

ou

ELECTROFOCALISATION DES PROTEINES DE RESERVE HAUTEMENT
AGREGATIVES DU BLE

(M.H MOREL et J.C. AUTRAN)

Laboratoire de Technologie des Céréales
INRA
2 place Viala 34060 Montpellier cedex 1

INTRODUCTION

Gliadines et gluténines constituent les protéines de réserve du grain de blé (*Triticum durum* Desf.). Contrairement aux gliadines qui sont des protéines monomériques, les gluténines forment des agrégats de tailles élevées qui ne peuvent être résolus en PAGE natif. Après réduction, les unités gluténines de haut poids moléculaire sont identifiées en PAGE-SDS, alors que les gluténines de faible poids moléculaire (LMWG) restent confondues avec les gliadines. Gliadines et gluténines de faible poids moléculaire se distinguent par leur pH isoélectrique. Cependant, la focalisation des LMWG par les méthodes classiques d'électrofocalisation horizontale reste médiocre en raison de leur caractère très basique et de leur grande sensibilité aux oxydants.

Pour limiter au mieux la dérive du gradient de pH et maintenir les LMWG à l'état réduit, nous avons adopté l'utilisation de gels d'acrylamide lavés, séchés puis réhydratés en présence d'un réducteur de thiols, d'urée et d'ampholytes selon une méthode dérivée de K. Altland (1).

MATERIELS ET METHODES

Les gels (23x12x0.02 cm), sont préparés par emprisonnement de la solution d'acrylamide (T=5%, C=3%) entre deux plaques de verre dont l'une supporte une feuille de polyester activé (Gel-Fix, SERVA). Après polymérisation, le gel est lavé 3 X 10 min dans un bain d'eau distillée puis 1 x 30 min dans une solution de glycérol 10% (W/V). Après une nuit de séchage, les gels sont réhydratés par 15 ml d'une solution d'urée 4M ou 8M, d'ampholytes 4-6.5 et 6.5-9 (Pharmalytes à 2% (W/V) final, Pharmacia) et de dithio-1,4-érythritol (DTE).

L'électrofocalisation est menée à 13°C à l'aide du Multiphor 2117, LKB. De l'acide glutamique 40 mM et de la soude 1 M sont utilisés comme électrolytes ; après une préfocalisation de 400 VH à 7 W constants, l'électrophorèse se poursuit pendant 2000 VH puis 1500 VH à 2800 V constants (durée totale 2 H et 45 min). Les protéines du blé sont solubilisées par un mélange d'acétonitrile 50% et de mercapto-éthanol 10% ; les dépôts sont réalisés du côté acide du gel.

Pharmacia Actualité, 1989

RESULTATS et DISCUSSIONS

1-Effet du dithio-1,4- érythritol.

En l'absence d'agent réducteur dans le milieu de réhydratation, des traînées sont observées du côté basique du gel (Fig. 1, A). L'addition de DTE 5 mM, permet de révéler la présence des LMWG (Fig. 1,B) qui sont complètement focalisées lorsque la concentration en DTE atteint 50 mM (Fig. 1, C). De toute évidence, les gels séchés puis réhydratés présentent une activité oxydante qui conduit à l'agrégation des LMWG, mais qui peut être éliminée par l'adjonction d'un réducteur au milieu de réhydratation. K. Altland, a déjà souligné l'apparition d'une activité oxydante pendant le séchage de gels d'Immobilines (1) ; activité qui provoque la formation d'une liaison covalente disulfure entre globines humaines au cours de la focalisation (2).

2-Utilisation des gels d'électrofocalisation pour l'établissement de diagrammes bidimensionnels.

Le diagramme bidimensionnel est réalisé en combinant l'électrofocalisation à une électrophorèse PAGE-SDS selon U.K. Laemmli (3). Après l'électrofocalisation, le gel est découpé en bandes de 12x.8 cm qui peuvent être stockées à - 80 °C sans altération. Lors de l'utilisation, les bandes sont équilibrées dans un tampon Tris-glycine 50 mM pH 6.8, SDS 2% et saccharose 10% (W/V) puis légèrement enfoncées dans le gel de concentration. L'ensemble des opérations (électrofocalisation + PAGE-SDS) peut être réalisé dans la même journée.

La durée d'équilibration du gel d'électrofocalisation est critique : en deçà de 1 min 30 s les protéines ne sont pas complètement saturées en SDS et leur migration est ralentie par rapport au témoin (Fig. 2, A et B); mais après 2 min d'équilibration de nombreux spots ne sont plus révélés par le bleu de Coomassie (Fig. 2, C). En routine, nous réalisons un compromis en équilibrant le gel 1 min et 15 s (Fig. 2, D).

3-Analyse intervariétale des LMWG de *Triticum durum* Desf.

La figure 3 présente les diagrammes d'électrofocalisation de quelques variétés de blé dur. Si l'on s'intéresse à la région la plus basique du diagramme, deux groupes peuvent être distingués : certaines variétés possèdent un quadruplet de protéines basiques (LMWG-1), alors que les autres possèdent un triplet (LMWG-2). Ces deux groupes de variétés correspondent aux variétés de type gamma gliadine 42 et gamma gliadine 45 ; cette dernière étant utilisée comme marqueur de la qualité technologique du blé dur (4). Ces deux gliadines, protéines allèles codées au niveau du locus Gli-B1 sont génétiquement associées aux deux groupes de LMWG 1 et 2 (5).

D'après les études densitométriques que nous avons menées, les LMWG-2 représentent 32% des protéines extraites par notre solvant contre 22% pour les LMW-1. C'est la protéine la plus basique du groupe des LMWG-2 qui est quantitativement la plus représentée. Cette protéine pourrait être responsable de la meilleure qualité viscoélastique du gluten des variétés de type 45. Et ce d'autant plus, que compte tenu des similitudes de pHi et de poids moléculaires révélés par l'analyse bidimensionnelle, les deux protéines les plus acides des deux groupes semblent identiques (Fig. 4).

Figure 1 : Effet du DTE sur l'électrofocalisation des protéines du blé.

La solution de réhydratation comprend les ampholytes, l'urée 4M et : 0 mM de DTE (A) ; 5 mM de DTE (B) ; 50 mM de DTE (C).

Figure 2 : Diagrammes bidimensionnels des protéines du blé : effet du temps d'incubation des gels d'électrofocalisation dans le tampon d'équilibration.

Les gels d'électrofocalisation sont incubés en Tris-glycine 50 mM, pH 6.8, SDS 2% (W/V) et saccharose 10% pendant : 45 s (A) ; 1 min 35 s (B) ; 2 min s (C) ; 1 min 15 s (D).

Figure 3 : Electrofocalisation des protéines de réserve de quelques variétés de blés durs (*Triticum durum* Desf.).

Les protéines sont solubilisées et analysées par électrofocalisation selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes. De gauche à droite on distingue : Agathé (type 45) ; Mondur (type 45) ; Alpidur (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Pastour (type 45) ; Kidur (type 42) ; Arcour (type 45) ; Cando (type 42) ; variété en cours de sélection (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Kidur (type 42) et Tomclair (type 42).

Figure 4 : Diagrammes bidimensionnels des variétés Agathé (type 45, LMWG-2) et Calvinor (type 42, LMWG-1).

Les diagrammes sont réalisés en combinant l'électrofocalisation (Matériels et Méthodes) des protéines avec une électrophorèse PAGE-SDS (T=9 %, C = 2.8%) selon U.K. Laemmli. Variétés présentées: Agathé (type 45) (A); Calvinor (type 42) (B). Les flèches pleines indiquent les deux composés homologues des groupes LMW-1 et LMW-2.

(1) Altland K. et Rosmann U. *Electrophoresis* 1985, 6, 314-325

(2) Altland K., Becher P., Rossmann U. et Bjellqvist B. *Electrophoresis* 1988, 9, 474-485.

(3) Laemmli U.K. *Nature* 1970, 227, 680-685.

(4) Damidaux R., Autran J.C., Grignac P. et Feillet P. C. R. *Acad. Sci. Paris* 1978, série D, 287, 701-704.

(5) Payne P.I., Jackson E.A. et Holt L.M. *J. Cereal Sci.* 1984, 2, 73-81.

88-5-1

88-2-88

4-2-88

A

B

C

Figure 1 : Effet du DTE sur l'électrofocalisation des protéines du blé.
La solution de réhydratation comprend les ampholytes, l'urée 4M et : 0 mM de DTE (A) ; 5 mM de DTE (B) ; 50 mM de DTE (C).

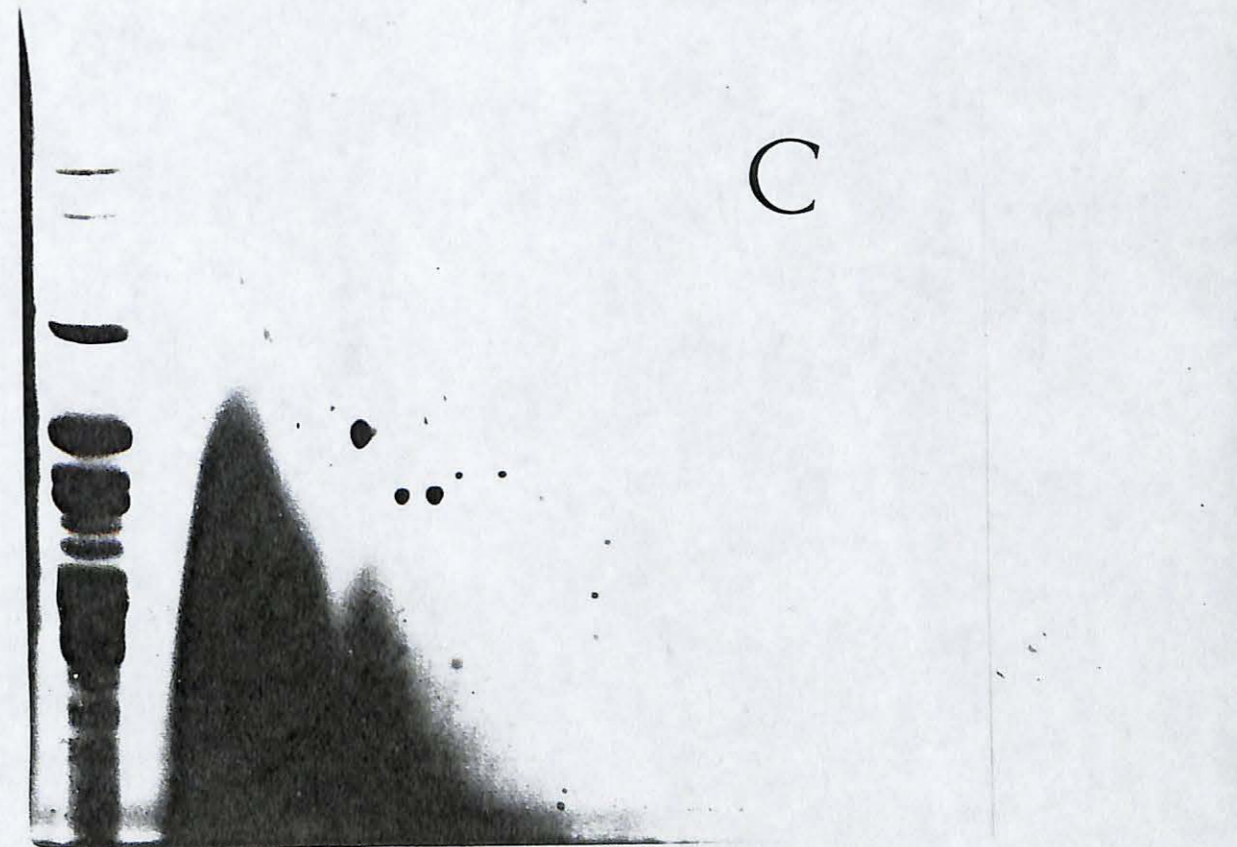
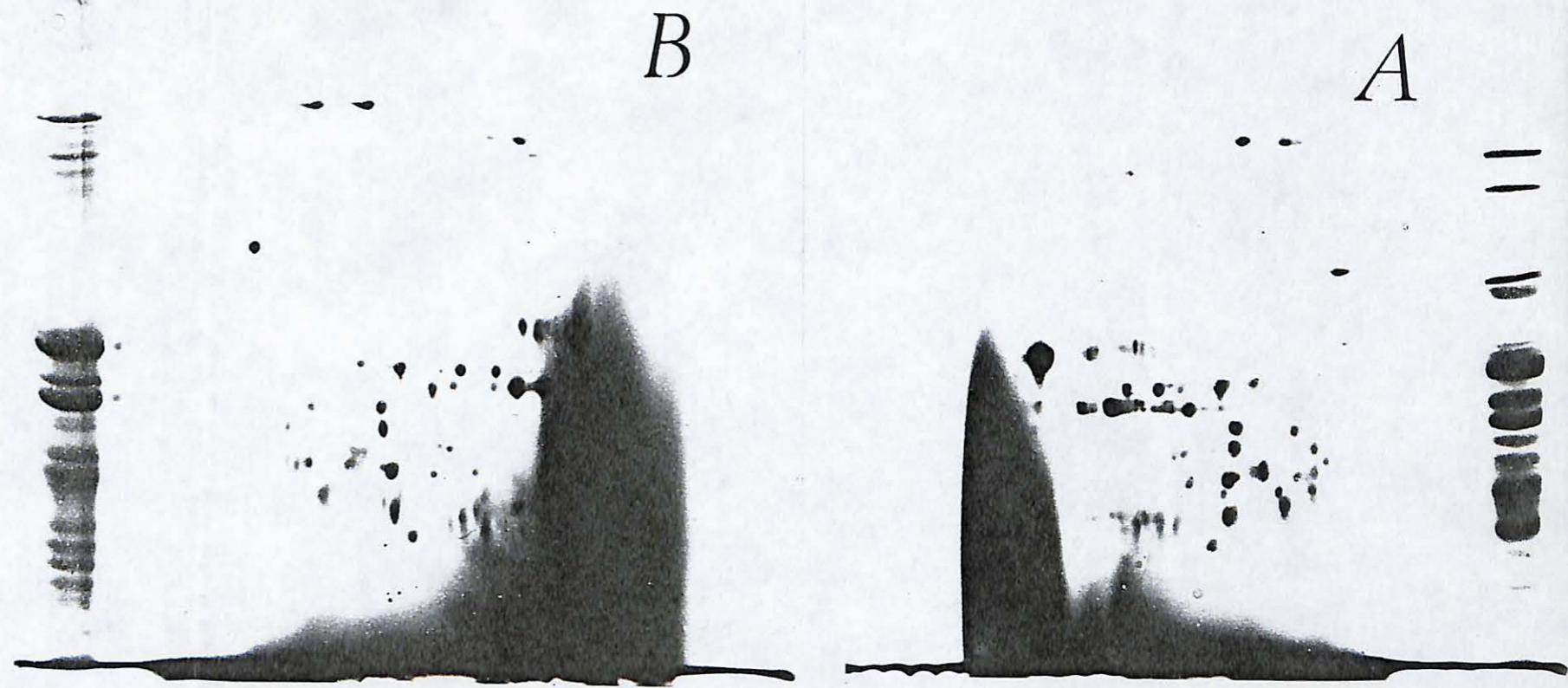
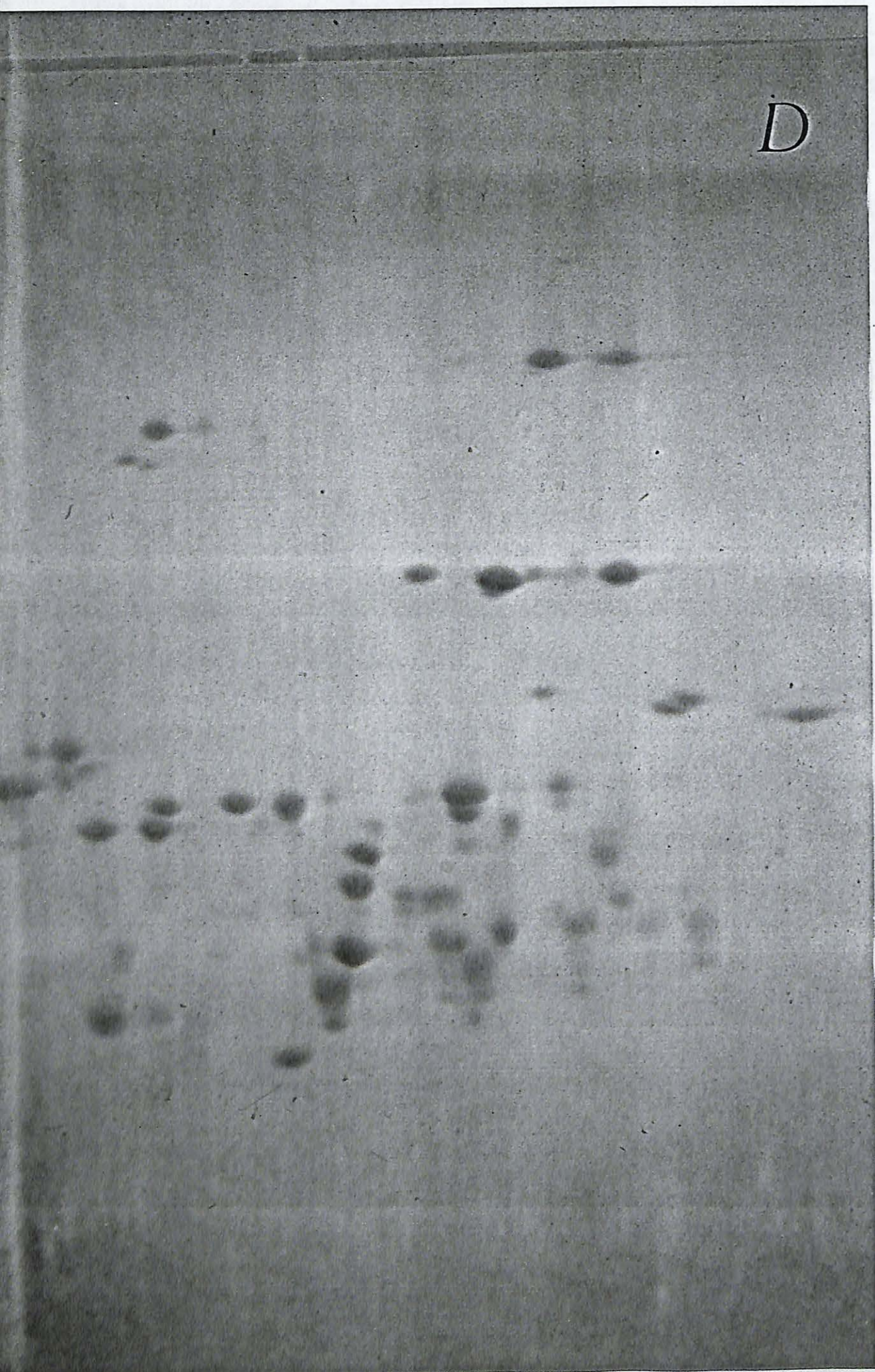


Figure 2 : Diagrammes bidimensionnels des protéines du blé : effet du temps d'incubation des gels d'électrofocalisation dans le tampon d'équilibration.

Les gels d'électrofocalisation sont incubés en Tris-glycine 50 mM, pH 6.8, SDS 2% (W/V) et saccharose 10% pendant : 45 s (A) ; 1 min 35 s (B) ; 2 min s (C) ; 1 min 15 s (D).

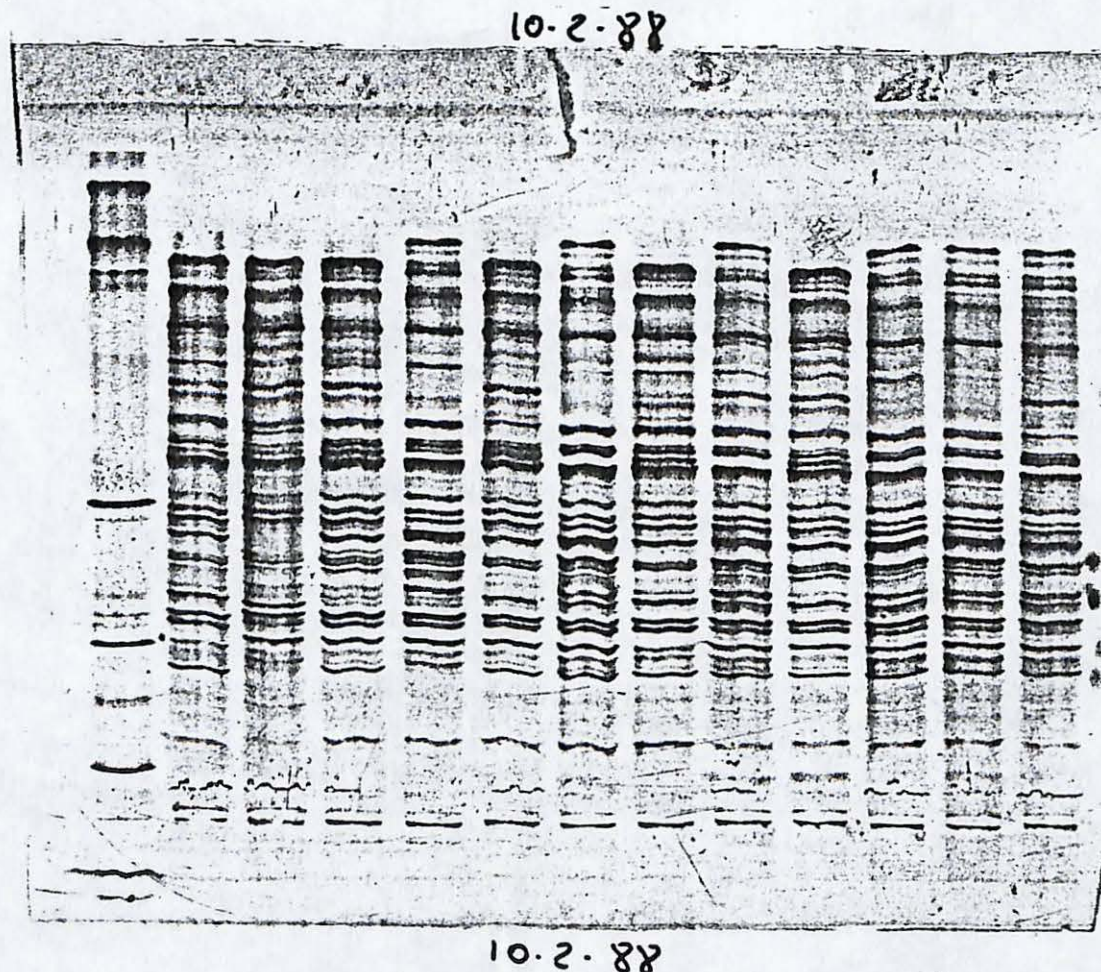


Figure 3 : Electrofocalisation des protéines de réserve de quelques variétés de blés durs (*Triticum durum* Desf.).

Les protéines sont solubilisées et analysées par électrofocalisation selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes. De gauche à droite on distingue : Agathé (type 45) ; Mondur (type 45) ; Alpidur (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Pastour (type 45) ; Kidur (type 42) ; Arcour (type 45) ; Cando (type 42) ; variété en cours de sélection (type 45) ; variété en cours de sélection (type 42) ; Kidur (type 42) et Tomclair (type 42).

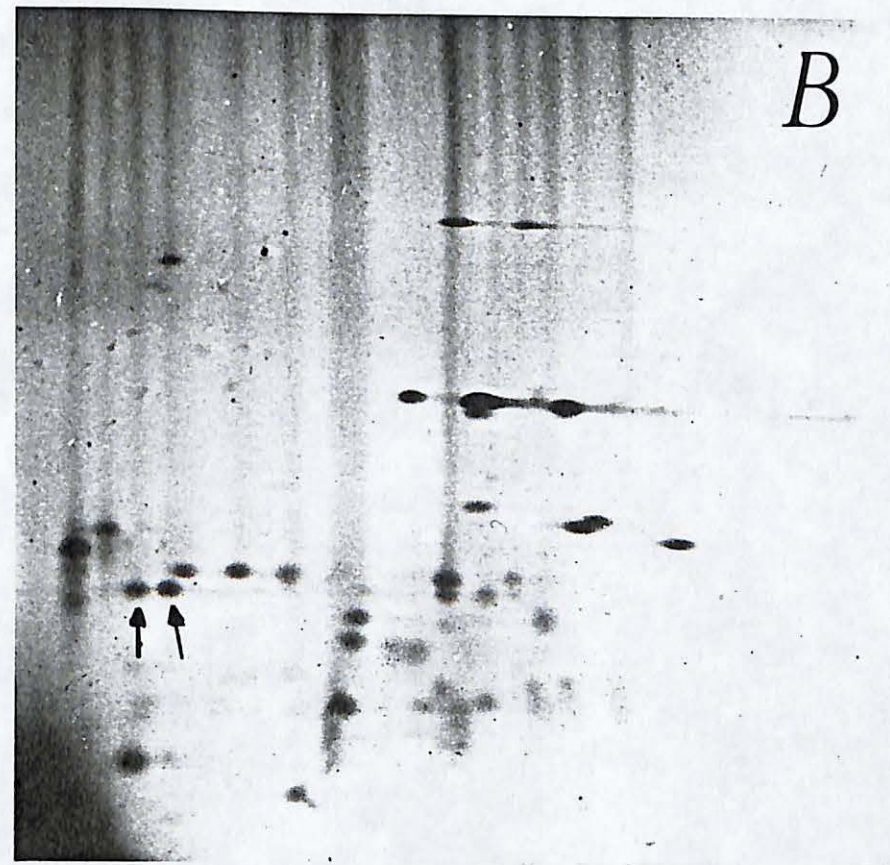
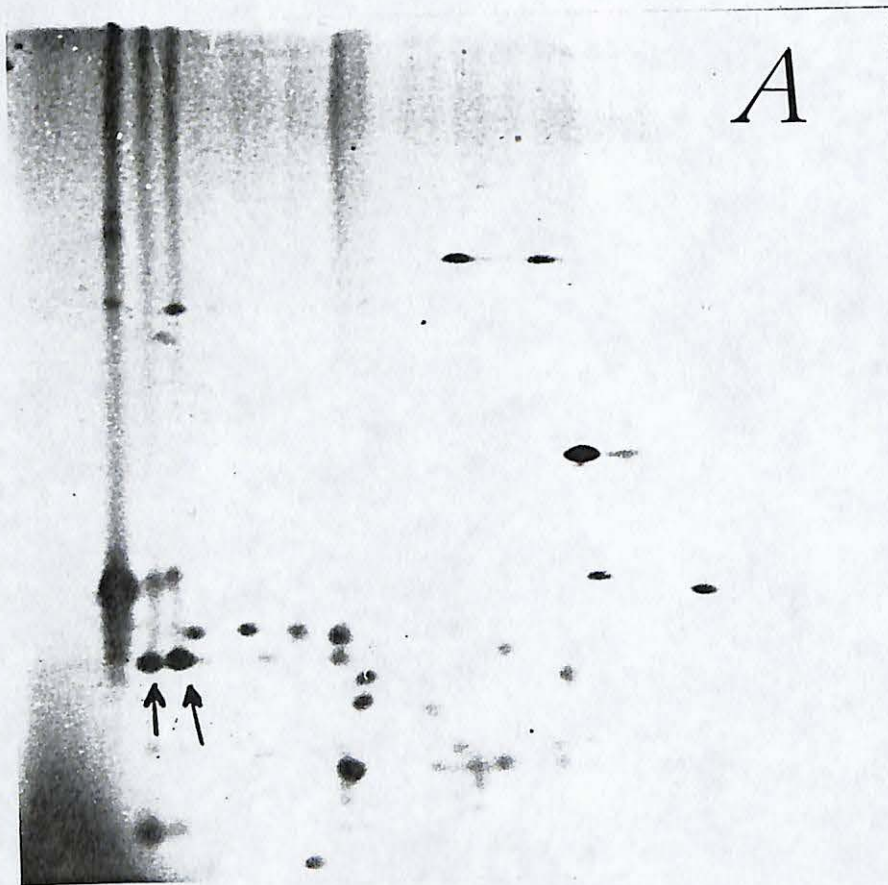


Figure 4 : Diagrammes bidimensionnels des variétés *Agathé* (type 45, LMWG-2) et *Calvinor* (type 42, LMWG-1).

Les diagrammes sont réalisés en combinant l'électrofocalisation (Matériels et Méthodes) des protéines avec une électrophorèse PAGE-SDS (T=9 %, C = 2.8%) selon U.K. Laemmli. Variétés présentées: *Agathé* (type 45) (A); *Calvinor* (type 42) (B). Les flèches pleines indiquent les deux composés homologues des groupes LMW-1 et LMW-2.