Isolation and Characterization of Two Low Molecular Weight Gliadins of Durum Wheat: LMWG 45 and LMWC 42. Comparison with γ -Gliadins 45 and 42.

Two low molecular weight gliadin, LMWG 45 and LMWG 42, have been isolated. Their electrophoretic mobility at pH acid are identical with those of γ -gliadins 45 and 42; molecular weight, amino-acid composition, theoretical hydrophobicity and tryptic peptide mapping allow us to conclude in favour of large structural differences between components LMWG and γ .

INTRODUCTION. — Les gliadines sont les fractions protéiques du Blé extractibles par l'éthanol 70% [1]. Elles se caractérisent par un poids moléculaire généralement compris entre 25 000 et 70 000 daltons [1]; par une teneur élevée en acide glutamique + glutamine (40 à 50%) et en proline (10 à 15%) [2]; par une faible teneur en acides aminés basiques [3]. Leur hétérogénéité (40 à 50 constituants en électrophorèse bidimensionnelle [4], [5]) semble plus attribuable à l'existence d'un système multigénique qu'à des modifications post-traductionnelles [6].

Un groupe de gliadines appelé Gliadines de Faible Poids Moléculaires (GFPM) en raison de leur poids moléculaire compris entre 16 000 et 19 000 daltons, de mobilités électrophorétiques à pH acide identiques à celles des γ , β et α -gliadines et de ce fait difficiles à déceler, a été récemment identifié dans les Blés tendres ([7], [8], [9]) et les Blés durs [8] en mélange [8] ou après purification ([7], [9]). Ces GFPM se différencient également des autres gliadines par leur teneur plus élevée en acides aminés soufrés et inférieure en acide glutamique et proline ainsi que par la localisation des gènes contrôlant leur synthèse [10].

Lors de la purification des γ -gliadines 45 et 42 associées à la qualité culinaire intrinsèque des Blés durs [11], nous avons isolé deux GFPM (GFPM 45 et GFPM 42). Leurs mobilités électrophorétiques à pH 3,1 sont respectivement identiques à celles des γ -gliadines 45 et 42.

L'objet de la présente Note est de rapporter l'isolement et la caractérisation de ces deux protéines et de discuter de leur rôle éventuel de marqueur de qualité en relation avec les γ -gliadines 45 et 42.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Extraction des gliadines* : à partir de la variété Agathé, de bonne qualité culinaire et possédant la γ -gliadine 45, et la variété Calvinor, de qualité culinaire médiocre et possédant la γ -gliadine 42, selon la technique d'Autran et coll. [12].

Isolement et purification des GFPM 45 et 42 : dans les conditions retenues par Cottenet et coll. [11] pour isoler les γ -gliadines 45 et 42 par chromatographie d'échanges d'ions sur CMC 52 et chromatofocalisation.

Électrophorèses : en gel de polyacrylamide (tampon lactate d'aluminium pH 3,1 : PAGE) selon la technique de Bushuk et Zillman [13], et en gel de polyacrylamide en milieu sodium-dodécyl-sulfate pH 8,4 (SDS-PAGE) selon la technique de Montebault et coll. [14].

Poids moléculaire : par SDS-PAGE [14] en présence de protéines de poids moléculaire connu (phosphorylase $b=94\,000$ daltons; albumine= $67\,000$ daltons; ovalbumine= $43\,000$ daltons; anhydrase carbonique= $30\,000$ daltons; inhibiteur trypsique= $20\,100$ daltons).

Composition en acides aminés (¹) : avec un auto-analyseur « Beckman » après 24 h d'hydrolyse (HCl 6 N, 110°C, sous atmosphère d'azote). Le tryptophane n'a pas été dosé. L'hydrophobicité théorique ($H\Phi_{av}$) est déduite de la composition en acides aminés [15].

Cartes tryptiques bidimensionnelles : la technique d'Ewart [16] modifiée par Udenfriend et coll. [17] a été utilisée.

Préparation de l'échantillon : la protéine lyophilisée (2 à 3 nmoles) dissoute dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM (1 mg/ml) est digérée par la trypsine (rapport enzyme-substrat = 1 : 100), l'incubation dure 15 h à 37°C, puis est poursuivie après addition d'une même quantité de trypsine fraîche pendant 4 h. Les peptides obtenus sont lyophilisés cinq fois après reprise par des quantités décroissantes d'eau distillée pour éliminer toutes traces de bicarbonate d'ammonium.

Électrophorèse de zone (1^{re} dimension) : le résidu peptidique repris par 5 μ l d'acide acétique 5% est déposé près de l'anode sur une couche mince de cellulose (0,1 mm d'épaisseur, 20 \times 20 cm). L'électrophorèse réalisée à 400 V pendant 1 h 45 mn est contrôlée à l'aide de fushine acide. Le tampon a la composition suivante (v/v) : pyridine 2%, acétone 15%, acide acétique 4%, eau distillée 79%.

Chromatographie de partage (2^e dimension) : après électrophorèse, la couche mince est séchée 30 mn puis placée en position verticale dans une cuve en verre. La séparation chromatographique est réalisée pendant 6 h avec le tampon suivant (v/v) : pyridine 25%, butanol 37,5%, acide acétique 7,5%, eau distillée 30%.

Révélation : la couche mince est séchée rapidement. Les peptides révélés par vaporisations successives de collidine et de fluoescamine sont visualisés sous ultraviolets à 366 nm.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — La caractérisation électrophorétique (PAGE et SDS-PAGE) des fractions isolées après chromatographie sur CMC 52 montre que les constituants de mobilité 45 (PAGE) sont élués d'une part vers 0,040 M d'acétate de sodium (γ -gliadine 45) et d'autre part vers 0,030 M (GFPM 45) en présence d' ω -35. De même, un constituant de mobilité identique à la γ -42 (GFPM 42) est élué à faible force ionique avec les ω -33, ω -35 et ω -38. Les GFPM 45 et 42 sont ensuite séparées des fractions ω par chromatofocalisation.

1. Les figures 1 à 4 confirment que les constituants GFPM 45 et GFPM 42 ainsi isolés présentent respectivement la même mobilité (PAGE) que les γ -45 et γ -42. En revanche, leur migration en SDS-PAGE est beaucoup plus rapide que les gliadines

EXPLICATION DES PLANCHES

Planche 1

Caractérisation par électrophorèse en gel de polyacrylamide pH 3,1 (PAGE) et en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) des GFPM 45 et 42 et des γ -gliadines 45 et 42.

Electrophoretic characterization in pH 3.1 polyacrylamid gel (PAGE) and in pH 8.4 SDS-polyacrylamid gel (SDS-PAGE) of LMWG 45 and 42 and γ -gliadins 45 and 42.

Fig. 1. — 1-3-4 : témoins gliadines totales (Agathé); 2-5 : GFPM 45.

Fig. 1. — 1-3-4: whole gliadin (Agathe); 2-5: LMWG 45.

Fig. 2. — 1-4 : témoin gliadines totales (Agathé); 5 : protéines de référence; 2-3 : γ -gliadine 45.

Fig. 2. — 1-4: whole gliadin (Agathe); 5: protein standards; 2-3: γ -gliadin 45.

Fig. 3. — 1-5-8 : témoin gliadines totales (Calvinor); 4-6 : GFPM 42.

Fig. 3. — 1-5-8: whole gliadin (Calvinor); 4-6: LMWG 42.

Fig. 4. — 1-4 : témoin gliadines totales (Calvinor); 5 : protéines de référence; 2-3 : γ -gliadine 42.

Fig. 4. — 1-4: whole gliadin (Calvinor); 5: protein standards; 2-3: γ -gliadin 42.

FIG. 1 : GIPM 45

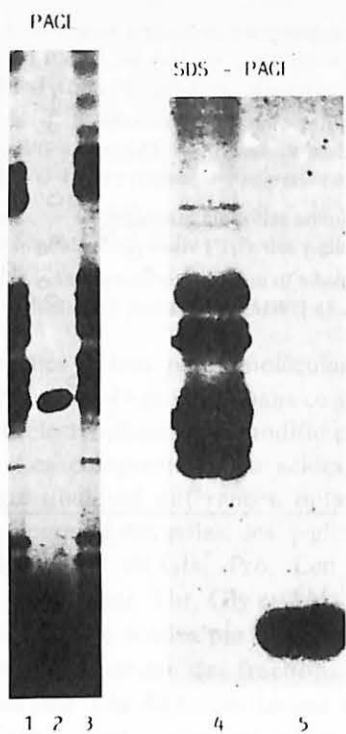


FIG. 2 : γ -gliadine 45

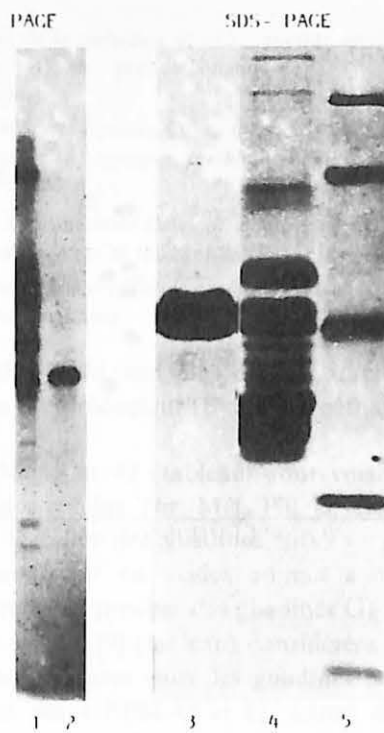


FIG. 3 : GIPM 42

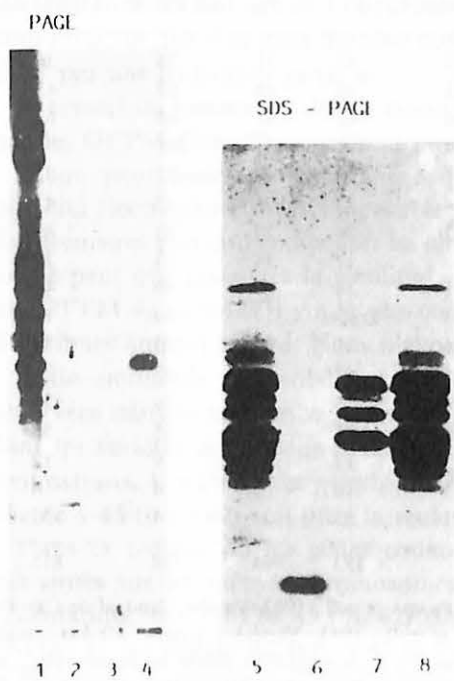
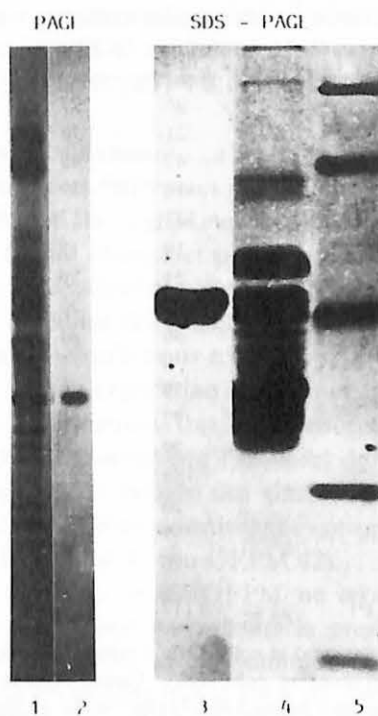


FIG. 4 : γ -gliadine 42



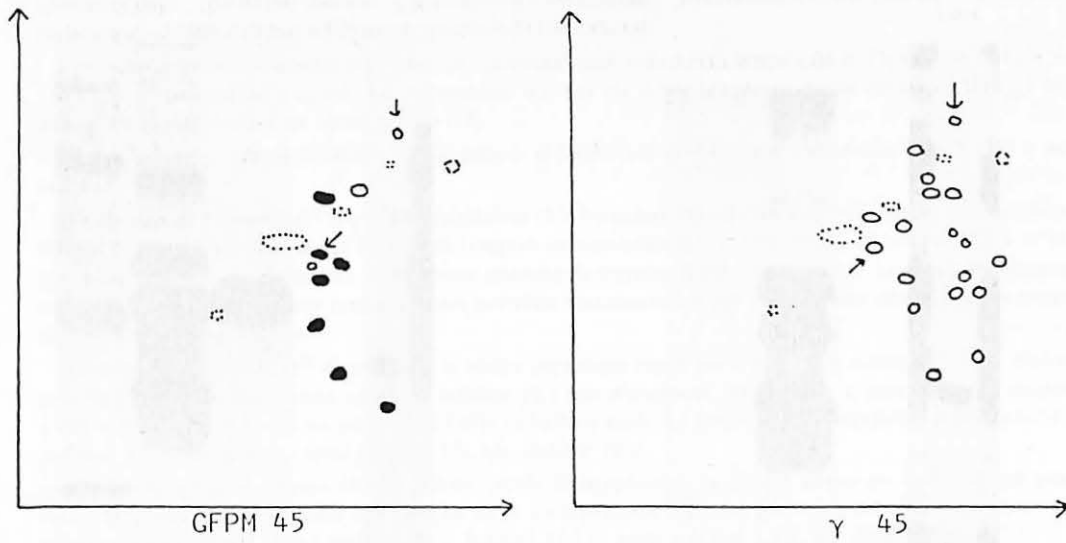


Fig. 5

TABLEAU

	Gliadines Agathé	Gliadines Calvinor	GFPM (^a)	GFPM(^b) constituant 1	γ-45 (^c)	γ-42 (^d)	GFPM 45	GFPM 42
Asx (^e)	26	27	32	15	37	31	35	36
Thr	21	18	75	61	24	25	67	45
Ser	42	43	82	64	42	41	68	65
Glx (^f)	416	439	213	234	457	433	398	395
Pro	132	117	63	97	120	140	82	82
Gly	19	17	81	64	23	26	37	41
Ala	21	20	74	62	26	27	59	49
Cys/2	25	23	85	-	17	14	23	27
Val	36	34	57	35	34	29	40	40
Met	8	7	34	33	Traces	7	34	14
Ile	39	39	51	36	31	34	33	35
Leu	72	69	49	35	57	60	37	38
Tyr	29	29	25	16	5	6	39	30
Phe	58	61	19	20	75	78	25	50
His	20	21	8	5	17	20	9	12
Lys	7	6	11	3	10	9	4	6
Arg	28	27	41	21	25	21	4	32
HΦ _{ave} (^g)	1117	976			893	964	788	815

(^a) SALCEDO et coll., 1979. Variété Candeal de Castilla. (^b) PRADA et coll., 1982. Variété Candeal de Castilla. (^c) COTTENET et coll., 1983. Variété Agathé. (^d) COTTENET et coll., 1983. Variété Calvinor. (^e) Asx : acide aspartique + asparagine. (^f) Glx = acide glutamique + glutamine. (^g) Hydrophobicité totale moyenne HΦ_{ave} en calories/résidu selon BIGELOW [15].

Planche II

Fig. 5. — Cartes tryptiques bidimensionnelles de la GFPM 45 et de la γ -gliadine 45 : \circ , peptide spécifique de GFPM 45 ou γ -45; \rightarrow , peptide commun de GFPM 45 et γ -45; \bullet , peptide commun de GFPM 45 et GFPM 42; \curvearrowright , trypsine; \curvearrowleft , marqueur de migration (fushine acide).

Fig. 5. — Bidimensional tryptic peptide mapping of LMWG 45 and γ -gliadin 45: \circ , specific peptide of LMWG 45 or γ -45; \rightarrow , common peptide of LMWG 45 and γ -45; \bullet , common peptide of LMWG 45 and LMWG 42; \curvearrowright , trypsin; \curvearrowleft , migration marker (acid fushine).

Tableau. — Composition en acides aminés des gliadines totales d'Agathé et de Calvinor, de deux gliadines de faible poids moléculaire (^a)(^b), des γ -gliadines 45 et 42 et des GFPM 45 et 42 (nombre de résidus pour 1 000).

Table. — Amino acid composition of whole-gliadin from Agathe and Calvinor of two-low molecular gliadins (^a)(^b), of γ -gliadins 45 and 42 and LMWG 45 and 42 (residues/1,000 total residues).

classiques et leur poids moléculaire est estimé à $21\,000 \pm 500$, soit plus de 50% inférieur à celui des γ -45 et γ -42. Dans ce système, l'utilisation d'un réducteur (β -mercaptoéthanol) avant électrophorèse ne modifie pas les diagrammes.

2. Les compositions en acides aminés des GFPM 45 et 42 (tableau) sont voisines, malgré quelques différences, notamment au niveau des résidus Thr, Met, Phe et Arg, et très éloignées de celles des γ -gliadines 45 et 42 et de celles des gliadines totales : plus faible teneur en Glx, Pro, Leu et His; plus forte teneur en acides aminés soufrés (1/2 Cys + Met), Thr, Gly et Ala. Elles sont par contre assez proches des gliadines GFPM isolées du Blé tendre par Salcedo et coll. [8], Prada et coll. [9] (tableau) considérées par ces auteurs comme des fractions plus ou moins intermédiaires entre les gliadines et les albumines. Les hydrophobicités théoriques (tableau) des GFPM 45 et 42, toutes deux similaires, sont nettement inférieures à celles des γ -gliadines 45 et 42 et des gliadines totales.

3. La comparaison des cartes tryptiques (fig. 5) révèle de grandes différences structurales entre les GFPM et les γ -gliadines (1 ou 2 peptides sur 10 situés au même niveau) et une très forte homologie de la structure primaire des GFPM 45 et GFPM 42 (7 peptides communs sur 10). Ces deux derniers constituants ne sont donc pas issus des γ -gliadines 45 et 42 par une hydrolyse partielle.

Il ressort de l'ensemble de ces résultats, et plus particulièrement des cartes tryptiques que les GFPM 45 et 42 constituent une famille de protéines différentes des γ -45 et γ -42.

Si on peut aisément comprendre que les GFPM et les γ -gliadines possèdent une mobilité électrophorétique comparable (PAGE), les faibles charges et poids moléculaires des premières pouvant compenser les charges et les poids moléculaires élevés des secondes, on ne peut que constater la similitude parfaite des mobilités des GFPM 45 et γ -45, ou des GFPM 42 et γ -42. Il y a là une coïncidence étonnante qu'il nous semble insuffisante d'attribuer au seul hasard. Nous n'avons cependant aucune explication à proposer.

Cette similitude de mobilité pourrait expliquer les quelques très rares exceptions observées dans la relation mise en évidence [18] entre la présence (ou l'absence) de γ -45 dans les variétés de Blé dur et les viscoélasticités élevées (ou faibles) des glutens qui en sont extraits. Il n'est pas impossible en effet que la détection d'un constituant électromorphe de γ -45 (ou γ -42) soit dû à la seule présence de la GFPM 45 (ou GFPM 42).

Dans la mesure où les gènes codant pour les γ -gliadines et les GFPM ne seraient pas situés sur les mêmes chromosomes [10], on s'explique mal par ailleurs la présence systématique des GFPM 45 (ou 42) dans les variétés que nous avons examinées (SDS-PAGE) et qui étaient du type γ -45 et γ -42. Nous nous proposons par la suite de préciser la proximité protéique des gènes codant pour les GFPM 45 et 42.

CONCLUSION. — Ce travail a permis la purification de deux nouvelles gliadines du Blé dur rattachées aux GFPM en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Leurs mobilités électrophorétiques à pH acide sont strictement identiques à celles des γ -gliadines 45 et 42, sans que l'on puisse fournir d'explication. Il existe donc au sein de l'électromorphe 45 (ou 42) deux constituants protéiques qui paraissent génétiquement liés.

Quelles que soient les réponses aux questions qui restent posées à l'issue de ce travail, la possibilité de sélectionner des Blés durs, dont le gluten possède une viscoélasticité élevée, par « triage » sur la seule gliadine 45 ne semble pas devoir être remise en cause.

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

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] D. D. KASARDA, J. E. BERNARDIN et C. C. NIMMO, *Adv. Cereal. Sc. Technol.*, 1, 1976, p. 158-236.
- [2] L. CHARBONNIER et J. MOSSE, *J. Sc. Food Agric.*, 31, 1980, p. 54-61.
- [3] B. A. LARKINS, *Biochemistry of Plants*, 11, (6), 1981, p. 449-489.
- [4] L. M. HOLT, R. ASTIN et P. I. PAYNE, *Theor. Appl. Genet.*, 1981, p. 237-243.
- [5] D. D. KASARDA, D. LAFIANDRA, R. MORRIS et P. R. SHEWRY, *Kulturpflanze*, 9, 1984 (sous presse).
- [6] D. D. KASARDA, J. C. AUTRAN, E. J. L. LEW, C. C. NIMMO et P. R. SHEWRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 747, 1983, p. 138-150.
- [7] J. A. D. EWART, *J. Sc. Food Agric.*, 26, 1975, p. 1021-1025.
- [8] G. SALCEDO, J. PRADA et C. ARAGONCILLO, *Phytochemistry*, 18, 1979, p. 725-727.
- [9] J. PRADA, R. SANCHEZ-MONGE, G. SALCEDO et C. ARAGONCILLO, *Plant Sc. Lett.*, 25, 1982, p. 282-289.
- [10] G. SALCEDO, J. PRADA, R. SANCHEZ-MONGE et C. ARAGONCILLO, *Theor. Appl. Genet.*, 56, 1980, p. 65-69.
- [11] M. COTTENET, J. C. AUTRAN et P. JOUDRIER, *Comptes rendus*, 297, série III, 1983, p. 149-154.
- [12] J. C. AUTRAN, E. J. L. LEW, C. C. NIMMO et D. D. KASARDA, *Nature*, 282, 1979, p. 527-529.
- [13] W. BUSHUK et R. R. ZILLMAN, *Can. J. Plant Sc.*, 58, 1978, p. 505-515.
- [14] A. MONTEBAULT, J. C. AUTRAN, P. JOUDRIER et M. MOLL, *Comptes rendus*, 295, série III, 1982, p. 205-208.
- [15] C. C. BIGELOW, *J. Theor. Biol.*, 16, (2), 1967, p. 187-211.
- [16] J. A. D. EWART, *J. Sc. Food Agric.*, 17, 1966, p. 30-33.
- [17] S. UDENFRIEND, S. STEIN, P. BOHEN, W. DAIRMAN, W. LEIMGRUDER et M. WEIGLE, *Science*, 178, 1972, p. 871-872.
- [18] R. DAMIDAUX, J. C. AUTRAN, P. GRIGNAC et P. FEILLET, *Comptes rendus*, 287, série D, 1978, p. 701-704.

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