

HYDROPHOBICITÉ DES γ -GLIADINES 45 ET 42 DU BLÉ DUR (*TRITICUM DURUM* DESF.)

HYDROPHOBICITY OF γ -GLIADINS 45 AND 42
OF *TRITICUM DURUM* WHEAT (*TRITICUM DURUM* DESF.)

M. COTTENET, K. KOBREHEL, J.-C. AUTRAN (1)

RÉSUMÉ

L'aspect fonctionnel de la relation entre la présence de la γ -gliadine 45 (ou de la γ -gliadine 42) et les propriétés viscoélastiques du gluten du blé dur est abordé par l'étude de l'hydrophobicité de ces deux composants.

Les constituants 45 et 42 ont une composition en acides aminés similaire, exception faite de la proline. L'hydrophobicité théorique (NPS, P et $H\phi_{ave}$) montre que les γ -gliadines 45 et 42 sont des protéines globulaires ayant d'un point de vue structural une "capacité hydrophobe" différente. Comparativement à la γ -gliadine 42, la γ -gliadine 45 aurait des zones hydrophobes à la fois moins nombreuses et moins accessibles ; sa "capacité hydrophobe" serait donc inférieure.

L'approche originale de l'hydrophobicité de surface, avec la solubilisation des gliadines par le myristate de sodium nous amène à proposer un schéma explicatif au comportement discordant des constituants 45 et 42 en chromatographie d'interactions hydrophobes et en chromatographie liquide à haute performance. La γ -gliadine 45 qui serait moins accessible au savon que la γ -gliadine 42 aurait des interactions hydrophobes plus faibles avec les autres constituants que celles en présence de savon.

Le rôle fonctionnel des γ -gliadines 45 et 42 est enfin envisagé du point de vue de leur accessibilité et de leur agrégation.

Mots clés : *Triticum durum*, γ -gliadines 45 et 42, hydrophobicité, agrégation, accessibilité.

(1) Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Technologie des Céréales du Centre de Recherches Agronomiques, 9 place Viala, 34060 Montpellier cedex (France).

SUMMARY

The functional role of γ -gliadins 45 and 42 in durum wheat gluten viscoelasticity is examined by studying the hydrophobicity of these proteins.

Components 45 and 42 have a similar amino-acid composition, with the exception of proline. Theoretical hydrophobicity (NPS, P and $H\Phi_{ave}$) indicates that γ -gliadins 45 and 42 are globular proteins which have, as a quantitative structural parameter, a different "hydrophobic capacity". As compared with γ -gliadin 42, γ -gliadin 45 seems to have fewer and less accessible hydrophobic regions; consequently, its "hydrophobic capacity" seems to be inferior.

Surface hydrophobicity is measured by the solubilization of gliadins with sodium-myristate. One hypothesis is proposed and discussed to elucidate discrepant behaviours of γ -gliadins 45 and 42 through hydrophobic interaction chromatography and reverse-phase high performance liquid chromatography, γ -gliadin 45 seems to be less accessible to soap than γ -gliadin 42. γ -gliadin 45 seems also to have interactions with other components weaker than those which appear in the presence of soap.

The functional role of γ -gliadins 45 and 42 is finally discussed with regard to their accessibility and aggregation.

Key words : *Triticum durum*, γ -gliadins 45 and 42, hydrophobicity, aggregation, accessibility.

INTRODUCTION

La qualité culinaire des blés durs est associée à la viscoélasticité du gluten qui dépend de la structure protéique et de la force des interactions entre les protéines et entre les protéines, les lipides et l'eau (KASARDA *et al.*, 1976 ; POPINEAU *et al.*, 1980).

L'importance des liaisons covalentes, ponts disulfures (HUEBNER *et al.*, 1977 ; LASZTITY, 1980), et des liaisons de faible énergie, liaisons hydrogènes (LASZTITY, 1980), dans la structure du gluten a déjà fait l'objet de nombreux travaux. Depuis quelques années cependant, l'importance des liaisons hydrophobes intervenant dans la conformation des protéines et leur capacité d'association a été prise en compte (KASARDA *et al.*, 1976 ; KHAN et BUSHUK, 1979 ; HAMAUZU *et al.*, 1979). Les travaux de PONTE *et al.* (1975) sur la modification des propriétés viscoélastiques du gluten par l'addition d'hydrocarbures, la mise en évidence par LASZTITY (1975) d'un fort pourcentage en acides aminés apolaires relié aux propriétés rhéologiques et la solubilisation des composants dans des détergents par KOBREHEL et BUSHUK (1977), WASIK *et al.* (1979), vont dans le sens d'une structure reposant sur des interactions de type hydrophobe. GREENE et KASARDA (1971) ont par ailleurs prouvé, par des méthodes fluorométriques, l'existence de zones apolaires à la surface des α -gliadines. Depuis, des études par chromatographie d'interactions hydrophobes (POPINEAU et GODON, 1978 et 1982 ; CHUNG et POMERANZ, 1978 ; CALDWELL, 1979 ; GODON et POPINEAU, 1981) sont venues confirmer l'importance que jouent les interactions hydrophobes dans la structure du gluten.

Dans le cas du blé dur (*Triticum durum* Desf.) DAMIDAUX *et al.* (1978) mettent en évidence une relation entre la présence de la γ -gliadine 45 (nomenclature BUSHUK et ZILLMAN, 1978) et la recouvrance absolue du gluten, elle-même liée à une qualité culinaire élevée des blés durs (DAMIDAUX et FEILLET, 1978) ; la γ -gliadine 42 étant, quant à elle, liée à une qualité culinaire faible. Ces travaux ont été confirmés par KOSMOLAK *et al.* (1980), par WRIGLEY (1980) et par DU CROS *et al.* (1982).

DAMIDAUX (1979) suggère que cette relation doit être d'ordre génétique et/ou de type fonctionnel. Des travaux ultérieurs (DAMIDAUX *et al.*, 1980 ; JOPPA *et al.*, 1983) ont montré que les constituants 45 et 42 étaient codés par deux allèles co-dominants d'un même gène localisés sur le chromosome 1B. Le rôle fonctionnel des γ -gliadines 45 et 42 n'est cependant pas écarté, l'importance des interactions hydrophobes (GODON et POPINEAU, 1981), la localisation et l'accessibilité des sites hydrophobes (COTTENET *et al.*, 1983) chez les deux protéines devant être pris en compte. GODON et POPINEAU (1981) montrent ainsi que la γ -gliadine 45 possède une hydrophobicité de surface plus élevée que la γ -gliadine 42. COTTENET *et al.* (1983) indiquent que la γ -gliadine 42, de même poids moléculaire et d'une composition en acides aminés similaire à la γ -gliadine 45 aurait une hydrophobicité légèrement supérieure (375 résidus hydrophobes contre 343 pour 1 000 résidus). BURNOUF et BIETZ (1984) suggèrent, après analyse par chromatographie liquide à haute performance, que l'hydrophobicité de surface chez la γ -gliadine 42 est supérieure à celle de la γ -gliadine 45.

L'objectif que nous proposons dans cette étude est de comparer au moyen de différents critères, les hydrophobicités de ces γ -gliadines 45 et 42 et des gliadines en général (gliadines totales, groupe γ -gliadines et γ -gliadines 51). Dans ce but, trois moyens d'étude sur l'hydrophobicité des protéines seront utilisés :

- le premier, basé sur la composition en acides aminés donne une idée globale de l'hydrophobicité totale des protéines, une hydrophobicité calculée, théorique en quelque sorte : indice de fréquence de chaînes apolaires NPS de WAUGH (1954) ; polarité P de FISHER (1964) ; hydrophobicité totale moyenne $H\Phi_{ave}$ de BIGELOW (1967) ;

- le second fait appel à la chromatographie d'interactions hydrophobes, et renseigne sur l'hydrophobicité de surface des protéines ;

- le troisième, solubilisation des protéines par des détergents, est susceptible de renseigner sur les capacités d'associations hydrophobes des molécules.

Sur la base des résultats obtenus, la possibilité du rôle fonctionnel des γ -gliadines 45 et 42 est discutée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Deux variétés de blé dur inscrites au Catalogue Français ont été choisies : Agathé, de bonne qualité culinaire intrinsèque, possède la γ -gliadine 45 et Calvinor, de qualité culinaire intrinsèque médiocre, possède la γ -gliadine 42.

1 Extraction de la gliadine totale

Les gliadines sont extraites selon la technique de CHARBONNIER (1970), modifiée par AUTRAN *et al.* (1979).

2 Isolement et purification des constituants gliadines

Les différents constituants γ -gliadines ont été purifiés et isolés par chromatographie d'échanges d'ions et chromatofocalisation dans les conditions décrites par COTTENET *et al.* (1983).

3 Composition en acides aminés*

Elle a été déterminée avec un auto-analyseur "Beckman" sur des échantillons ayant subi 24 heures d'hydrolyse (HCl 6N, 110°C, sous atmosphère d'azote). Le tryptophane n'a pas été dosé.

4 Hydrophobicité théorique calculée à partir de la composition en acides aminés

Trois paramètres peuvent être calculés à partir de la composition en acides aminés. Les deux premiers, l'indice de fréquence de chaînes apolaires NPS de WAUGH (1954) et l'hydrophobicité totale moyenne $H\Phi_{ave}$ de BIGELOW (1967) sont considérés comme des paramètres de non-polarité, le troisième, la polarité P de FISHER (1964), comme un paramètre de polarité.

$$NPS = \frac{Val + Leu + Ile + Pro + Phe + Tyr + Trp}{\text{Nombre total de résidus}}$$

$$H\Phi_{ave} = \frac{\sum n_i H\Phi_i}{\sum n_i} = \frac{\text{Hydrophobicité totale des acides aminés}}{\text{Nombre total de résidu}}$$

en calories par résidu avec :

n_i : nombre de résidus

$H\Phi_i$: énergie libre de transfert du résidu i de l'eau dans l'éthanol (TANFORD, 1962)

$$P = \frac{\text{Volume des résidus polaires}}{\text{Volume des résidus apolaires}}$$

avec Arg, Asp, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Tyr considérés comme résidus polaires (NEMETHY et SCHERAGA, 1962).

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

5 Chromatographie d'interactions hydrophobes

Les protéines sont fractionnées en fonction de leur hydrophobicité de surface (YON, 1978 ; OCHOA, 1978).

Deux supports chromatographiques d'interactions hydrophobes ont été utilisés :

- le phényl-sépharose CL.4B, support recommandé pour des échantillons à hydrophobicité inconnue ;

- l'octyl-sépharose CL.4B, support plus hydrophobe recommandé pour la séparation de protéines à faible hydrophobicité.

Le protocole expérimental mis au point sur des gliadines de blé tendre (POPINEAU et GODON, 1978) puis repris sur des gliadines de blé dur (GODON et POPINEAU, 1981) a été utilisé. 100 mg de gliadines totales sont mis en solution dans du tampon lactate d'aluminium 0,028 M, acide lactique 0,018 N, pH 3,6 et déposés dans une colonne (diamètre 1 cm, hauteur 18 cm) équilibrée dans ce même tampon. L'élution (débit 20 ml/h), successivement par du tampon lactate d'aluminium et un gradient linéaire d'un litre d'éthanol (de 0 à 60 %) dans l'ammoniaque 0,02 N permet le fractionnement des protéines ; la colonne est finalement lavée par un mélange éthanol 60 %, ammoniaque 0,02 N, urée 3 M. Les protéines sont détectées à 280 nm. Après regroupement des fractions, celles-ci sont dialysées 72 heures au moins contre de l'eau désionisée, puis lyophilisées.

6 Electrophorèse

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (tampon lactate d'aluminium pH 3,1) selon la technique de BUSHUK et ZILLMAN (1978) a été utilisée.

7 Solubilisation des gliadines par les savons

La solubilisation des protéines dans l'eau a été réalisée en présence d'un savon préparé au laboratoire, le myristate de sodium (tétradécanoate de sodium), dans des conditions décrites par KOBREHEL (1980). 1 g de semoule et des doses croissantes de myristate de sodium (0 à 60 mg) sont mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée. Après une nuit d'agitation (agitateur rotatif, environ 30 t/min) à 15°C et une centrifugation (1 500 t/min, 30 min, 4°C), on prélève le surnageant.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide pH 3,1 est réalisée sur le surnageant lyophilisé.

Tableau 1
Composition en acides aminés des gliadines totales,
du groupe γ -gliadines et des γ -gliadines 42, 45 et 51
des variétés Agathé et Calvinor (nombre de résidus pour 1 000)

Table 1
Amino acid composition of whole-gliadin,
 γ -gliadin fraction and γ -gliadins 42, 45 and 51
of Agathé and Calvinor (residues/1 000 total residues)

	Gliadines totales		Groupe γ -gliadines	
	Agathé	Calvinor	Agathé	Calvinor
Asp*	26	27	24	23
Thr	21	18	19	18
Ser	42	43	35	35
Glu**	416	439	439	467
Pro	132	117	155	137
Gly	19	17	15	15
Ala	21	20	20	20
Cys/2	25	23	26	24
Val	36	34	33	32
Met	8	7	10	9
Ile	39	39	40	39
Leu	72	69	64	60
Tyr	29	29	14	14
Phe	58	61	64	68
His	20	21	15	15
Lys	7	6	5	5
Arg	28	27	20	17

	γ -gliadine 51		γ -45	γ -42
	Agathé	Calvinor		
Asp*	40	30	37	31
Thr	24	20	24	25
Ser	50	40	42	41
Glu**	410	416	457	433
Pro	141	156	120	140
Gly	28	20	23	26
Ala	25	20	26	27
Cys/2	10	20	17	14
Val	37	34	34	29
Met	12	15	Traces	7
Ile	34	43	31	34
Leu	47	61	57	60
Tyr	14	7	5	6
Phe	75	72	75	78
His	19	14	17	21
Lys	13	9	10	9
Arg	24	24	25	21

* Total surestimé par le fait que Asp = acide aspartique + asparagine.

** Total surestimé par le fait que Glu = acide glutamique + glutamine.

RÉSULTATS

1 Hydrophobicité totale des constituants gliadines

1.1 Composition en acides aminés

Il ressort des résultats (tableau 1) que les compositions en acides aminés des gliadines totales et des γ -gliadines extraites d'Agathé et de Calvinor sont presque identiques. Dans les deux cas, les résidus proline sont en nombre légèrement supérieur chez Agathé, avec inversement un nombre plus faible d'acide glutamique + glutamine. Notons également, pour le groupe γ -gliadines (à la fois chez Agathé et Calvinor), par rapport à la gliadine totale, l'existence d'un nombre supérieur de proline et d'acide glutamique + glutamine, compensé par un nombre plus faible de tyrosine et d'acides aminés basiques.

Dans les compositions en acides aminés des constituants γ -gliadines 51 d'Agathé et de Calvinor, on note également quelques différences : résidus acide aspartique + asparagine, sérine et tyrosine en nombre supérieur chez Agathé, résidus proline, cystéine, isoleucine et leucine en nombre supérieur chez Calvinor.

La composition en acides aminés des γ -gliadines 45 et 42 est similaire. Ces deux protéines possèdent les caractéristiques classiques des gliadines (grande richesse en acide glutamique + glutamine et proline). Comme légères différences, on peut relever l'acide glutamique + glutamine en nombre supérieur chez la γ -gliadine 45, la proline en nombre supérieur chez la γ -gliadine 42. Si l'on compare les compositions en acides aminés de ces deux protéines à celles des γ -gliadines du blé tendre purifiées par HUEBNER *et al.* (1967), HUEBNER et ROTHFUS (1968) et BIETZ *et al.* (1977), quelques différences peuvent être notées : résidus acide aspartique + asparagine, acide glutamique + glutamine et phénylalanine en nombre supérieur, compensé par un nombre plus faible de proline et de leucine, chez les γ -gliadines 45 et 42.

1.2 Paramètres NPS, P et $H\Phi_{ave}$

Les résultats sont donnés dans le tableau 2.

a/ Indice de fréquence de chaînes apolaires NPS

Les indices de fréquence de chaînes apolaires NPS ne semblent pas différents entre gliadines totales, γ -gliadines et γ -gliadines 51 des variétés Agathé et Calvinor. Par rapport à la γ -gliadine 45, cet indice est légèrement supérieur chez la γ -gliadine 42 : 0,35 contre 0,32.

b/ Polarité

Les gliadines totales et le groupe γ -gliadines chez Calvinor ont respectivement une polarité P supérieure à celles des gliadines totales et du groupe γ -gliadines chez Agathé. A l'inverse, ce sont les γ -gliadines 45 et 51 d'Agathé qui ont respectivement une polarité supérieure à celles des γ -gliadines 42 et 52 de Calvinor, la γ -gliadine 45 étant le constituant à la plus forte polarité.

Tableau 2
NPS, P et $H\Phi_{ave}$, paramètres d'hydrophobicité
des différents constituants gliadines chez Agathé et Calvinor

Table 2
NPS, P and $H\Phi_{ave}$, hydrophobicity relationships
of gliadins components Agathé and Calvinor

	NPS	P	$H\Phi_{ave}$
Gliadines totales			
Agathé	0,37	1,42	1117,3
Calvinor	0,37	1,54	975,6
γ-gliadines			
Agathé	0,37	1,31	1027,4
Calvinor	0,35	1,43	971,7
γ-gliadine 51			
Agathé	0,35	1,43	971,6
Calvinor	0,37	1,23	1042,4
γ -gliadine 45	0,32	1,57	892,7
γ -gliadine 42	0,35	1,38	963,8

c/ Hydrophobicité totale moyenne $H\Phi_{ave}$

Les gliadines totales et le groupe γ -gliadines chez Agathé possèdent respectivement une hydrophobicité totale moyenne supérieure à celles des gliadines totales et du groupe γ -gliadines de Calvinor. A l'inverse, ce sont les γ -gliadines 42 et 45 de Calvinor qui possèdent respectivement une hydrophobicité totale moyenne supérieure à celles des γ -gliadines 45 et 51 d'Agathé, la γ -gliadine 45 étant le constituant à la plus faible hydrophobicité.

Les valeurs d'hydrophobicité totale des γ -gliadines 45 et 42 qui sont les plus basses de toutes les gliadines purifiées chez le blé tendre (valeurs relevées dans la littérature ou calculées d'après la composition en acides aminés des gliadines purifiées, CHARBONNIER *et al.*, 1980) correspondent à des valeurs en dessous de la moyenne ; BIGELOW (1967) obtient en effet plus de 50 % des 150 protéines qu'il a étudiées dans une zone d'hydrophobicité totale moyenne comprise entre 1 000 et 1 200 calories/résidu.

d/ Comparaison NPS, P, $H\Phi_{ave}$

La figure 1 (comparaison déjà faite par BIGELOW sur plus de 50 protéines en 1967) montre qu'il existe une relation linéaire entre l'indice de fréquence des chaînes apolaires NPS et l'hydrophobicité totale moyenne $H\Phi_{ave}$. Ainsi, les paramètres NPS et $H\Phi_{ave}$ en relation avec la composition en acides aminés hydrophobes* mesurent certainement les mêmes

* Acides aminés hydrophobes ou résidus apolaires selon BIGELOW (1967) = proline, glycine, alanine, cystéine, valine, méthionine, isoleucine, leucine et phénylalanine.

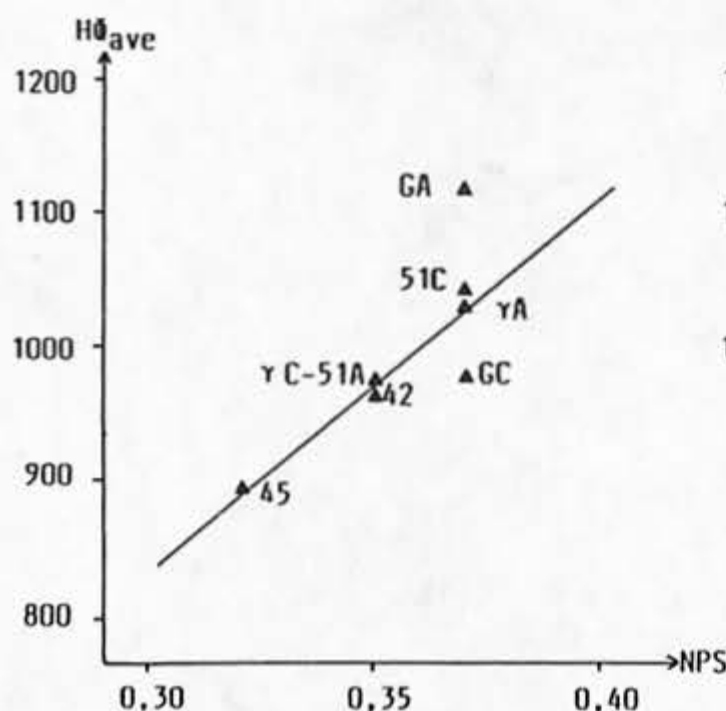


Figure 1

Hydrophobicité totale moyenne $H\phi_{ave}$ (calories/résidu) en fonction de l'indice de fréquence des chaînes NPS chez les constituants gliadines

The average hydrophobicity $H\phi_{ave}$ (calories/residue) plotted against non polar side chain content NPS - gliadins components

GA : Gliadines totales Agathé
GC : Gliadines totales Calvinor
 γ A : γ -gliadines Agathé
 γ C : γ -gliadines Calvinor

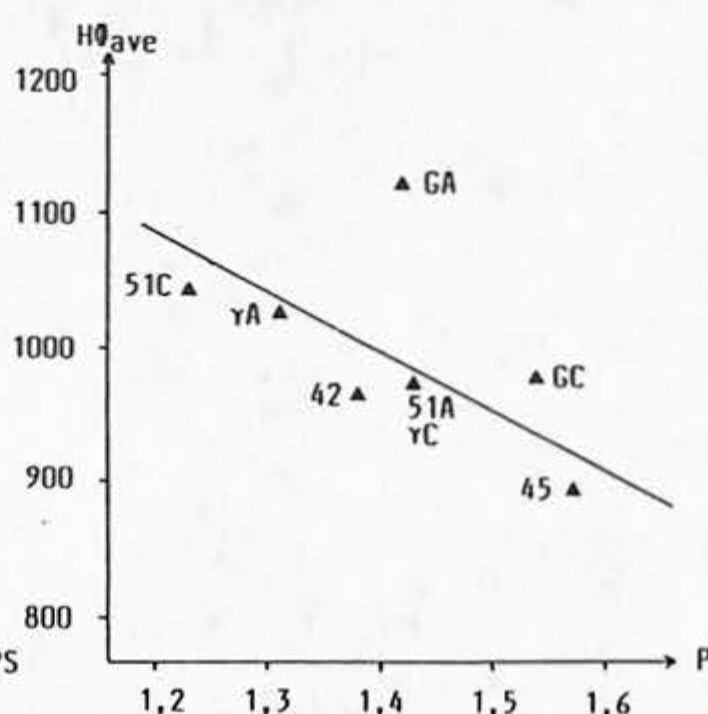


Figure 2

Hydrophobicité totale moyenne $H\phi_{ave}$ (calories/résidu) en fonction de la polarité P chez les constituants gliadines

The average hydrophobicity $H\phi_{ave}$ (calories/residue) plotted against polarite index P - gliadins components

51 A : γ -gliadine 51 Agathé
51 C : γ -gliadine 51 Calvinor
45 : γ -gliadine 45
42 : γ -gliadine 42

caractéristiques. D'une manière similaire, la figure 2 montre qu'il existe une relation linéaire inverse entre l'indice de polarité P et l'hydrophobicité totale moyenne $H\phi_{ave}$.

D'après les figures 1 et 2, nous pouvons constater qu'en ce qui concerne l'hydrophobicité totale :

- les gliadines totales d'Agathé ont des valeurs plus élevées que celles des gliadines totales de Calvinor ;
- le groupe γ -gliadines et la γ -gliadine 42 de Calvinor sont similaires à la γ -gliadine 51 d'Agathé ;
- le groupe γ -gliadines d'Agathé est similaire à la γ -gliadine 51 de Calvinor ;
- la γ -gliadine 45 possède une hydrophobicité totale plus faible que la γ -gliadine 42.

2 Chromatographie d'interactions hydrophobes

2.1 Fractionnement des gliadines sur phényl-sépharose CL.4B

Les gliadines d'Agathé (figure 3) et de Calvinor (figure 4) sont séparées en une dizaine de fractions.

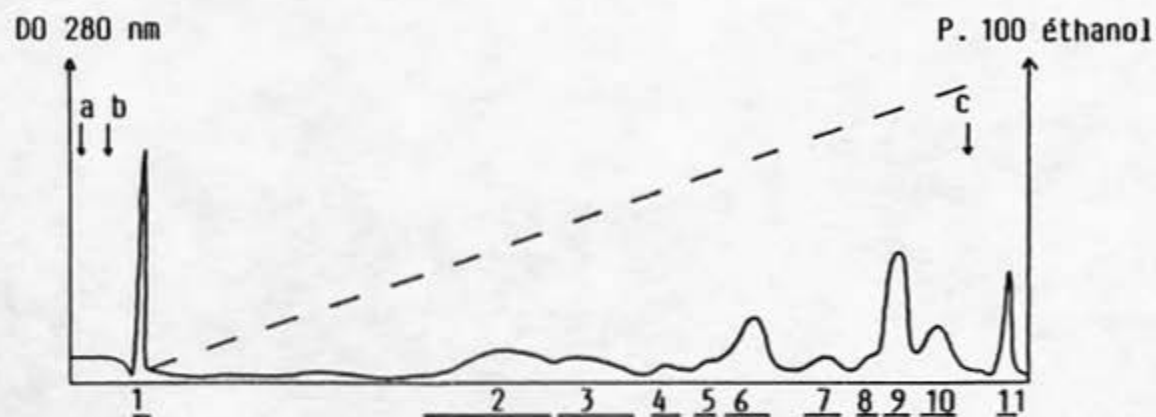


Figure 5
 Diagramme d'élution des gliadines totales d'Agathé
 sur octyl-sépharose
 Elution profile on octyl-sepharose
 of whole-gliadin of Agathé

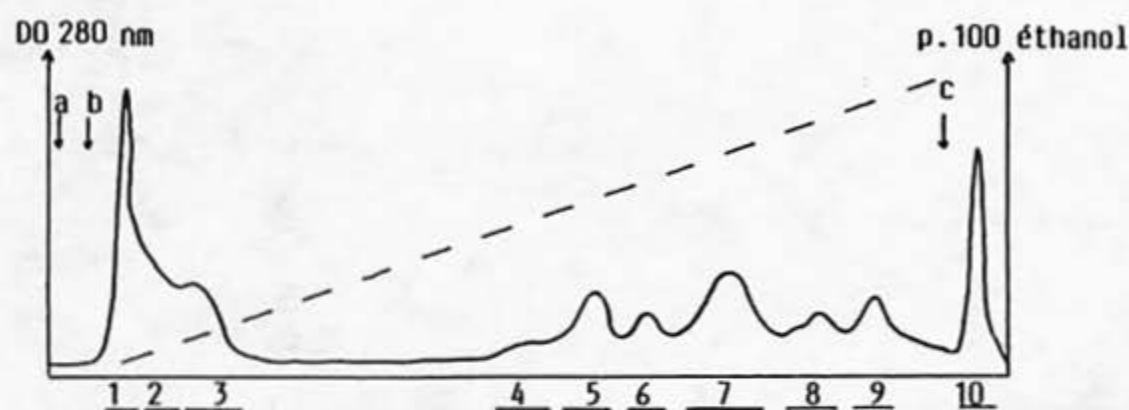


Figure 3
 Diagramme d'élution des gliadines totales d'Aanthé
 sur phényl-sépharose
 Elution profile on phenyl-sepharose
 of whole-gliadin of Aanthé

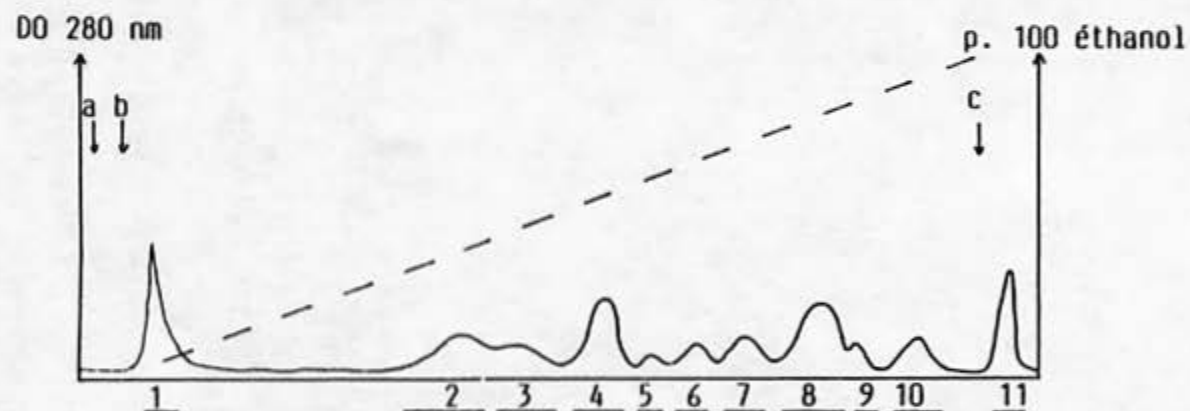


Figure 6
 Diagramme d'élution des gliadines totales de Calvinor
 sur octyl-sépharose
 Elution profile on octyl-sepharose
 of whole-gliadin of Calvinor

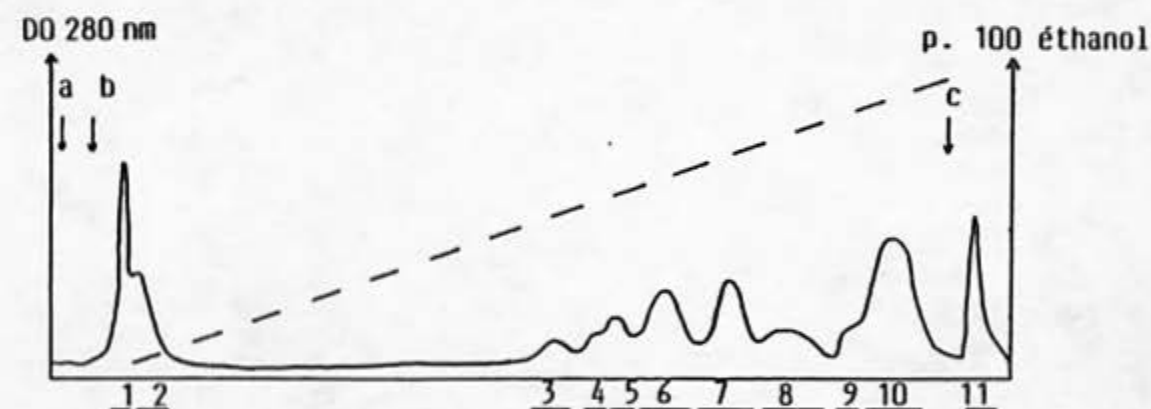


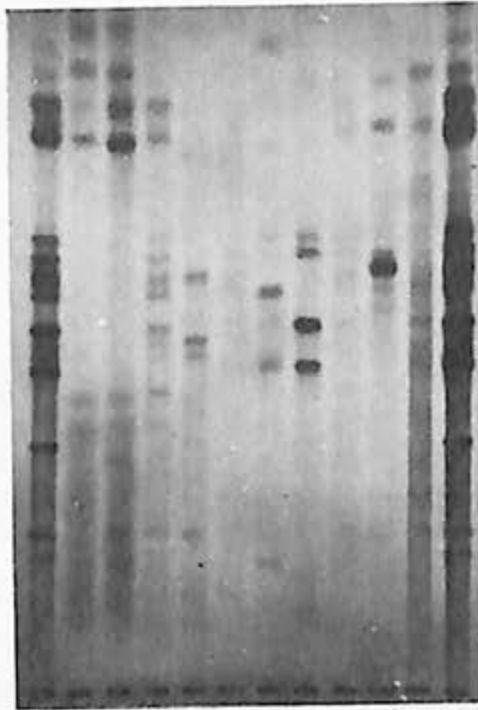
Figure 4
 Diagramme d'élution des gliadines totales de Calvinor
 sur phényl-sépharose
 Elution profile on phenyl-sepharose
 of whole-gliadin of calvinor

- (a) Lactate d'aluminium 0,028 M pH 3,6
- (b) Gradient linéaire d'éthanol (0 à 60 %) dans l'ammoniaque 0,02 N (indiqué par la ligne pointillée)
- (c) Rinçage de la colonne par éthanol 60 %, ammoniaque 0,02 N, urée 3 M

- (a) Aluminium lactate buffer 0,028 M pH 3,6
- (b) Linear gradient of ethanol (0 to 60 %) in 0,02 N ammonia (slope indicated by dashed line)
- (c) Washing of column with ethanol 60 %, ammonia 0,02 N, urea 3 M

Figure 7
Diagramme électrophorétique
des fractions gliadines d'Agathé
sur phényl-sépharose

Electrophoresis pattern of gliadin
fractions of Agathé on phényl-sépharose



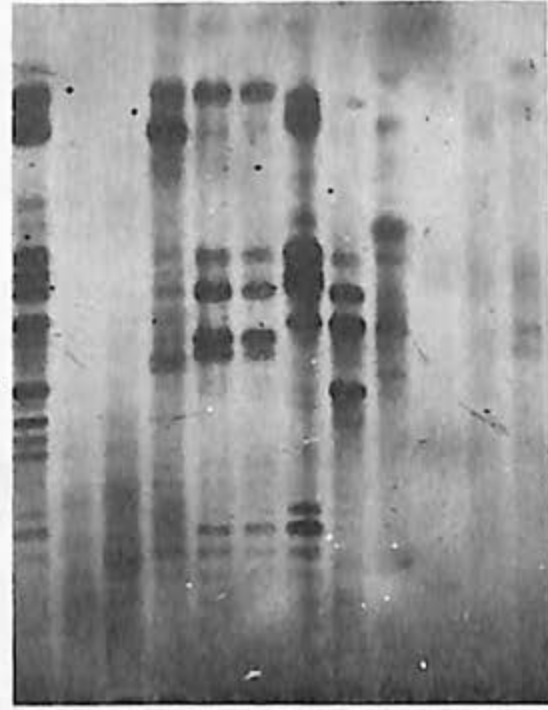
A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 A

A : Témoin gliadines totales Agathé
A : Whole gliadin Agathé

1 à 9 : Fractions éluées pendant le gradient d'éthanol
1 to 9 : Fractions eluted with gradient of ethanol
10 : Fraction éluée pendant le rinçage de la colonne
10 : Fraction eluted with washing of column

Figure 8
Diagramme électrophorétique
des fractions gliadines de Calvinor
sur phényl-sépharose

Electrophoresis pattern of gliadin
fractions of Calvinor on phényl-sépharose



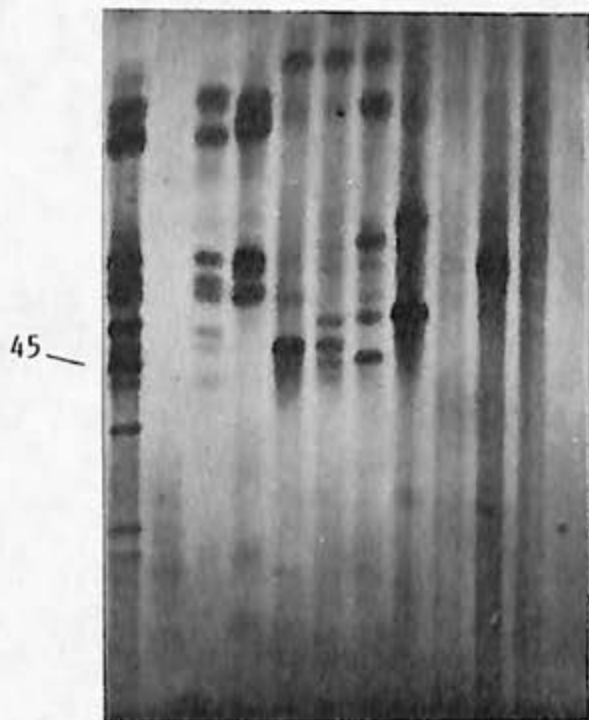
C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

C : Témoin gliadines totales Calvinor
C : Whole gliadin Calvinor

1 à 10 : Fractions éluées pendant le gradient d'éthanol
1 to 10 : Fractions eluted with gradient of ethanol
11 : Fraction éluée pendant le rinçage de la colonne
11 : Fraction eluted with washing of column

Figure 9
Diagramme électrophorétique
des fractions gliadines d'Agathé
sur octyl-sépharose

Electrophoresis pattern of gliadin
fractions of Agathé on octyl-sépharose



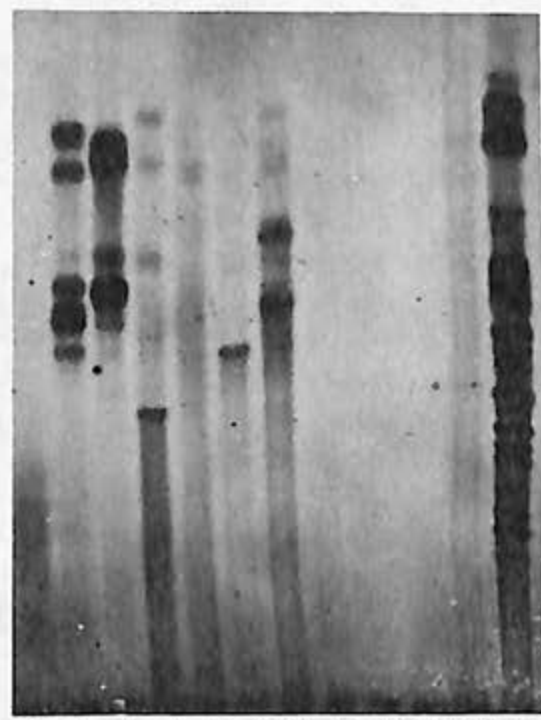
A 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

A : Témoin gliadines totales Agathé
A : Whole gliadin Agathé

1 à 10 : Fractions éluées pendant le gradient d'éthanol
1 to 10 : Fractions eluted with gradient of ethanol
11 : Fraction éluée pendant le rinçage de la colonne
11 : Fraction eluted with washing of column

Figure 10
Diagramme électrophorétique
des fractions gliadines de Calvinor
sur octyl-sépharose

Electrophoresis pattern of gliadin
fractions of Calvinor on octyl-sépharose



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 C

C : Témoin gliadines totales Calvinor
C : Whole gliadin Calvinor

Le diagramme d'élution des gliadines d'Agathé se caractérise par quatre pics principaux (5, 6, 7, 9), dont un plus important dans l'intervalle 42-46 % au cours du gradient d'éthanol. Pour Calvinor, trois pics principaux (6, 7, 10) se distinguent dont un plus important dans l'intervalle 43-47 % d'éthanol.

La comparaison des électrophorégrammes correspondant aux diagrammes d'élution sur phényl-sépharose (*figures 7 et 8*) nous amène à une constatation majeure : la γ -gliadine 45 est éluée principalement dans l'intervalle 42-46 % d'éthanol (pic 7) avec de légères traces dans l'intervalle 39-42 % d'éthanol (pic 6), la γ -gliadine 42 est éluée dans l'intervalle 43-47 % d'éthanol (pic 7). Ces deux constituants auraient donc des hydrophobicités de surface pratiquement identiques.

Notons le cas très intéressant de la γ -gliadine 51 qui, chez Agathé, est éluée en même temps que la γ -gliadine 45 et sous forme de traces dans le pic correspondant à l'intervalle 8-15 % d'éthanol. Chez Calvinor, la γ -gliadine 51 est éluée avec la γ -gliadine 42, mais aussi dans le pic précédent correspondant à l'intervalle 38-41 % d'éthanol.

Les diagrammes électrophorétiques montrent que pour une concentration en éthanol supérieure ou égale à 50 %, un nombre supérieur de constituants protéiques restent fixés chez Agathé sur le support chromatographique, principalement des β et α -gliadines.

2.1 Fractionnement des gliadines sur octyl-sépharose CL.4B

Les gliadines d'Agathé (*figure 5*) et de Calvinor (*figure 6*) sont séparées en une dizaine de fractions.

Trois pics principaux sont présents dans le diagramme d'élution des gliadines d'Agathé (6, 9, 10), deux le sont pour les gliadines de Calvinor (4, 8).

A l'inverse de ce que nous observons sur phényl-sépharose, la comparaison des électrophorégrammes correspondant aux diagrammes d'élution sur octyl-sépharose montre une différence de concentration en éthanol pour l'élution des γ -gliadines 45 et 42 (*figures 9 et 10*). La protéine 45 est éluée principalement dans l'intervalle 37-41 % d'éthanol (pic 6) avec des traces dans l'intervalle 36-37 % d'éthanol (pic 5), la protéine 42 l'est dans l'intervalle 30-34 % d'éthanol (pic 4). Ce résultat indiquerait donc une hydrophobicité de surface légèrement plus élevée pour le constituant 45.

Notons que le constituant 51 est élué, chez Agathé, principalement dans le pic 7, mais aussi dans le pic 6 avec la γ -gliadine 45, et dans le pic 5. Chez Calvinor, le constituant 51 est élué à la fois dans le pic 2 avant la γ -gliadine 42 et dans le pic 6 après la γ -gliadine 42.

Les diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide pH 3,1 montrent que pour une concentration en éthanol supérieure ou égale à 50 % un nombre supérieur de constituants protéiques restent fixés chez Agathé sur le support chromatographique, principalement des β -gliadines.

3 Solubilisation des gliadines par le myristate de sodium

L'analyse électrophorétique des gliadines d'Agathé (*figure 11*) montre qu'il existe une différence quantitative entre les protéines extraites avec une faible quantité de savon (10-20 mg/l g de semoule) et celles extraites avec une forte quantité (40, 50, 60 mg/l g de semoule). Le dosage d'azote de chaque extrait confirme ce résultat, à savoir qu'une certaine teneur en savon est nécessaire pour une solubilisation efficace des protéines (FLIEDEL, 1979 ; COTTENET, données non publiées).

D'un point de vue qualitatif, peu de différences significatives sont mises en évidence ; la γ -gliadine 51 et une γ -gliadine apparaissent toutes deux pour 20 mg de myristate de sodium. Pour tous les autres constituants, et plus particulièrement la γ -gliadine 45, seule l'intensité des bandes est différente, indiquant qu'avec des doses croissantes de savon, un pourcentage croissant de protéines ont été extraites.

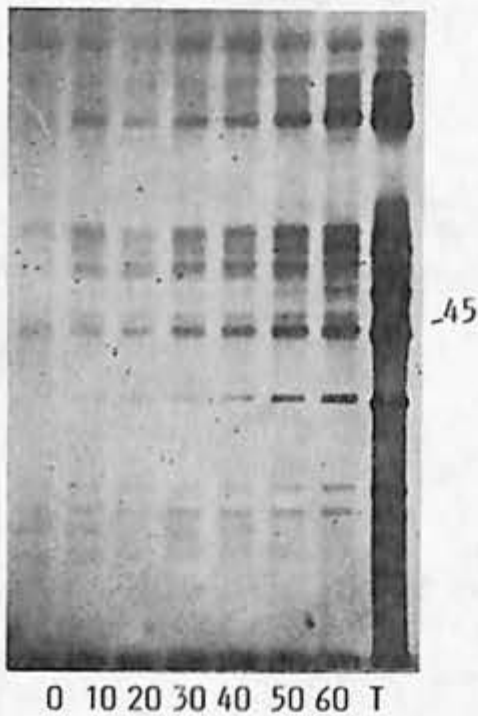


Figure 11

Electrophorèse en gel de polyacrylamide pH 3,1 des gliadines extraites par des quantités croissantes de myristate de sodium à partir de semoule

Electrophoresis in pH 3,1 polyacrylamid gel of gliadins solubilized from semolina in distilled water with increasing amounts of sodium-myristate

T : Témoin gliadines totales
T : Whole-gliadin

0 à 60 : Quantité croissante de myristate de sodium en mg pour 1 g de semoule

0 to 60 : Increasing amount of sodium myristate - mg for 1 g of semolina

Agathé : 0 à 10, présence à l'état de traces de la γ -gliadine 45

Agathé : 0 and 10, traces of γ -gliadin 45

Calvinor : 30, apparition de la γ -gliadine 42

Calvinor : 30, appearance of γ -gliadin 42

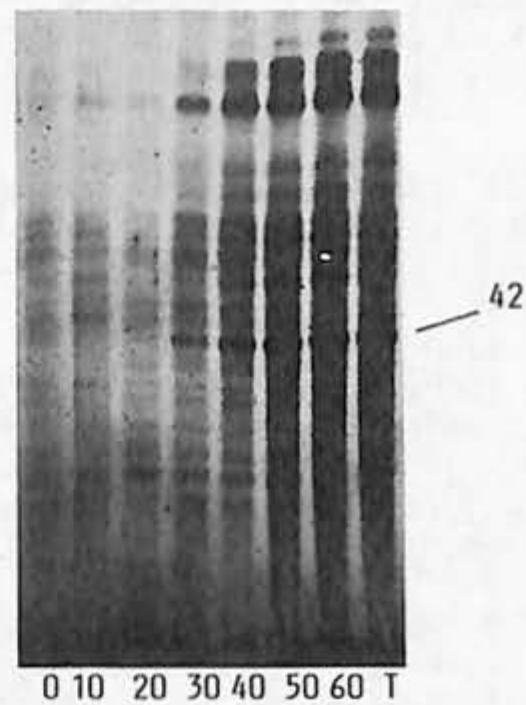


Figure 12

L'analyse électrophorétique des gliadines de Calvinor (*figure 12*) montre :

- une différence quantitative entre les protéines extraites avec une faible quantité de savon (10-20 mg/l g de semoule) et celles

extraites avec une forte quantité (40, 50, 60 mg/1 g de semoule) : cas des ω , β et certaines γ -gliadines ;

- une différence qualitative chez les γ -gliadines 42 et 51, celles-ci apparaissant d'une manière forte et constante à partir respectivement de 30 et 40 mg de myristate de sodium/1 g de semoule.

DISCUSSION

1 Polymorphisme des gliadines en relation avec l'hydrophobicité de surface

Trois remarques principales peuvent être faites à partir des résultats de chromatographie d'interactions hydrophobes.

1.1 Les gliadines totales d'Agathé seraient légèrement plus hydrophobes que les gliadines totales de Calvinor.

1.2 La γ -gliadine 45 aurait une hydrophobicité de surface très légèrement supérieure à celle de la γ -gliadine 42. Ce résultat est confirmé par l'analyse électrophorétique des fractions protéiques obtenues sur phényl-sépharose CL.4B avec un mélange équivalent de gliadines totales Agathé + Calvinor. Ainsi la γ -gliadine 42 est éluée principalement dans l'intervalle 35-38 % d'éthanol, alors que la γ -gliadine 45 l'est principalement dans l'intervalle 41-43 % d'éthanol. Il faut cependant signaler que des traces non négligeables de ces constituants 42 et 45 apparaissent élués simultanément dans l'intervalle intermédiaire 39-40 % d'éthanol.

1.3 La chromatographie d'interactions hydrophobes nous a permis de mettre en évidence un polymorphisme des gliadines différent de celui observé en chromatographie d'échanges d'ions ou en électrophorèse (polymorphisme également souligné par POPINEAU et GODON, 1978, 1982). Il apparaît notamment qu'une même gliadine de mobilité électrophorétique déterminée peut être présente dans plusieurs fractions chromatographiques d'interactions hydrophobes. Nous avons ainsi relevé (*figures 7 et 9*) les cas des γ -gliadines 45 et 51 respectivement dans deux et trois fractions. On peut supposer qu'on est en présence de deux ou plusieurs protéines différentes par leur hydrophobicité de surface et que le seul critère de classification en électrophorèse tampon lactate d'aluminium pH 3,1 (WOYCHICK *et al.*, 1961 ; AUTRAN et BOURDET, 1975 ; BUSHUK et ZILLMAN, 1978) ne permet pas de distinguer. Ce polymorphisme peut être également noté pour des constituants β ou α -gliadines.

Ce résultat pourrait être la conséquence de différents types d'agrégation (liée à des différences de structure et de capacité d'interactions des protéines) qui s'établirait entre les constituants gliadines.

2 Accessibilité et agrégation des constituants 45 et 42

L'étude de la solubilisation des gliadines par le myristate de sodium montre (*figure 11*) que, dans le cas de la variété Agathé, l'ensemble des constituants du diagramme électrophorétique dont la γ -gliadine 45 est visible pour les doses les plus faibles utilisées (10 mg/1 g de

semoule). Un accroissement de la quantité de myristate de sodium n'apporte ensuite qu'une réponse quantitative (superposition des différentes protéines). Inversement, chez la variété Calvinor, cette réponse est qualitative puisque (*figure 12*) la quasi-totalité des constituants gliadines dont la γ -gliadine 42 apparaissent de façon brusque et constante pour une quantité intermédiaire en myristate de sodium (30 et 40 mg/l g de semoule). D'autre part, l'examen des électrophorogrammes semble montrer qu'un maximum de solubilisation des gliadines est atteint chez Calvinor pour 60 mg de savon/l g de semoule alors qu'il ne semble pas être atteint pour les mêmes doses chez Agathé.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer le comportement plus hydrophobe du constituant γ -gliadine 45.

1 - Les résidus apolaires ou les zones hydrophobes de la γ -gliadine 45 seraient plus nombreuses que celles de la γ -gliadine 42.

2 - Comparativement au constituant 42, les zones hydrophobes de la γ -gliadine 45 seraient plus accessibles ou situées à la surface de la molécule.

3 - La γ -gliadine 45 serait, et pas seulement par ses seules zones hydrophobes, plus accessible par le savon que la γ -gliadine 42.

4 - En admettant qu'il y ait compétition entre le savon et les autres protéines ou autres constituants auxquels les gliadines 45 et 42 sont liés, l'affinité de la γ -gliadine 45 pour le savon est supérieure à celle de la γ -gliadine 42 ; la gliadine 42 apparaîtrait ainsi plus liée que ne l'est la gliadine 45 aux autres protéines ou autres constituants.

2.1 Hypothèse 1

Nous avons déjà noté que les deux constituants γ -gliadines 45 et 42 de même poids moléculaire et de composition similaire en acides aminés possédaient respectivement 343 et 375 résidus apolaires pour 1 000 résidus (COTTENET *et al.*, 1983). La protéine 42 a donc plus de résidus apolaires et certainement plus de zones hydrophobes que la protéine 45. L'hydrophobicité totale moyenne confirme que le constituant 42 ($H\Phi_{ave} = 975,6$ calories/résidu) est globalement plus hydrophobe que le constituant 45 ($892,7$ calories/résidu). Ceci nous permet d'écarter l'hypothèse 1.

2.2 Hypothèse 2

La γ -gliadine 45 a vingt résidus proline de moins que la γ -gliadine 42 pour mille. Cette différence de 2 %, connaissant le rôle de la proline au niveau de la structure secondaire (interruption de l'enroulement hélicoïdal des acides aminés, l' α -hélice étant la structure secondaire la plus stable), indiquerait une structure plus ouverte du constituant 42, et donc une plus grande accessibilité des zones hydrophobes. Ce résultat est étayé par les calculs de polarité et d'hydrophobicité totale moyenne. $P = 1,57$ et $H\Phi_{ave} = 892,7$ calories/résidu pour la γ -gliadine 45 contre $P = 1,38$ et $H\Phi_{ave} = 963$ calories/résidu pour la γ -gliadine 42. D'un point de vue structural, la "capacité hydrophobe", qui est traduite par P et $H\Phi_{ave}$ (BIGELOW, 1967) semble donc supérieure chez le constituant 42.

Par ailleurs, notons que ces valeurs P et $H\Phi_{ave}$, en référence à la courbe limite de Fisher (1964), indiquent que les gliadines du blé dur sont des protéines globulaires. POPINEAU et GODON (1982) le montrent pour des fractions gliadines du blé tendre (variété Capitole) en indiquant que ces protéines possédaient un noyau hydrophobe et non un excès de groupes hydrophobes. Pour ces auteurs, les fractions protéiques séparées par chromatographie d'interactions hydrophobes ne sont pas, d'un point de vue hydrophobicité totale moyenne, significativement différentes et sont toutes comprises entre 1063 et 1084 calories/résidu. PEPIN (1982) indique que les gliadines totales et les γ -gliadines du blé tendre (variété Capitole) ont respectivement une hydrophobicité totale moyenne de 1040 et 1075 calories/résidu, les fractions ω , γ , β et α ayant le même ordre de grandeur. Il suggère que ces fractions ont une répartition différente des résidus apolaires, avec en particulier de longues séquences d'acides aminés hydrophobes pour les γ -gliadines.

Ainsi, la γ -gliadine 42 qui est une protéine globulaire comme la γ -gliadine 45 possède une conformation permettant un nombre d'interactions hydrophobes supérieur au constituant 45. La structure de la protéine 42 est donc plus ouverte et autorise, comparativement à la protéine 45, une plus grande accessibilité de ses zones hydrophobes plus nombreuses. Ceci nous permet d'écarter l'hypothèse 2.

2.3 Hypothèses 3 et 4

2.3.1 Influence du pH

Les études que nous avons effectuées par Chromatographie d'Interactions Hydrophobes (C.I.H.) montrent que la γ -gliadine 45 possède, sur octyl-sépharose CL.4B, une hydrophobicité de surface légèrement supérieure à celle de la γ -gliadine 42. Sur phényl-sépharose CL.4B, les deux constituants 45 et 42 ont une hydrophobicité de surface identique. Ce résultat s'expliquerait par le fait que le support phényl-sépharose CL.4B a une affinité spécifique pour les acides aminés aromatiques* ; or, la γ -gliadine 42 en possède 245 alors que la γ -gliadine 45 n'en possède que 217 pour 1 000 (tableau 1).

Au cours de la C.I.H., les gliadines dissoutes dans du tampon lactate d'aluminium 0,028 M, pH 3,6 sont éluées par un gradient d'éthanol dans de l'ammoniaque 0,02 N. L'éluion des fractions protéiques est donc déterminée par une augmentation brusque du pH, environ 9, suivie de la diminution de la polarité de l'éluant.

Inversement, les études de BURNOUF et BIETZ (1984) montrent, après analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance (H.P.L.C.), que la γ -gliadine 45 est éluée dans des conditions moins hydrophobes que la γ -gliadine 42, indiquant que la protéine 45 aurait une hydrophobicité de surface plus faible. Ces auteurs travaillent cependant sur une colonne Synchronapak RP-P-C18 et les gliadines dissoutes dans une solution aqueuse d'éthanol à pH 7,0 sont éluées par un gradient d'acétonitrile à pH 2,2 ; ces conditions très différentes de celles de la C.I.H.

* Acides aminés aromatiques : proline, tyrosine, phénylalanine, histidine.

tendent à expliquer la discordance entre les résultats d'H.P.L.C. et de C.I.H. L'augmentation de pH qui s'accompagne d'un accroissement de la proportion en α -hélice (KASARDA *et al.*, 1968) est responsable d'une intensification dans le degré d'agrégation des molécules (GREENE et KASARDA, 1971), d'où une diminution de l'accessibilité des zones hydrophobes. La variation de pH serait donc une des causes des différences dans la conformation, dans l'agrégation des protéines et dans les effets électrostatiques et ioniques des molécules. Ces divers changements pourraient être ainsi la cause principale d'une modification dans l'accessibilité des zones hydrophobes des γ -gliadines 45 et 42, ce qui expliquerait les différences d'hydrophobicité entre ces deux constituants en H.P.L.C. et en C.I.H.

2.3.2 Schéma explicatif du comportement des γ -gliadines 45 et 42

Nous avons noté la réponse quantitative des gliadines d'Agathé au cours de la solubilisation par le myristate de sodium. La γ -gliadine 45, par opposition à la γ -gliadine 42 qui apparaît d'une façon brusque et certainement proche de son maximum, est solubilisable par de faibles quantités en savon, l'augmentation du savon n'apportant qu'une réponse graduelle. L'accessibilité de la γ -gliadine 45 par le myristate de sodium se ferait d'une façon plus progressive que celle de la γ -gliadine 42. Or, selon WASIK *et al.* (1979) et FLIEDEL (1983), les savons à des pH d'environ 9 (KOBREHEL et BUSHUK, 1977, 1978) se fixent par des interactions électrostatiques sur les groupes chargés des protéines, ce qui entraîne des effets de charge importante, cependant que les interactions hydrophobes s'établissent entre la chaîne hydrocarbonée et les groupes apolaires des protéines. Nous avons vu précédemment le parallèle entre les variations de pH, la conformation (agrégation, accessibilité des zones hydrophobes) et les effets électrostatiques de la molécule. L'accessibilité progressive au savon de la γ -gliadine 45 et celle brusque de la γ -gliadine 42, l'hydrophobicité de surface inférieure à pH 2,2 et supérieure à pH 9 pour la γ -gliadine 45, la composition en acides aminés hydrophobes et la conformation plus ouverte de la γ -gliadine 42 nous permet d'avancer, par rapport aux hypothèses 3 et 4, une explication sur le comportement hydrophobe des deux constituants 45 et 42.

a/ Les interactions liant la protéine 45 aux autres protéines ou autres constituants seraient, comparativement à la protéine 42, de nature plus faible que les interactions protéine-savon, ce qui expliquerait que pour de petites quantités en savon des traces de γ -gliadine 45 soient déjà solubilisées.

b/ Pour de fortes teneurs en savon, l'accessibilité de la protéine 45, dans l'ensemble des constituants de la semoule de la variété Agathé, serait moindre que celle de la protéine 42, dans l'ensemble des constituants de la semoule de la variété Calvinor.

Pour de faibles teneurs en savon, la γ -gliadine 42 serait plus liée que ne l'est la γ -gliadine 45 aux autres protéines ou autres constituants, bien que ses zones hydrophobes soient plus nombreuses et plus accessibles.

Notons que nos résultats et le schéma proposé - moins grande accessibilité de la protéine 45 et liaisons plus faibles entre la protéine 45 et les autres constituants - sont en accord avec ceux de KOBREHEL (1980), KOBREHEL et MATIGHON (1980) pour qui la qualité boulangère semble être liée à la force des interactions hydrophobes pré-existantes entre les protéines et les autres constituants de la farine.

Tableau 3
 Comparaison des différentes méthodes d'études sur l'hydrophobicité
 des constituants γ -gliadines 45 et 42

Table 3
 Comparison between several methods on hydrophobicity
 of components γ -gliadins 45 et 42

	45	42
Hydrophobicité théorique		
NPS	++	+++
H Φ _{ave}	+	++
P	++++	+++
Proline (1)	120	140
Hydrophobicité de surface		
C.I.H. (2)		
. phényl-sépharose	+++	+++
. octyl-sépharose	+++	++
Savon		
. quantité faible	+	0
. quantité importante	+++	+++++
C.I.H. (3)		
. phényl-sépharose	++++	++
H.P.L.C. (4)		
. pH = 2,2	++	++++
. pH = 6	+++	+++

(1) En nombre de résidus pour
1 000

(1) Residues/1 000 total residues

(2) Chromatographie d'interactions
hydrophobes

(2) Hydrophobic interaction
chromatographie

(3) GODON et POPINEAU, 1981

(3) GODON and POPINEAU, 1981

(4) BURNOUF et BIETZ, 1983

(4) BURNOUF and BIETZ, 1983

Les croix symbolisent la gradua-
tion dans l'hydrophobicité des
deux composants :

+ Hydrophobicité faible
+++ Hydrophobicité moyenne
+++++ Hydrophobicité élevée

Crosses symbolize graduation in
hydrophobicity of two components
 γ -gliadin 45 and 42 :

+ Low hydrophobicity
+++ Middle hydrophobicity
+++++ High hydrophobicity

CONCLUSION

En définitif, les études d'hydrophobicité totale à partir de la composition en acides aminés, d'hydrophobicité de surface par chromatographie d'interactions hydrophobes et de solubilisation des gliadines par le myristate de sodium (tableau 3) nous permettent d'envisager une

relation de type fonctionnel basée sur la différence d'hydrophobicité des γ -gliadines 45 et 42, la présence du constituant 45 conditionnant de bonnes propriétés du gluten ou inversement son absence ou la présence du constituant 42 conditionnant des propriétés opposées.

L'approche originale de l'hydrophobicité étudiée avec la solubilisation des gliadines par un savon nous oblige cependant à parler plus de différence d'accessibilité ou de différence d'agrégation que d'hydrophobicité des γ -gliadines 45 et 42.

On peut cependant se poser une question : que se passe-t-il dans la semoule et pendant les différents processus technologiques au moment de la fabrication des pâtes alimentaires (hydratation + traitements mécaniques : malaxage, pétrissage, laminage, filiation et séchage).

En conclusion, nous proposons le schéma suivant : la γ -gliadine 45, comparativement à la γ -gliadine 42, aurait des interactions hydrophobes plus faibles avec les autres constituants :

- plus faibles, car l'ensemble des gliadines d'Agathé apparaît plus agrégé que ne l'est l'ensemble des gliadines de Calvinor, ce qui entraîne une moins grande accessibilité de la protéine 45, celle-ci se faisant de manière plus progressive ;

- plus faibles, car la protéine 45 a moins de résidus hydrophobes que la protéine 42, cette dernière ayant par ailleurs une conformation plus ouverte, bien que globulaire, lui permettant d'être plus liée que ne l'est la γ -gliadine 45 aux autres protéines ou autres constituants.

Il semble néanmoins difficile de concevoir que ces différences d'accessibilité et d'agrégation amenant des différences d'hydrophobicité puissent être à elles seules responsables des différences de propriétés du gluten. Les travaux récents de PAYNE *et al.* (1984) sur l'identification de sous-unités gluténines de faible poids moléculaire, LMW-1 et LMW-2, vont dans ce sens. Ces auteurs montrent que les LMW-1 et la γ -gliadine 45 d'une part, les LMW-2 et la γ -gliadine 42 d'autre part sont génétiquement liées. D'après eux, les LMW-1 (ou LMW-2) seraient les principaux responsables d'une bonne (ou mauvaise) qualité culinaire du blé dur. DAMIDAUX *et al.* (1980) avaient également noté la présence de groupes de bandes gliadines " ω -35, γ -43, γ -45 gliadines" et " ω -33, ω -35, ω -38, γ -42 gliadines", au sein desquels aucune recombinaison ne s'observe et qui paraissent se transmettre en bloc.

Ainsi, la nature de la relation "bande 45 ou 42 et qualité culinaire du gluten" serait à la fois d'ordre génétique et fonctionnel. Les γ -gliadines 45 et 42 auraient simultanément un rôle de marqueur génétique, mais aussi des propriétés fonctionnelles différentes : capacité d'agrégation supérieure et moins grande accessibilité des zones hydrophobes chez les constituants 45.

 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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, 277-301.
- AUTRAN J.C., LEW E.J.L., NIMMO C.C., KASARDA D.D., 1979. N-terminal amino acid sequencing of prolamins from wheat and related species. *Nature*, 282, 527-529.
- BIETZ J.A., HUEBNER F.R., SANDERSON J.E., WALL J.S., 1977. Wheat gliadin homology revealed through N-terminal amino acid sequence analysis. *Cereal Chem.*, 54, 1070-1083.
- BIGELOW C.C., 1967. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J. Theoret. Biol.*, 16, 187-211.
- BURNOUF T., BIETZ J.A., 1984. Reversed-phase high-performance-liquid chromatography of durum wheat gliadins : relationship to pasta quality. *J. Cereal Sci.*, 2, 3-14.
- BUSHUK W., ZILLMAN R.R., 1978. Wheat proteins identification by gliadin electrophoregrams. I : Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.*, 58, 505-515.
- CALWELL K.A., 1979. The fractionation and purification of gliadins by hydrophobic interaction chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, 30, 185-196.
- CHARBONNIER L., 1970. Isolement de l' ω -gliadine. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 271, Série D, 2042-2045.
- CHARBONNIER L., TERCE-LAFORGUE T., MOSSE J., 1980. Some physicochemical properties of *Triticum vulgare* β , γ and ω gliadins. *Ann. Technol. Agric.*, 29, 175-190.
- CHUNG K.H., POMERANZ Y., 1979. Acid-soluble proteins of wheat flours. II : Binding to hydrophobic gels. *Cereal Chem.*, 56, 196-201.
- COTTENET M., AUTRAN J.C., JOUDRIER P., 1983. Isolement et caractérisation des composants γ -gliadines 45 et 42 associées aux caractéristiques viscoélastiques du gluten de blé dur. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 297, série III, 149-154.
- DAMIDAUX R., 1979. Nouveaux critères de sélection pour l'amélioration de la qualité culinaire du blé dur. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- DAMIDAUX R., AUTRAN J.C., GRIGNAC P., FEILLET P., 1978. Relation applicable en sélection entre l'électrophorégramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de *Triticum durum* Desf. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 287, série D, 701-704.
- DAMIDAUX R., AUTRAN J.C., GRIGNAC P., FEILLET P., 1980. Déterminisme génétique des constituants gliadines de *Triticum durum* Desf. associés à la qualité culinaire intrinsèque des variétés. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 291, série D, 585-588.
- DAMIDAUX R., FEILLET P., 1978. Relation entre les propriétés viscoélastiques du gluten cuit, la teneur en protéines et la qualité culinaire des blés durs. *Ann. Technol. Agric.*, 28, 799-808.
- DU CROS D.L., WRIGLEY C.W., HARE R.A., 1982. Prediction of durum-wheat quality from gliadin-protein composition. *Aust. J. Agric. Res.*, 33, 429-442.
- FISHER H.F., 1964. A limiting law relating the size and shape of protein molecules to their composition. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 51, 1285-1291.
- FLIEDEL G., 1979. Extraction des protéines totales du blé dur. Relations entre la composition protéique et la qualité du blé dur. D.E.A., Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- FLIEDEL G., 1983. Utilisation des sels de sodium d'acides gras pour l'étude et l'isolement des protéines de sorgho. Thèse de 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- GODON B., POPINEAU Y., 1981. Différences d'hydrophobicité de surface des gliadines de deux variétés de blé dur de bonne et de mauvaise qualité. *Agronomie*, 1, 77-82.
- GREENE F.C., KASARDA D.D., 1971. Apolar interaction of α -gliadin-binding of 2-p toluidinyl naphthalene 6 sulfate (TNS). *Cereal Chem.*, 48, 601-609.
- HAMAUZU Z., KHAN K., BUSHUK W., 1979. Studies of glutenin. XIV : Gel filtration and sodium dodecyl sulfate electrophoresis of glutenin solubilized in sodium stearate. *Cereal Chem.*, 56, 513-516.

- HUEBNER F.R., BIETZ J.A., WALL J.S., 1977. Disulfide bonds : key to wheat protein functionality In "Protein cross-linking biochemical and molecular aspects", Friedman M. Ed., p. 67-88. Plenum Press.
- HUEBNER F.R., ROTHFUS J.A., WALL J.S., 1967. Isolation and chemical comparison of different gamma-gliadins from hard red winter wheat flour. *Cereal Chem.*, 44, 221-229.
- HUEBNER F.R., ROTHFUS J.A., 1968. Gliadin proteins from different varieties of wheats. *Cereal Chem.*, 45, 242-253.
- JOPPA L.R., KHAN K., WILLIAMS N.D., 1983. Chromosomal location of genes from gliadin polypeptides in durum wheat *Triticum turgidum* L. *Theor. Appl. Genet.*, 64, 289-294.
- KASARDA D.D., BERNARDIN J.E., GAFFIELD W., 1968. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of α -gliadin. *Biochemistry*, 7, 3950-3957.
- KASARDA D.D., BERNARDIN J.E., NIMMO C.C., 1976. Wheat protein. In "Advances in cereal science and technologie", 1, 158-236.
- KHAN K., BUSHUK W., 1979. Structure of wheat gluten in relation to functionality in breadmaking. *Asc. Symp. Ser.*, 92, 191-206.
- KOBREHEL K., 1980. Extraction of wheat protein with salts of fatty acids and their electrophoretic characterization. *Ann. Technol. Agric.*, 29, 125-132.
- KOBREHEL K., BUSHUK W., 1977. Studies of glutenin. X : Effect of fatty acids and their sodium salts on solubility in water. *Cereal Chem.*, 54, 833-839.
- KOBREHEL K., BUSHUK W., 1978. Studies of glutenin. XI : Note on glutenin solubilization with surfactants in water. *Cereal Chem.*, 55, 1060-1064.
- KOBREHEL K., MATIGNON B., 1980. Solubilization of proteins with soaps in relation to the breadmaking properties of wheat flours. *Cereal Chem.*, 57, 73-74.
- KOSMOLAK F.G., DEXTER J.E., MATSUO R.R., LEISLE D., MARCHYLO B.A., 1980. A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregrams. *Can. J. Plant Sci.*, 60, 427-432.
- LASZTITY R., 1975. Rheologische Eigenschaften von Weizenklebern und ihre Beziehungen zu molekularen Parameter. *Die Nahrung.*, 19, 749.
- LASZTITY R., 1980. Correlation between chemical structure and rheological properties of gluten. *Ann. Technol. Agric.*, 29, 339-361.
- NEMETHY G., SCHERAGA H.A., 1962. The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III : The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins. *J. Phys. Chem.*, 66, 1773-1789.
- OCHOA J.L., 1978. Hydrophobic (interaction) chromatography. *Biochimie*, 60, 1-15.
- PAYNE P., JACKSON E.A., HOLT L.M., 1984. The association between γ -gliadin 45 and good pasta cooking quality in durum wheat varieties : a direct causal effect or the result of genetic linkage ? *J. Cereal Sci.*, 2, 73-81.
- PEPIN D., 1981. Etude des propriétés tensio-actives des fractions de gliadines de blé extraites par des traitements physiques et chimiques. Thèse 3ème cycle (n°3121), Orsay.
- PONTE J.G., DE STEFANIS V.A., TITCOMB S.T., COTTON R.H., 1967. Study of gluten properties as influenced by certain organic solvents. *Cereal Chem.*, 44, 211.
- POPINEAU Y., GODON B., 1978. Application de la chromatographie d'interaction hydrophobe au fractionnement des prolamines du blé tendre. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 287, série D, 1051-1054.
- POPINEAU Y., GODON B., 1982. Surface hydrophobicity of gliadin components. *Cereal Chem.*, 59, 55-62.
- TANFORD C., 1962. Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 4240-4247.
- WASIK R.J., DAOUST H., MARTIN C., 1979. Studies of gluten solubilized in high concentrations of sodium stearate. *Cereal Chem.*, 52, 90-94.
- WAUGH D.F., 1954. Protein-protein interactions. *Adv. Protein Chem.*, 9, 325-437.
- WOYCHIK J.H., BOUNDY J.A., DIMLER R.J., 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 477-482.

WRIGLEY C.W., 1980. The genetic and chemical significance of varietal differences in gluten composition. *Ann. Technol. Agric.*, 29, 213-227.

YON R.J., 1978. Recent developments in protein chromatography involving hydrophobic interactions. *Int. J. Biochem.*, 9, 373-379.