

---

# GUIDE PRATIQUE D'ANALYSES

dans les

## INDUSTRIES DES CÉRÉALES

---

Coordonnateurs  
**B. GODON et W. LOISEL**

Préface  
**J. BURÉ**

Directeur honoraire du Département  
des Industries des Céréales à l'ENSIA  
Membre de l'Académie d'Agriculture de France



**TECHNIQUE & DOCUMENTATION - LAVOISIER**  
11, rue Lavoisier - F 75384 Paris Cedex 08

**APRIA**  
35, rue du Général-Foy - 75008 Paris

1984

20

## Identification variétale à partir des constituants protéiques

J.C. AUTRAN

### 1.- INTRODUCTION

Une identification des variétés de céréales peut être recherchée à partir des constituants protéiques du grain du fait que les protéines constituent des produits directs de la transcription et de la traduction des gènes et reflètent donc le génotype des organismes. L'information que reflètent ces protéines peut être "lue" au moyen de techniques de fractionnement et de caractérisation des constituants élémentaires, telles que la chromatographie, l'électrophorèse, l'électrofocalisation, etc. Différentes méthodes adaptées à l'analyse des protéines des grains de céréales ont été développées ces vingt dernières années. Toutefois ce n'est qu'au cours de la dernière décennie que les progrès analytiques - mais aussi les besoins accrus pour un contrôle des variétés au niveau commercial - ont rendu possible le développement de méthodes permettant une véritable identification variétale à partir des constituants protéiques.

Actuellement, ce sont certainement les techniques d'électrophorèse, et dans certains cas d'électrofocalisation, qui paraissent présenter le meilleur compromis entre la finesse et la reproductibilité des résultats, la performance, la simplicité et le coût de la mise en oeuvre. Parmi les différents constituants protéiques du grain, ce sont les protéines de réserve, ou "protéines du gluten" (prolamines et glutélines) qui sont le plus généralement retenues en raison de leur remarquable polymorphisme intervariétal et de l'indépendance de leurs diagrammes vis-à-vis des facteurs agro-climatiques.

Ce chapitre va donc décrire les principales techniques actuellement disponibles en France et en Europe pour l'identification des variétés de céréales à partir des constituants protéiques du grain :

- électrophorèse des gliadines en gel d'amidon : blés tendres et blés durs ;
- électrophorèse des gliadines en gel de polyacrylamide : blés tendres et blés durs ;

- électrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium : blés tendres, blés durs, orges et malts ;
- électrofocalisation en gel de polyacrylamide : orges et malts.

Dans beaucoup de cas, la spécificité élevée de l'électrophorèse permet, en une seule analyse, d'identifier la variété. Il n'est toutefois pas exclu (et cela est parfois nécessaire dans le cas de groupes de variétés génétiquement voisines) d'utiliser une technique complémentaire : soit une deuxième technique d'électrophorèse des protéines, soit une analyse d'autres constituants du grain (par exemple, isoenzymes), soit l'utilisation de caractéristiques morphologiques du grain (cf. chapitre II.1).

## 2.- ÉLECTROPHORÈSE DES GLIADINES EN GEL D'AMIDON

Cette méthode a fait l'objet de la norme AFNOR V 03-715. Nous renvoyons donc les utilisateurs au Recueil de ces normes.

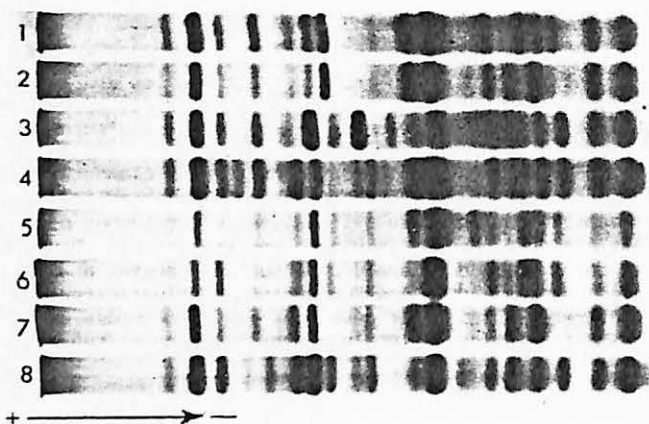


Figure 1  
Electrophorégrammes en gel d'amidon  
de quelques variétés françaises de blé tendre :

- |             |             |
|-------------|-------------|
| 1 : Abo     | 5 : Arkas   |
| 2 : Lutin   | 6 : Bastion |
| 3 : Clément | 7 : Alto    |
| 4 : Kinsman | 8 : Joss    |

Nous complétons cependant les informations fournies par la norme en donnant un exemple (figure 1) du type d'électrophorégrammes auquel conduit la méthode. Nous rappelons également que la méthode s'applique actuellement aux blés tendres et aux blés durs (AUTRAN, 1975 ; AUTRAN et BOURDET, 1975) et que l'identification s'effectue à l'aide d'un document appelé "clé de détermination des variétés de blé" remis à jour chaque année, qui rend compte de performances à attendre en matière d'identification des variétés françaises de blé.

Il est également possible (tableau 1) de définir quels sont les avantages et les inconvénients de l'électrophorèse en gel d'amidon, notamment, par rapport aux autres méthodes électrophorétiques décrites dans ce chapitre.

Tableau 1  
Avantages et inconvénients du gel d'amidon  
pour l'électrophorèse des gliadines

Avantages	Inconvénients
Premier support à avoir permis une résolution élevée des gliadines	Résolution influencée par les conditions de chauffage et d'agitation
Support biologique, non toxique	Difficulté de fabriquer des gels de consistance uniforme et reproductible
Equipement simple, ne nécessitant pas de système de refroidissement	Fluctuation de qualité des lots commerciaux
Bonne résolution des fractions oméga	Gels fragiles et difficiles à manipuler
	Support sensible à l'action des amylases de l'échantillon
	Gels généralement épais, donc coûteux
	Nécessité de découper les gels pour les colorer
	Valeurs de densitométrie discutables
	Résolution médiocre des fractions alpha
	Nécessité d'avoir des extraits concentrés : dépôts au moyen de papiers filtres
	De nombreuses variétés ne sont pas différenciables

## 3.- ÉLECTROPHORÈSE DES GLIADINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

### 3.1.- Principe et domaine d'application

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide permet la séparation des protéines sur la base de la charge électrique nette et de l'encombrement moléculaire. Selon le type d'appareil utilisé, les plaques de gel de polyacrylamide peuvent être disposées horizontalement (BUSHUK et ZILLMAN, 1978) ou verticalement (TKACHUK et METLISH, 1980). Nous décrivons ci-dessous parallèlement ces deux variantes dont le point commun est d'utiliser des gels acides (tampon lactate ; pH 3.1) et une concentration uniforme (6 %) en acrylamide. Ces méthodes peuvent être appliquées,

comme l'électrophorèse en gel d'amidon, aux blés tendres et aux blés durs. Nous signalons cependant que d'autres méthodes utilisant, par exemple, des gels en tubes verticaux de polyacrylamide (KONAREV *et al.*, 1977), des gels de polyacrylamide-urée (LAURIERE et MOSSE, 1982), ou encore des gels à concentration croissante de polyacrylamide (WRIGLEY, 1980) ont été décrites. Il est possible, en outre, de réaliser des électrophorèses bidimensionnelles en combinant des migrations obtenues dans deux directions perpendiculaires, mais cela est rarement utilisé pour l'identification des variétés.

### 3.2.- Appareillage

Alimentation stabilisée pour l'électrophorèse. Tout modèle courant permettant de délivrer au moins 400 volts sous 200 mA convient pour l'analyse de 2 x 10 échantillons simultanément selon la méthode Bushuk. Par contre, la méthode rapide Tkachuk nécessite d'utiliser de hauts voltages et donc une alimentation dont les performances sont de 2 000 volts - 150 mA pour 2 x 20 ou 4 x 12 échantillons analysables simultanément.

Cuves d'électrophorèse (méthode Bushuk). Cette méthode nécessite des cuves horizontales (voir modèle sur la figure 2) avec refroidissement par eau. Chaque cuve permet l'analyse de dix ou douze échantillons. La dimension de gels est de 222 x 136 x 6 mm.

Cuves d'électrophorèse (méthode Tkachuk). Cette méthode nécessite une ou plusieurs cuves permettant l'utilisation de plaques verticales de gels. Tout appareil acceptant des plaques d'au moins 100 mm x 100 mm et d'épaisseur 1,5 mm ou 0,75 mm peut en principe convenir. Toutefois, la technique n'a été testée qu'avec les trois cuves suivantes :

2001 (L.K.B.) : 2 x 10 ou 2 x 20 échantillons  
 PROTEAN (BIORAD) : 2 x 10 ou 2 x 20 échantillons  
 HAVANA (DESAGA) : 4 x 12 échantillons

Cellules de verre, adaptées à l'appareil précédent, pour le moulage de gels de 1,5 mm ou de 0,75 mm d'épaisseur.

Cryothermostat permettant une circulation d'eau de 20°C (méthode Bushuk) ou de 7°C (méthode Tkachuk) dans les cuves.

Petite centrifugeuse de paillassse (3 000 t/mm).

Microseringues ou seringue multiple DESAGA DH 146381 avec plaques de microtitration DH 146384.

Agitateur de gels à balancement.

Bacs en matière plastique.

Négatoscope pour l'observation des gels.

Appareillage de photographie.

Matériel courant de laboratoire : balances, pipettes, fioles, éprouvettes, béchers, pinces, marteau, tubes à centrifuger ou à hémolyse, agitateurs, micro-pipettes ou distributeurs de volumes, fils électriques, etc.

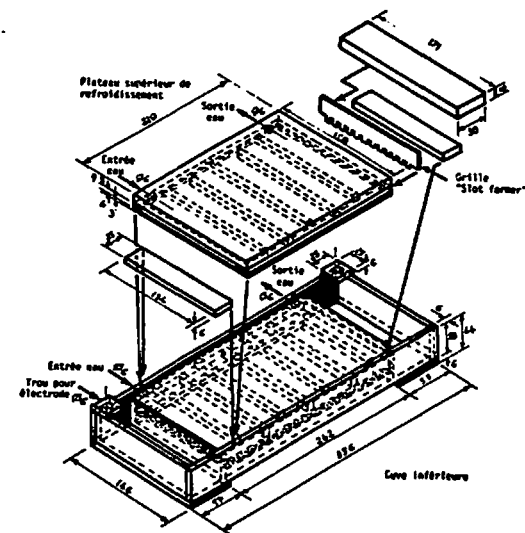


Figure 2  
 Appareil d'électrophorèse (selon BUSHUK et ZILLMAN, 1978)

### 3.3.- Réactifs

Il est important, notamment pour la qualité des diagrammes, que toutes les solutions soient préparées avec de l'eau parfaitement désionisée ou distillée.

#### 3.3.1.- Solution d'extraction des gliadines

On utilise le chloro-2-éthanol à 25 % dans l'eau, contenant en outre 0,02 % de pyronine G (PROLABO) et 30 % de saccharose. Cette solution peut se conserver indéfiniment au froid. La pyronine est un colorant destiné à faciliter le dépôt des échantillons et à visualiser la migration sous l'effet du champ électrique. Le saccharose a pour effet d'accroître la densité de l'extrait et de permettre des dépôts plus réguliers.

#### 3.3.2.- Solution mère de lactate d'aluminium

Peser 50 g de lactate d'aluminium. Transvaser dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Ajouter 55 ml (68,2 g) d'acide lactique et compléter à 1 000 ml avec de l'eau désionisée. On obtient un litre de solution mère de force ionique 1,0 et de pH 2,50, qui peut se conserver indéfiniment au froid.

#### 3.3.3.- Solution diluée de lactate d'aluminium (tampon d'électrophorèse)

On l'utilise à la fois pour préparer le gel et comme liquide des bacs à électrodes. Il doit être renouvelé à chaque expérience. On le prépare en diluant vingt fois la solution mère précédente avec de l'eau désionisée. La force ionique est de 0,05 et le pH de 3,10. Ce tampon ne doit pas être conservé plus de quelques jours.

### 3.3.4.- Solution de préparation du gel de polyacrylamide

**ATTENTION : LES SOLUTIONS D'ACRYLAMIDE (NON POLYMERISE) SONT TRES TOXIQUES. EVITER TOUTE MANIPULATION AVEC LES MAINS NUES. EN CAS DE CONTACT, LAVER ABONDAMMENT A L'EAU.**

Mélanger 12,0 g d'acrylamide, 0,6 g de NN'-méthylène-bis-acrylamide, 0,2 g d'acide ascorbique, 0,005 g de sulfate ferreux à 10,0 ml de solution mère de lactate d'aluminium et amener à 200 ml avec de l'eau désionisée. Au moment de couler le gel, ajouter 1,0 ml d'eau oxygénée à 3 %.

### 3.3.5.- Solution de coloration des gliadines

Agiter (barreau magnétique) durant 30 min, 10 g de Bleu de Coomassie R 250 dans un litre d'éthanol absolu et filtrer. On obtient une solution mère qui se conserve indéfiniment à température ordinaire. Le colorant lui-même est préparé au moment de l'emploi en diluant vingt fois la solution mère dans l'acide trichloracétique à 12 %.

### 3.4.- Extraction des gliadines

Le principe à suivre est le même que pour l'électrophorèse en gel d'amidon. Nous renvoyons donc au § 8.2 de la Norme AFNOR V 03-715.

La seule différence concerne la concentration de l'extrait : utiliser ici une quantité de solution d'extraction (3.3.1) égale à six fois (blé tendre) ou huit fois (blé dur) la masse de l'échantillon (farine, semoule ou grain broyé).

### 3.5.- Préparation du gel

Préparer le moule à gel, soit directement dans la cuve d'électrophorèse (méthode Bushuk, figure 2) au moyen des blocs de Plexiglas, soit avec les plaques de verre et les espaceurs de la cuve verticale (méthode Tkachuk).

Après addition de l'eau oxygénée à la solution d'acrylamide (§ 3.3.4), homogénéiser et remplir aussitôt le moule, positionner le peigne "slot former" (dont le rôle est d'imprimer des fentes lors de la polymérisation) en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Ne plus toucher à l'ensemble jusqu'à polymérisation complète (1 à 2 min).

### 3.6.- Electrophorèse

L'électrophorèse proprement dite peut commencer environ cinq minutes après la polymérisation. Il n'y a pas ici de phase de précurant.

#### 3.6.1.- Dépôt des échantillons

Retirer avec précaution le peigne "slot former" et éventuellement les blocs de Plexiglas et remplir les bacs à électrodes de tampon d'électrophorèse (§ 3.3.3).

Déposer les échantillons d'extraits gliadines (§ 3.4) dans les différentes fentes : 10 µl par échantillon pour la méthode Bushuk, 3 µl pour

la méthode Tkachuk. L'opération de dépôt est toujours accomplie plus aisément si les fentes sont préalablement remplies de tampon, car l'échantillon, de plus grande densité, se dépose alors uniformément dans la fente, déplaçant le tampon.

Cette phase doit évidemment être accomplie avec beaucoup de soin car elle conditionne, pour une part, la qualité des diagrammes. Veiller à introduire la totalité de l'extrait au fond de la fente, à ne pas en répandre à la surface du gel, à ne pas contaminer les fentes voisines. La présence de pyronine dans l'extrait facilite d'ailleurs cette opération.

#### 3.6.2.- Migration des protéines

Les dépôts ayant été effectués, connecter les tubes de circulation d'eau du bain-marie à la cuve d'électrophorèse et régler la température à 20°C (méthode Bushuk) ou 7°C (méthode Tkachuk).

Connecter les cordons électriques au générateur (borne + du côté où les dépôts ont été effectués) et régler le voltage à 400 volts (méthode Bushuk) ou à 1 000 volts (méthode Tkachuk), ce qui doit donner approximativement des valeurs d'intensité de 75 mA (pour une plaque de 6 mm d'épaisseur) ou 100 mA (pour quatre plaques de 0,75 mm d'épaisseur), respectivement.

La migration est poursuivie cinq heures (méthode Bushuk) ou 40 min seulement (méthode Tkachuk) à voltage et température constants.

### 3.7.- Coloration

Démouler le gel et le placer dans un bac plastique et verser 400 ml de solution de coloration (§ 3.3.5). La formule de colorant étant relativement instable, il est nécessaire d'utiliser des bacs parfaitement propres et longuement rincés lorsque de l'eau de Javel a été utilisée pour les nettoyages. Un premier examen des bandes protéiques est possible après deux-trois heures. L'interprétation définitive ne peut cependant se faire qu'après une nuit de coloration. Il n'est pas nécessaire de décolorer les gels comme c'est le cas avec la nigrosine en gel d'amidon. Il suffit seulement de rincer pour éliminer le colorant ayant pu précipiter en surface et de conserver les gels dans l'acide trichloracétique 12 %.

Avec les gels de 0,75 mm d'épaisseur (méthode Tkachuk), 100 ml de colorant suffisent et les résultats sont lisibles après une-deux heures seulement.

Si l'on désire photographier les gels, on utilisera un négatoscope.

### 3.8.- Interprétation du diagramme

Le principe de l'interprétation étant le même que pour l'électrophorèse en gel d'amidon, nous renvoyons au § 9 de la Norme AFNOR V 03-715.

Les diagrammes obtenus en gel de polyacrylamide (figure 3) présentent une certaine analogie avec ceux obtenus en gel d'amidon particulièrement dans les régions oméga et gamma. Les régions bêta et alpha sont en revanche mieux résolues en système polyacrylamide.

Dans l'ensemble, malgré cette analogie, il est important de signaler que la clé de détermination élaborée à partir des électrophorégrammes amidon ne peut pas être utilisée directement avec les électrophorégrammes polyacrylamide, notamment en raison de la non concordance des mobilités des constituants entre les deux systèmes.

Bien que la technique polyacrylamide soit actuellement disponible pour l'étude des variétés de blé tendre et de blé dur, aucune clé de détermination complète n'a encore été construite pour ce système ; seule une clé limitée aux trente variétés les plus cultivées en France a été établie à partir de diagrammes de type Bushuk (AUTRAN, 1979).



Figure 3  
Exemple d'électrophorégrammes en gel de polyacrylamide de quelques variétés de blé :  
1 : Top                      4 : Extrem  
2 : Extrem                  5 : Diplomat  
3 : Hardi

Les avantages et inconvénients du support polyacrylamide (notamment par rapport au support amidon) ont été rassemblés dans le tableau 2.

#### 4.- ÉLECTROPHORÈSE DES PROTÉINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-DODÉCYL SULFATE DE SODIUM

##### 4.1.- Principe et domaine d'application

Par rapport aux techniques d'électrophorèse conventionnelle en gel de polyacrylamide, deux différences importantes sont à signaler :

- le support d'électrophorèse est un gel de polyacrylamide renfermant du dodécylsulfate de sodium (S.D.S.), lequel confère la propriété d'opérer une séparation des protéines sur la seule base de l'encombrement moléculaire ;
- les protéines considérées sont ici, non seulement les gliadines, mais également (grâce à la présence d'un réducteur dans le solvant d'extraction), des gluténines, ainsi que des albumines-globulines.

La technique décrite ici est une adaptation et une simplification de celle de PAYNE *et al.* (1979) et repose, comme cette dernière sur le

Tableau 2  
Avantages et inconvénients du gel de polyacrylamide pour l'électrophorèse des gliadines de blé

Avantages	Inconvénients
Support facile à préparer (à froid) dans des conditions reproductibles	Toxicité de l'acrylamide non polymérisé et de l'acide trichloracétique
Pas de précurant Temps d'expérience et de coloration relativement courts, surtout en système vertical	Instabilité du colorant utilisé pouvant entraîner une précipitation en présence d'impuretés Perte progressive de la coloration des diagrammes
Possibilité d'utiliser des gels très minces, donc de faible coût	
Grande sensibilité dans la détection des bandes (de faibles quantités d'extraits suffisent pour obtenir un diagramme)	
Possibilité de colorer le gel sans le découper	
Valeurs faibles de densitométrie	
Bonne résolution des fractions alpha	
Support insensible à l'action des amylases de l'échantillon	
Résolution supérieure à celle du gel d'amidon, d'où la possibilité de différencier davantage les variétés	

système décrit par LAEMLI (1970). Elle s'applique aux blés tendres, aux blés durs, aux orges et aux malts.

##### 4.2.- Appareillage

Alimentation stabilisée pour électrophorèse. Tous les modèles courants conviennent, car les intensités utilisées ici sont très faibles.

Appareil d'électrophorèse verticale. Tout appareil acceptant des plaques verticales de gel d'au moins 10 cm x 10 cm peut en principe convenir. La technique n'a toutefois été testée qu'avec les cuves suivantes :

2001 (LKB) : 2 x 10 ou 2 x 20 échantillons  
PROTEAN (BIDRAD) : 2 x 10 ou 2 x 20 échantillons  
HAVANA (DESAGA) : 4 x 12 échantillons

Cellules de verre adaptées à l'appareil précédent pour le moulage de gels de 1,5 mm ou de 0,75 mm d'épaisseur : plaques, espaceurs et peignes "slot formers".

Etuv universelle permettant une régulation à 80°C.

Cryosthermostat permettant une circulation d'eau à 15°C dans la cuve d'électrophorèse. Une réfrigération par l'eau du robinet peut remplacer cet appareil mais donne des temps de migration moins réguliers.

Petite centrifugeuse de paillasse (3 000 t/min).

Microseringue ou seringue multiple DESAGA DH 146381 (0 - 120 µl) avec plaques de microtitration DH 146384.

Bain-marie bouillant.

Agitateur de gels à balancement.

Bacs en matière plastique.

Négatoscope pour l'observation des gels.

Appareillage de photographie.

Matériel courant de laboratoire : balances, pipettes, fioles, fioles à vide, éprouvettes, béchers, pincettes, marteau, tubes à centrifuger ou à hémolyse, agitateurs, micro-pipettes ou distributeurs de volumes, fils électriques.

#### 4.3.- Réactifs

Il est important, notamment pour la qualité des diagrammes, que toutes les solutions soient préparées avec de l'eau parfaitement désionisée ou distillée.

##### 4.3.1.- Solution d'extraction des protéines

Préparer tout d'abord une solution mère en mélangeant 6,25 ml de tampon Tris 1 M, pH 6,8 (obtenu par addition d'HCl), 12,05 ml d'eau distillée, 2 g de S.D.S., 10 mg de pyronine G (PROLABO) puis, après dissolution, 10 ml de glycérol. Cette solution mère peut se conserver plusieurs mois au froid.

La solution d'extraction des protéines doit être impérativement préparée au moment de l'emploi en mélangeant 4,25 ml de la solution mère, 0,75 ml de mercaptoéthanol et 10 ml d'eau distillée.

##### 4.3.2.- Tampon d'électrophorèse

Préparer tout d'abord une solution mère en mélangeant 141,1 g de glycine, 30 g de Tris, 10 g de S.D.S. et en amenant à 1 000 ml avec de l'eau désionisée. Le tampon d'électrophorèse est préparé en diluant simplement dix fois la solution mère avec de l'eau désionisée.

La solution mère peut se conserver deux mois à la température du laboratoire. Ne pas conserver le tampon plus d'une semaine. Le pH du tampon doit être voisin de 8,3. Il peut être légèrement plus élevé au départ mais s'abaisse ensuite. La valeur exacte du pH ne semble pas critique mais, si nécessaire, ajuster avec de la glycine. Ne pas ajouter d'HCl. Agiter le tampon avant chaque usage pour redissoudre le S.D.S. ayant éventuellement précipité.

#### 4.3.3.- Solutions de séparation des gels de polyacrylamide-S.D.S.

**ATTENTION : LES SOLUTIONS D'ACRYLAMIDE (NON POLYMERISE) SONT TRES TOXIQUES. EVITER TOUTE MANIPULATION AVEC LES MAINS NUES. EN CAS DE CONTACT, LAVER ABONDAMMENT A L'EAU.**

La présente technique, contrairement à la précédente, utilise deux sortes de gels de polyacrylamide coulés en deux couches successives : un gel principal dit de "séparation" dans lequel le fractionnement électrophorétique a lieu et un gel supérieur dit de "concentration", dont la composition et le pH sont différents et dont la fonction est de concentrer sous une très faible épaisseur les échantillons de protéines avant leur entrée dans le gel de séparation.

##### 4.3.3.1.- Gel de séparation (13 % d'acrylamide - pH 8,8)

Dissoudre 11,3 g d'acrylamide, 90 mg de NN'-méthylène-bis-acrylamide dans de l'eau désionisée dont on amènera le volume à 50 ml. Filtrer. Prélever 46 ml de la solution obtenue. Mélanger à 30 ml de tampon Tris 1 M pH 8,8 dans une fiole à vide de 100 ml. Dégazer le mélange (trompe à eau). Au moment de couler les gels, ajouter 2 ml de solution de persulfate d'ammonium à 1 %, 0,8 ml de solution de S.D.S. à 10 %, 40 µl de TEMED, et homogénéiser en évitant la formation de bulles.

Les quantités ci-dessus permettent de préparer quatre gels de 110 x 110 x 1,5 mm (cuve DESAGA) ou deux gels de 140 x 160 x 1,5 mm (cuve LKB ou BIORAD).

Il est à noter que le tampon Tris et la solution de S.D.S. peuvent se conserver au froid jusqu'à deux mois. Par contre, la solution de persulfate d'ammonium ne se conserve pas et doit être préparée chaque jour d'utilisation.

##### 4.3.3.2.- Gel de concentration (3 % d'acrylamide - pH 6,8)

Dissoudre directement dans une fiole à vide de 50 ml : 0,6 g d'acrylamide, 8,66 mg de NN'-méthylène-bis-acrylamide, 2,5 ml de tampon Tris 1 M pH 6,8 dans 16,8 ml d'eau désionisée. Dégazer le mélange (trompe à eau). Au moment de couler les gels, ajouter : 0,75 ml de solution de persulfate d'ammonium à 1 % ; 0,2 ml de solution de S.D.S. à 10 %, 15 µl de TEMED et homogénéiser en évitant la formation de bulles.

#### 4.3.4.- Solution de coloration des protéines

On utilise successivement un fixateur, un colorant et un décolorant.

Le fixateur est l'acide trichloracétique à 15 % dans l'eau.

Le colorant est préparé au moment de l'emploi en dissolvant 0,7 g de Bleu de Coomassie BBR 250 dans 400 ml de la solution : éthanol à 95%GL (350 ml), acide acétique (100 ml), eau désionisée (1 000 ml).

Le décolorant correspond à la solution éthanol - acide acétique - eau, sans le Bleu de Coomassie.

#### 4.4. Extraction des protéines

L'échantillonnage doit être réalisé dans les mêmes conditions que pour les électrophorèses décrites ci-dessus (cf. Norme AFNOR V 03-715, § 8.2).

Placer les échantillons (grains écrasés ou moutures) dans des tubes à hémolyse et ajouter dans chaque tube une quantité de solution d'extraction (§ 4.3.1) égale à seize fois la masse du grain (800 µl pour 50 mg de grain, par exemple).

Homogénéiser soigneusement les suspensions et placer les tubes au bain-marie bouillant pendant 2 min 30 exactement. Centrifuger aussitôt les tubes, 5 min à 3 000 t/min. Les surnageants sont alors prêts pour le dépôt des échantillons sur les gels.

#### 4.5.- Préparation des gels

Ajuster soigneusement les cellules en verre sur leur support horizontal et resserrer les vis pour éviter toute fuite.

Commencer à couler les gels de séparation (solution 4.3.3.1). Ne pas remplir les cellules complètement afin de laisser place au gel de concentration. Dans l'appareil DESAGA, il est recommandé de couler les gels sur une hauteur de 93 mm et, dans l'appareil LKB ou BIORAD sur une hauteur de 120 mm.

Aussitôt après avoir coulé les gels de séparation, ajouter par dessus, avec beaucoup de précaution pour ne pas déformer la surface, une minuscule goutte de butanol. Ce dernier, grâce à ses propriétés tensio-actives, s'étale sous la forme d'un film très mince abritant ainsi de l'air la solution d'acrylamide et facilitant la polymérisation à la surface.

Lorsque la polymérisation est terminée (30 min), rincer soigneusement la surface du gel à l'eau désionisée pour éliminer le butanol.

Couler alors les gels de concentration (solution 4.3.3.2) en remplissant presque au maximum le volume restant des cellules. Placer aussitôt les peignes "slot formers" en évitant d'emprisonner des bulles. La hauteur des gels de concentration (distance entre la surface des gels de séparation et le bas des peignes) doit alors être de 10 mm (appareil DESAGA) ou de 15 mm (appareil LKB ou BIORAD). Lorsque la polymérisation est terminée (une heure) retirer avec précaution les peignes. Attention à la dépression dans les fentes pouvant entraîner la rupture des parois de séparation.

#### 4.6.- Électrophorèse

##### 4.6.1.- Dépôt des échantillons

Commencer par remplir les alvéoles des gels de tampon d'électrophorèse (§ 4.3.2). Prélever alors 12 µl de chaque extrait au moyen d'une micropipette, d'une microsiringue ou d'une siringue multicanaux et les déposer dans chacune des alvéoles, au travers du tampon. Les extraits, en raison de leur densité élevée (glycérol) se déposent ainsi plus régulièrement au fond des fentes.

Munir alors les cellules de leur joint d'étanchéité et les placer dans la cuve que l'on aura remplie de tampon (§ 4.3.2) (bac inférieur et bac supérieur).

##### 4.6.2.- Migration des protéines

Les dépôts ayant été effectués, connecter les tubes de circulation d'eau du bain-marie à la cuve d'électrophorèse et régler la température à 15°C.

Connecter les cordons électriques au générateur (borne reliée à l'électrode supérieure) et régler l'intensité à 30 mA (appareil DESAGA muni de ses quatre gels) ou à 20 mA (appareil LKB ou BIORAD munis de leurs deux gels de 1,5 mm d'épaisseur).

La migration s'effectue à l'intensité constante durant une nuit (17 heures). Les valeurs du voltage sont toujours très faibles au début et s'élèvent pour atteindre à la fin 50 volts environ (DESAGA) ou 150 volts environ (LKB ou BIORAD).

L'expérience doit être arrêtée après 17 heures de migration, ce qui se situe en principe une heure après la "sortie" du marqueur coloré pyronine. Démontez les cellules et démontez les gels.

#### 4.7.- Coloration

Les gels étant placés dans des bacs plastiques, ajouter 300 ml de fixateur (acide trichloracétique 15 %) pour chaque gel et laisser reposer 30 min sans agiter. Éliminer le fixateur et rincer le gel à l'eau désionisée.

Verser 400 ml de colorant (§ 4.3.4) et placer le bac dans l'étuve réglée à 80°C pendant 30 min. Laisser ensuite refroidir le bac 15 min à la température du laboratoire, éliminer le bain de colorant.

Verser 400 ml de solution de décoloration (§ 4.3.4) et placer le bac sur l'agitateur à balancement. Les bandes commencent alors à apparaître. Après 1 h 30 d'agitation, éliminer la solution et la remplacer par de l'eau désionisée dans laquelle la révélation se poursuit avec amélioration du contraste. Si l'on désire photographier les gels, utiliser un négatoscope.

#### 4.8.- Interprétation du diagramme

Le principe de la lecture des diagrammes est sensiblement différent de celui utilisé pour les électrophorèses conventionnelles des gliadines puisque les diagrammes renferment ici des constituants de haut poids moléculaire (gluténines), des gliadines et des albumines-globulines.

Par ailleurs, bien que la technique soit actuellement disponible pour l'étude des variétés de blé tendre, de blé dur, d'orge et de malt, aucune clé de détermination complète n'a encore été construite pour l'ensemble des variétés françaises. Dans l'attente de l'élaboration de ce document, quelques indications peuvent être fournies.

Dans le cas des blés, on a généralement intérêt à examiner les bandes de plus haut poids moléculaire gluténines (zone A) qui sont les plus

fines, pour un premier classement. Les groupes trouvés peuvent être ensuite subdivisés à partir des sous-unités gluténines suivantes (zone B) puis des gliadines (figure 4). Les bandes rapides (albumines) ne sont qu'exceptionnellement utilisables du fait de leur polymorphisme intervariétal très limité.

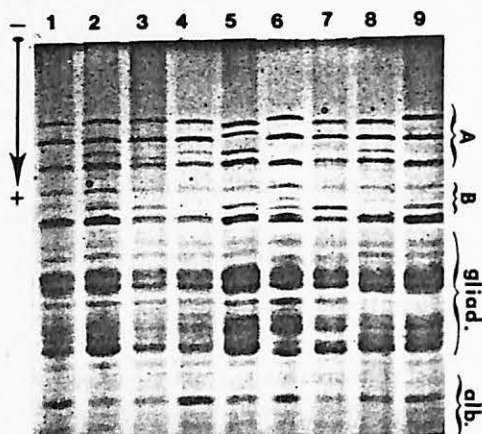


Figure 4  
Exemple d'électrophorégrammes en gel vertical de polyacrylamide-S.D.S. de quelques variétés de blé tendre :

- 1 : Hardi
- 2 : Favori
- 3 : Castan
- 4 : Arminda
- 5 : Wattines
- 6 : Top
- 7 : Capitole
- 8 : Moisson
- 9 : Ducat

Le diagramme des gluténines vient ainsi compléter celui des gliadines, ce qui permet dans de nombreux cas une différenciation de variétés apparaissant identiques après électrophorèse classique des gliadines (AUTRAN *et al.*, 1981 ; SHEWRY *et al.*, 1978). Cependant, vu la résolution plus faible de la région gliadine proprement dite, il arrive qu'inversement des variétés différenciables par électrophorèse des gliadines ne le soient pas à partir des diagrammes polyacrylamide-S.D.S. Il en résulte que, chez les blés tendres en raison du nombre élevé de variétés, il ne semble pas que la technique polyacrylamide-S.D.S. puisse être appliquée autrement qu'après une électrophorèse classique des gliadines (dans les cas où une identification précise s'imposerait). Par contre, chez les blés durs, il apparaît possible de différencier la plupart des variétés en une seule étape, en utilisant cette seule technique S.D.S.

Dans le cas des orges (figure 5) cette technique permet d'intéressantes possibilités de différenciation variétale (MONTEBAULT, 1982). L'interprétation proposée jusqu'ici repose sur une reconnaissance des types de diagrammes observés successivement dans les régions D (gluténines), C (C-hordéines) et B (B-hordéines). Un système informatisé d'identification fondé sur les sommes de mobilités des constituants a été également proposé (MONTEBAULT *et al.*, 1982). Par ailleurs, la technique s'applique indifféremment aux orges et aux malts avec, généralement, production de diagrammes identiques.

Les avantages et inconvénients du support polyacrylamide-S.D.S. pour l'électrophorèse des protéines de céréales ont été rassemblés dans le tableau 3.

Figure 5  
Exemple d'électrophorégrammes en gel vertical de polyacrylamide-S.D.S. de quelques variétés d'orge :

- 1 : Menuet
- 2 : Porthos
- 3 : Claret
- 4 : Carina
- 5 : Piroline
- 6 : Bérac
- 7 : Barberousse
- 8 : Sympa

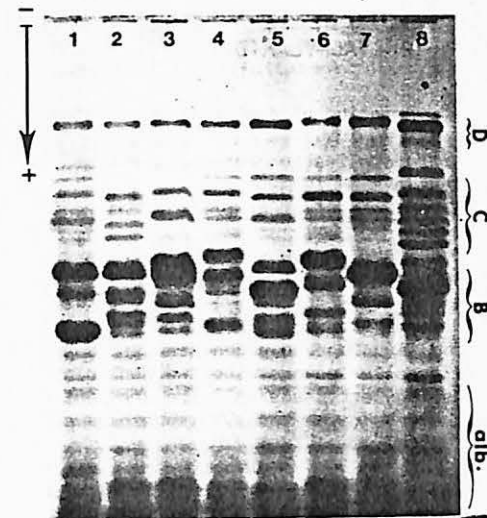


Tableau 2  
Avantages et inconvénients de la technique en gel de polyacrylamide-S.D.S. pour l'électrophorèse des protéines de céréales

Avantages	Inconvénients
Finesse des bandes, particulièrement des hauts poids moléculaires grâce au gel de concentration	Système lourd à mettre en œuvre (gels de concentration + gels de séparation)
Possibilité d'utiliser des gels très minces, donc de faible coût	Toxicité des solutions d'acrylamide non polymérisé et de l'acide trichloracétique
Grande sensibilité dans la détection des protéines (de très faibles quantités d'extraits suffisent pour obtenir un diagramme)	Migration longue : une nuit
Temps d'extraction des protéines très court	Gliadines proprement dites moins bien résolues qu'en électrophorèse classique : certaines variétés de blé tendre différenciables à partir des gliadines sont identiques en polyacrylamide-S.D.S.
Davantage de variétés sont différenciées grâce à la prise en compte du polymorphisme des gluténines	
Application possible aux orges et aux malts avec production de diagrammes généralement identiques	





## 5. ÉLECTROFOCALISATION DES PROTÉINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

### 5.1.- Principe et domaine d'application

L'électrofocalisation est une technique de séparation des protéines qui implique des équipements assez semblables à ceux de l'électrophorèse classique, mais dont le principe est entièrement différent.

Dans un gel d'électrophorèse, le pH est constant, et grâce à l'application d'un champ électrique, les molécules chargées telles que les protéines se déplacent dans le gel vers l'anode ou vers la cathode, selon leur charge propre au pH du gel. Au contraire, l'électrofocalisation est réalisée dans un gel à gradient de pH. C'est une méthode d'équilibre dans laquelle les protéines se déplacent et se répartissent selon leurs points isoélectriques (pI). Le gradient de pH est formé par migration de substances amphotères, disponibles dans le commerce, que l'on incorpore au gel.

Lorsqu'une protéine est introduite dans un tel gradient à un pH inférieur à son pI, elle acquiert une charge nette positive et migre donc vers la cathode, traversant des environnements de pH progressivement plus élevés lesquels, en retour, influencent son ionisation. La protéine se déplace donc jusqu'à ce qu'elle atteigne son pI, auquel elle présente une charge nette nulle. Elle s'arrête donc en ce point et, comme l'effet de focalisation agit contre l'effet de diffusion, les fractions séparées d'après leur pI pourront être concentrées en bandes très fines, avec une résolution qui ne peut normalement être atteinte en électrophorèse. En outre, comme c'est une méthode d'équilibre, dans la mesure où le gradient est bien établi et bien stabilisé, le système est auto-correcteur et donc, en principe, moins exigeant en termes de technique expérimentale.

L'électrofocalisation en gel de polyacrylamide peut être appliquée aux protéines (en particulier aux prolamines) extraites des grains de céréales. Elle a ainsi été proposée pour la différenciation des variétés d'orge et de malt par SCRIBAN et STROBBEL (1978).

L'analyse des prolamines au moyen de formules classiques de gels de polyacrylamide présente toutefois des difficultés en raison de la très faible charge nette de ces protéines, ce qui se traduit par un temps de focalisation relativement long (en comparaison de celui des albumines-globulines ou des protéines animales) et souvent plus long que le temps pendant lequel le gradient de pH peut être maintenu. La méthode que nous décrivons ici permet de surmonter cette difficulté grâce à l'emploi d'un gel à larges pores obtenu à partir d'un nouvel agent de pontage (NN'-diallyltartardiamide) des chaînes de polyacrylamide, mais avec toutefois l'inconvénient de donner des gels plus fragiles.

### 5.2.- Appareillage

Même appareillage que pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (§ 3.2) à l'exception de l'alimentation (qui doit être ici du type 2 000 V - 150 mA, avec si possible régulation en voltage, intensité et puissance) et de la cuve.

La cuve d'électrofocalisation peut être du type Multiphor (LKB) ou FBE 3000 (PHARMACIA), avec accessoires : moules, joints, mèches, etc.

### 5.3.- Réactifs

Il est important, notamment pour la qualité des diagrammes, que toutes les solutions soient préparées avec de l'eau parfaitement désionisée ou distillée.

#### 5.3.1.- Solution d'extraction des prolamines

On utilise le chloro-2-éthanol à 25 % dans l'eau (cf. § 3.3.1).

#### 5.3.2.- Solution de préparation du gel de polyacrylamide à gradient de pH

**ATTENTION : LES SOLUTIONS D'ACRYLAMIDE (NON POLYMERISE) SONT TRÈS TOXIQUES. EVITER TOUTE MANIPULATION AVEC LES MAINS NUES. EN CAS DE CONTACT, LAVER ABONDAMMENT A L'EAU.**

Dissoudre 3,06 g d'acrylamide, 0,54 g de NN'-diallyltartardiamide, 7,20 g d'urée dans 49 ml d'eau distillée. Rajouter 40 µl de TEMED, 1 ml d'ampholytes pH 5-7 et 1 ml d'ampholytes pH 7-9 (les ampholytes peuvent être du type Ampholine R (LKB), Pharmalyte R (PHARMACIA) ou Servalyt R (SERVA)).

Au moment de couler le gel, ajouter et dissoudre rapidement 20 mg de cristaux de persulfate d'ammonium.

#### 5.3.3.- Solutions des mèches à électrodes

Acide phosphorique 1 M (pour le côté anode).  
Hydroxyde de sodium 1 M (pour le côté cathode).

#### 5.3.4.- Solutions de coloration des prolamines

On utilise successivement un fixateur qui est l'acide trichloracétique à 12 % dans l'eau et un colorant préparé au moment de l'emploi en dissolvant 250 mg de Bleu de Coomassie BBR 250 ou de Violet de Coomassie R 150 dans 25 ml d'éthanol à 40 %, en filtrant et en amenant à 1 000 ml avec de l'acide trichloracétique à 12 %.

### 5.4.- Extraction des protéines

Mêmes conditions que ci-dessus (§ 4.4).

### 5.5.- Préparation du gel

Préparer le moule à gel : plaques de verre avec joint caoutchouc, maintenu par des pinces.

Couler la solution décrite au § 5.3.2 dès la dissolution du persulfate d'ammonium, de manière à remplir le moule et en évitant la présence de bulles. Refermer le joint. Après la polymérisation, qui intervient en quelques minutes. Laisser reposer le gel au minimum une heure avant de le démouler.

Démouler le gel et le placer, avec la plaque de verre qui le supporte, sur le bloc de refroidissement de la cuve d'électrofocalisation.

## 5.6.- Electrofocalisation

### 5.6.1.- Dépôt des échantillons

Déposer sur le gel, en s'aidant d'une pince, des rectangles de papier Whatman n°3, 8 x 4 mm, imbibés des extraits protéiques (§ 5.4). Les dépôts seront effectués selon une ligne, parallèle au grand côté de la plaque de gel, à une distance d'environ 20 mm du bord à relier à l'anode.

### 5.6.2.- Focalisation des protéines

Préparer deux mèches de papier absorbant, découpées à la longueur du gel. Imbiber ces mèches, l'une d'acide phosphorique 1 M, l'autre d'hydroxyde de sodium 1 M (§ 5.3.3) et les placer aux extrémités du gel, respectivement à l'emplacement des électrodes positive et négative.

Placer le couvercle porte-électrodes, le couvercle de protection, relier les fils à l'alimentation et mettre en route la circulation d'eau (température réglée à 7°C).

Régler l'intensité, la puissance et le voltage de l'alimentation aux valeurs de 50 mA, 30W, 1 000 V, respectivement. Comme l'intensité du courant est très élevée au début, puis décroît progressivement au cours de l'établissement du gradient de pH, jusqu'à une valeur très faible en fin d'expérience, on aura ainsi trois phases dans la régulation :

- 1)  $I = \text{cte}$  ( 50 mA ) avec augmentation de V jusqu'à 600 V ;
- 2)  $P = \text{cte}$  ( 30 W ) avec diminution de I et augmentation de V jusqu'à 1 000 V ;
- 3)  $V = \text{cte}$  ( 1 000 V ) avec diminution de I et de W.

La durée totale de la focalisation est habituellement de 2 h 30. Il est à noter qu'on peut dans certains cas utiliser une préfocalisation (30 min), n'effectuer le dépôt des échantillons qu'après établissement du gradient et laisser focaliser 2 h. On peut aussi améliorer sensiblement la résolution en retirant les papiers Whatman lorsque les échantillons sont entrés dans le gel (environ 60 min après le dépôt) et poursuivre l'expérience encore 110 min.

### 5.7.- Coloration

A la fin de l'expérience, retirer les mèches de papiers et transférer le gel (avec son support de verre) dans un bac d'acide trichloracétique à 12 %. En quelques minutes, des bandes blanches apparaissent et sont particulièrement visibles sur fond noir avec un éclairage rasant ; le gel peut, à ce stade, être photographié.

Si l'on désire colorer le gel on renouvellera au moins trois fois le bain d'acide pour éliminer au maximum les ampholytes et on immergera le gel dans le colorant (§ 5.3.4). Contrairement au Bleu de Coomassie, le Violet de Coomassie peut en principe être utilisé immédiatement, sans élimination des ampholytes. La coloration est toutefois meilleure lorsque les ampholytes ont été lavées.

On peut noter que les solutions de Violet de Coomassie sont instables en milieu trichloracétique, mais la rapidité de fixation de ce colorant

sur les protéines (supérieure à celle du Bleu de Coomassie) lui permet d'agir avant de précipiter.

### 5.8.- Interprétation du diagramme

La technique décrite ici permet l'analyse par électrofocalisation des protéines (principalement des prolamines) extraites du blé ou de l'orge et conduit à une très grande finesse de résolution des constituants.

Figure 6  
Exemples de diagrammes d'électrofocalisation en gradient de pH 5-9 des protéines du blé, variétés :  
1 : Champain  
2 : Florent  
et de l'orge, variétés :  
3 : Bérac  
4 : Sonja



Tableau 4  
Avantages et inconvénients de la technique d'électrofocalisation pour l'analyse des prolamines de céréales

Avantages	Inconvénients
En principe, diagramme indépendant du point de dépôt des échantillons, système auto-correcteur, peu exigeant en termes de technique expérimentale	Nécessité de disposer d'une alimentation très performante et d'une cuve spéciale
Très haute résolution des constituants due à l'effet de focalisation	Relative instabilité du gradient de pH dans les régions basiques, d'où une dérive des bandes et des problèmes de répétabilité des diagrammes dans ces régions
Grande sensibilité dans la détection des bandes	En raison du caractère très faiblement chargé des prolamines, la focalisation peut ne pas être terminée avant le début de la dérive du gradient. D'où la nécessité d'une formule de gel à larges pores et donc fragile et difficile à manipuler
Temps d'expérience (extraction et focalisation) très court	Coût élevé des ampholytes
Possibilités intéressantes de différenciation des variétés d'orge	Instabilité du colorant en présence des ampholytes
	Possibilités de différenciation de variétés de blé assez limitées

En ce qui concerne les possibilités offertes pour l'identification des variétés, il a été montré (AUTRAN *et al.*, 1981) que l'électrofocalisation des gliadines, malgré la très haute résolution obtenue (*figure 6*) ne permettait pas de différencier des variétés très apparentées génétiquement et ne s'avérait donc pas plus utile que l'électrophorèse en gel d'amidon ou de polyacrylamide pour résoudre les cas où la différenciation est délicate. Par contre, dans le cas des orges (*figure 6*), l'électrofocalisation des hordéines présente des possibilités beaucoup plus intéressantes (SCRIBAN *et al.*, 1979), qui ne semblent pas supérieures à celles de l'électrophorèse en présence de S.D.S. (MONTEBAULT, 1982), mais qui ont permis de construire une clé de détermination des variétés françaises (SCRIBAN et STROBBEL, 1978).

Les avantages et inconvénients de la technique d'électrofocalisation pour l'analyse des prolamines de céréales ont été rassemblés dans le tableau 4.

## 6.- RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME. Fractionnement de protéines de type gliadine par électrophorèse en gel d'amidon en vue de l'identification variétale. Norme AFNOR NF V 03-715, 1981, p. 1-11.

AUTRAN J.C., 1975. Nouvelles possibilités d'identification des variétés françaises de blé par électrophorèse des gliadines du grain. *Ind. Agric. Alim.*, 9-10, 1075-1094.

AUTRAN J.C., 1979. Manuel d'instructions sur la technique d'identification des variétés de blé par électrophorèse des gliadines. Document I.N.R.A., 1-53.

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, n°3, 277-301.

AUTRAN J.C., BERRIER R., JEANJEAN M.F., JOUDRIER P., KOBREHEL K., 1981. Emplois de l'électrophorèse dans la filière "Céréales" - Possibilités et limites actuelles. *Industries des Céréales*, 8, 3-19.

BUSHUK W., ZILLMAN R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams, I : Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.*, 58, 505-515.

KONAREV V.G., GAVRILYUK I.P., GUBAREVA N.K., 1977. Gliadin polymorphism and its use in identifying varieties and registration of genetic resources with regard to wheat and other cereals. *Vestn. S-kh. Nauki*, 7, 84-93.

LAEMLI V.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 54, 588-596.

LAURIERE M., MOSSE J. Polyacrylamide gel-urea electrophoresis of cereal proteins at acidic pH. *Analyt. Biochem.*, 122, 20-25.

MONTEBAULT A., 1982. Etude biochimique et génétique des protéines de l'orge. Application à l'identification des variétés d'orge et de malt. Thèse Univ. Montpellier, 1-155.

MONTEBAULT A., AUTRAN J.C., JOUDRIER P., MOLL M. Varietal identification of barley and malt. *J. Inst. Brew.* (sous presse).

PAYNE P.I., CORNFIELD K.G., 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins isolated by gel filtration in dissociating medium. *Planta*, 145, 83-88.

SCRIBAN R., STROBBEL B., 1978. Etude chimiotaxonomique de l'orge et du malt par électrofocalisation sur gel. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 287, n°8, 641-642.

SCRIBAN R., AUTRAN J.C., STROBBEL B., NICOLAIDIS M., 1979. Synthèse préliminaire des différentes recherches analytiques sur la chimiotaxonomie des orges et des malts. *Bios*, 10, n°6, 80-87.

SHEWRY P.R., FAULKS A.J., PRATT H.M., MIFLIN B.J., 1978. The varietal identification of single seeds of wheat by S.D.S. polyacrylamide gel electrophoresis of gliadin. *J. Sci. Food Agric.*, 29, n°10, 847-849.

TKACHUK R., METLISH V.J., 1980. A rapid voltage gel electrophoresis technique for characterizing wheat gliadins. Workshop on the physico-chemical properties of wheat gluten proteins, April 28-30, Nantes. *Ann. Technol. Agric.*, 29, n°2, 207-212.

WRIGLEY C.W., 1980. Improving Australian wheat quality, by varietal management : identification of varieties. *Food Technol. Aust.*, 32, 508-511.