

# Caractérisation biochimique et fonctionnelle des gluténines du blé tendre par chromatographie d'échange de cations. Relation avec les caractéristiques technologiques de la pâte

Valérie MELAS, Jean-Claude AUTRAN

**SUMMARY** Biochemical and functional characterisation of soft wheat glutenins by cation exchange chromatography. Relation with the technological properties of dough.

Low-(LMW-GS) and high-molecular weight (HMW-GS) glutenin subunits of common wheat were reduced and alkylated, then separated according to their electric charge by cation-exchange chromatography (IE-FPLC) and characterised by electrophoresis. By combining these two methods, two new HMW-GS (1Ax1\*\* and 1Bx6\*) were discovered. LMW-GS were characterised on the basis of their charge distribution in IE-FPLC and a charge index (IC) could be worked out for each variety. IC was found to be associated with the allelic composition of common wheat varieties and with the dough characteristics. To a certain extent, positive IC values reflect a favorable effect of the *Glu-A3-o* allele on dough extensibility (G), whereas negative IC values reflect a favourable effect of the *Glu-A3-m* allele on baking strength. The model according to which LMW-GS would not act as simple genetic markers but could interact in the gluten proteic network is discussed.

**Key-words :** wheat, glutenin, chromatography, functional property, dough.

## RÉSUMÉ

Les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM) et de haut poids moléculaire (SG-HPM) du blé tendre, après réduction et alkylation, ont été séparées selon leur charge par chromatographie d'échange de cations (IE-FPLC) et caractérisées par électrophorèse. La combinaison de ces deux méthodes a permis de découvrir deux nouvelles SG-HPM (1Ax1\*\* et 1Bx6\*). Les SG-FPM ont pu être caractérisées par leur distribution de charge en IE-FPLC et un index de charge (IC) a été établi pour chacune des variétés. Dans une certaine mesure, IC est apparu associé à la composition allélique des variétés de blé tendre et aux caractéristiques de la pâte. L'effet favorable de l'allèle *Glu-A3-o* sur l'extensibilité de la pâte (G) semble correspondre à un IC positif et l'effet favorable de l'allèle *Glu-A3-m* sur la force boulangère à un IC négatif. Le modèle selon lequel les SG-FPM ne seraient pas de simples marqueurs génétiques mais pourraient interagir dans le réseau protéique du gluten, est discuté.

**Mots clés :** blé, gluténine, chromatographie, propriété fonctionnelle, pâte.

---

## 1 - INTRODUCTION

---

Le blé est la céréale la plus anciennement cultivée et la plus largement répandue dans le monde. Sa culture et son utilisation en tant qu'aliment sont à l'origine de la plupart des civilisations. Bien que l'utilisation du blé remonte à l'origine des temps, on ne connaît toujours pas les raisons exactes qui font que la farine de blé soit capable de former un *gluten*, dont les propriétés viscoélastiques sont uniques dans le règne végétal. Par contre, il est admis que c'est le gluten, et plus particulièrement les protéines qui le constituent, qui est à l'origine des propriétés fonctionnelles de la pâte. Parmi ces protéines, il est bien établi que les gluténines ont une influence prépondérante sur les propriétés de ténacité et d'élasticité d'une pâte.

Les gluténines sont des protéines polymériques dont les chaînes polypeptidiques peuvent être regroupées en deux classes : les sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM, de poids moléculaire apparent compris entre 95 000 et 130 000) et les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM, de poids moléculaire apparent compris entre 30 000 et 50 000). Ces dernières représentent une classe importante (environ 70 % des gluténines et 20 à 30 % des protéines totales), mais qui demeure la plus mal connue parmi les protéines du blé (MELAS *et al.*, 1993). Les premiers travaux sur les sous-unités gluténines ont en effet porté presque exclusivement sur les SG-HPM, PAYNE *et al.* (1979) ayant mis en évidence leur variation allélique et leur importance technologique dans le cadre des techniques de panification anglo-saxonnes. Des travaux français (BRANLARD et DARDEVET, 1985 ; BRANLARD, 1987) ont également montré la diversité des SG-HPM dans l'explication des différences génétiques de la qualité appréciées par le test de l'alvéographe, résultats qui ont été intégrés par la plupart des sélectionneurs français de blé. Toutefois, en raison de la spécificité des technologies de panification françaises ou sud-ouest européennes, ainsi que de la nécessité de mieux maîtriser l'extensibilité des pâtes boulangères et biscuitières, il est rapidement apparu que l'extrapolation des travaux de PAYNE aux blés français ne permettait pas une prévision satisfaisante des paramètres de la qualité. L'étude des autres fractions du gluten et particulièrement des SG-FPM s'avérait donc indispensable.

Les résultats de nos autres travaux (MELAS, 1994) et les études menées par d'autres auteurs (GUPTA et SHEPHERD, 1987 ; GUPTA *et al.*, 1990 a, b) montrent qu'il existe une relation entre la composition en SG-FPM et les paramètres de la qualité d'une pâte. On est donc amené à se demander sur quelles bases physico-chimiques s'appuient les relations observées. Pour essayer de répondre à cette question, une étude approfondie de ces protéines a été entreprise. Les méthodes traditionnelles de séparation (fondées sur les différences de taille ou d'hydrophobicité des molécules) ayant déjà été largement exploitées, c'est vers l'étude de la charge des molécules que le présent travail a été orienté. La connaissance de la charge d'une SG-FPM permet en effet d'émettre des hypothèses sur la nature des liaisons qu'elle forme avec d'autres SG-FPM et/ou SG-HPM et sur son rôle dans la structure du réseau protéique qu'est le gluten (KHAN et BUSHUK, 1979 ; GRAVELAND *et al.*, 1985 ; KASARDA, 1989 ; GAO *et al.*, 1992).

Un protocole d'étude de la distribution de charge des gluténines à l'aide d'une colonne échangeuse de cations ("ion-exchange fast protein liquid chromatography", ou IE-FPLC) a été mis au point, avec caractérisation des fractions obtenues par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE). Grâce à cette nouvelle approche, la distribution de charge des protéines correspondant aux principaux allèles SG-FPM et à certains allèles SG-HPM a été déterminée. Afin d'explorer l'hypothèse d'un rôle fonctionnel des SG-FPM, on a cherché à établir la relation pouvant exister entre la distribution de charge des SG-FPM et les paramètres de la qualité boulangère des blés.

---

## 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

### 2.1 Matériel végétal

L'étude des gluténines a été réalisée à partir de 22 variétés françaises de blé tendre dont les caractéristiques technologiques, particulièrement les valeurs moyennes des paramètres de l'alvéographe Chopin : *W* et *G* ont été fournies par le Groupement d'étude des variétés et des semences (tabl. 1). *W* représente le travail de déformation de la pâte et *G* le gonflement, qui traduit l'extensibilité de la pâte.

La composition en "blocs alléliques" des blés français a été déterminée à partir de celle de blés italiens (MOREL, communication personnelle), dont la variation aux loci *Gli-A1*, *Gli-B1* et *Gli-D1* avait été elle-même déterminée par POGNA et METAKOVSKY (Istituto sperimentale cerealicoltura, San Angelo Lodigiano) sur la base de la nomenclature de METAKOVSKY (1991). On rappelle que les loci *Gli-1* (codant pour les gliadines  $\gamma$  et  $\omega$ ) et *Glu-3* (codant pour les SG-FPM) sont adjacents et que, dans le blé tendre, il n'existe qu'un très faible pourcentage de recombinaison (SINGH et SHEPHERD, 1988) entre ces 2 loci pour le chromosome 1B, aucune recombinaison n'ayant été détectée pour les chromosomes 1A et 1D. La connaissance de la variation à chacun des loci *Gli-1* permet ainsi de déduire la variation aux loci *Glu-3* correspondants. Enfin, les loci *Glu-1* codent pour les SG-HPM.

### 2.2 Méthodes expérimentales

#### 2.2.1 Extraction séquentielle des protéines

Cette extraction a été réalisée selon la méthode de SINGH *et al.* (1991), avec les solutions suivantes :

- Solution A : isopropanol 1 = 1, v = v ;
- Solution B : isopropanol 1 = 1, v = v, Tris-HCl 0,08 M, pH 8.

L'extraction, la réduction et l'alkylation ont été réalisées dans une enceinte à 60 °C. Chacune de ces étapes dure 30 min, les tubes (contenance 30 ml) étant agités sur l'agitateur Heidolph type vortex une fois au temps 15 min.

**Tableau 1**  
Caractéristiques des 22 blés tendres expérimentaux

**Table 1**  
*Characteristics of the 22 studied wheats*

Variétés	Glu-A3	Glu-B3	Glu-D3	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	G	W
Andain	m	seigle	f	0	7-8	5-10	14,9	98
Apollo	o	seigle	b	0	6-8	2-12	16,5	66
Artaban	n*	f	b	0	7-9	2-12	22,3	173
Arval	f/b	g	b	0	6-8	5-10	16,9	78
Aubaine	m	f	b	2*	7-8	5-10	20,7	338
Austerlitz	m	f	b	2*	7-8	2-12	19,6	127
Baroudeur	o	g	b	0	7-9	2-12	20,7	236
But	o	f	b	0	7	2-12	26,5	157
Carat	n	g	b	0	6-8	2-12	21,3	131
Cargo	f/b	g	b	2*	7-8	5-10	21,2	89
Chalou	f/b	e	b	1	6-8	2-12	22,8	196
Cobra	f/b	g	b	0	7	5-10	17,9	127
Corot	o	e	b	0	7	2-12	22,1	147
Créneau	a	b	f	1	7-8	2-12	19,1	143
Darius	o	e	n	0	7	2-12	21,8	283
Davidoc	f/b	f	f	1	7-8	2-12	20,5	156
Epiroux	o	b	f	0	7	2-12	23,0	78
Match	m	b	f	1	7-8	2-12	24,2	117
Nectar	o	f	a	2*	7	5-10	24,7	114
Pactole	o	f	b	2	7-8	2-12	17,0	201
Sensor	m	seigle	b	2	6-8	5-10	20,5	143
Thésée	f/b	e	f	0	6-8	2-12	18,1	112

n\* : allèle nul.

seigle : substitution 1BL/1RS.

n\* : null allele.

rye : substitution 1BL/1RS.

#### *Extraction des gliadines, globulines et albumines*

Quinze millilitres de solution A sont ajoutés à 300 mg de grains broyés ou de farine et l'extraction est réalisée durant 30 min. Après centrifugation (5 min, 40 000 g, 20 °C), le surnageant est éliminé. On ajoute à nouveau 15 ml de solution A et le culot est remis en suspension à l'aide d'une spatule et de l'agitateur. La suspension est centrifugée (5 min, 40 000 g, 20 °C). Le culot obtenu est lavé avec 7,5 ml de solution A et la suspension est à nouveau centrifugée (5 min, 40 000 g, 20 °C).

#### *Extraction des gluténines*

Les gluténines sont extraites à partir du culot précédent par 1,5 ml de solution B et 1 % (p/v) de dithioérythritol. Après 30 min de réduction, 1,5 ml de solution B et 1,4 % (v/v) de 4-vinylpyridine sont ajoutés. A la différence de la méthode de SINGH *et al.* (1991), les protéines sont ici alkylées pendant 4 h à 60 °C au lieu de 15 min. Après centrifugation (5 min, 40 000 g, 20 °C), le surnageant est récupéré pour l'étude des sous-unités gluténines. On considère dans la suite du travail que ce surnageant correspond aux sous-unités gluténines, ce que nous avons pu vérifier par électrophorèses en gel de polyacrylamide SDS-PAGE et A-PAGE, (résultats non fournis), bien que la présence de traces de constituants gliadines résiduels possédant des mobilités identiques à celles de certaines SG-FPM ne puisse être totalement écartée.

## 2.2.2 Electrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

### Préparation des échantillons

Deux types d'extraits sont analysés par SDS-PAGE : les extraits séquentiels propanol + réducteur et les échantillons en sortie de colonne IE-FPLC. Les premiers sont précipités dans des tubes Eppendorf par de l'acétone dans les proportions 1:4 (v:v). Après centrifugation (20 000 g, 5 min, 20 °C) et élimination du surnageant, le culot est lavé par 1 ml d'acétone 80 % et mis à sécher 1 nuit sous la hotte. Les fractions précipitées par l'acétone sont reprises par 50 µl de solution d'extraction SDS-PAGE (Tris-HCl pH 6,8, SDS 2 %, 2-ME 5 %, glycérol 10 %, pyronine G 0,01 %). En ce qui concerne le deuxième type d'extrait, 0,4 ml de chacun des éluats fractionnés sur la colonne IE-FPLC est précipité par 1,6 ml d'acétone (MELAS *et al.*, 1994). Après séchage, chacun de ces extraits est repris par 40 µl de solution d'extraction.

Les extraits, quel que soit leur type, sont ensuite agités sur vortex puis immergés 2 min 30 s au bain marie à 100 °C, opération ayant pour but de réduire complètement les liaisons disulfures.

Les dépôts sont de 15 µl pour les extraits en sortie de colonne IE-FPLC et de 3 µl pour les extraits au propanol + réducteur.

### Conditions de migration

Les gluténines sont séparées sur des gels à 10 % d'acrylamide selon un protocole dérivé de celui de GUPTA et MACRITCHIE (1991) qui assure une meilleure séparation des SG-FPM que le protocole classique de PAYNE *et al.* (1979) avec des gels à 13 % d'acrylamide. Les gels sont coulés entre deux plaques de dimension 140 x 140 x 0,75 mm, montées à l'aide de l'appareillage LKB 2001.

La température du bain réfrigérant est fixée à 18 °C. La migration dure 3 h sous une intensité de 20 mA pour un gel de 0,75 mm d'épaisseur.

### Analyse densitométrique

Après coloration et séchage, les gels sont analysés à l'aide du densitomètre à laser LKB 2202 Ultrosan avec une vitesse de passage de 30 mm.min<sup>-1</sup> et une densité optique pleine échelle égale à 1.

Les données sont acquises à l'aide du logiciel Spectra Station (Spectra Physics). Les pourcentages des différentes fractions (SG-FPM, SG-HPM) sont déterminés à l'aide d'un logiciel d'intégration des pics mis au point au laboratoire.

## 2.2.3 Chromatographie d'échange de cations

Les gluténines réduites et alkylées sont séparées selon leur charge à l'aide d'une colonne échangeuse de cations Mono S HR 5/5 (Pharmacia) et d'un ensemble chromatographique FPLC (Pharmacia).

Les tampons A (acide acétique 500 mM, acétonitrile 50 % ajusté à pH 4,5 par LiOH) et B (acide acétique 500 mM, acétonitrile 50 % pH 4,5, LiCl 500 mM) sont filtrés sous vide sur membrane nylon de porosité 45 µm (en évitant un vide trop poussé qui entraînerait une distillation de l'acétonitrile) et dégazés à l'hélium avant utilisation.

Les gluténines contenues dans 0,4 ml de l'extrait séquentiel par l'isopropanol-Tris-HCl sont tout d'abord précipitées par 1,6 ml d'acétone. Le précipité est

ensuite repris à chaud (60 °C, 15 min) par 1 ml de tampon A. Les protéines ainsi resolubilisées (quantité évaluée approximativement à 5 mg) sont déposées sur la colonne. Après passage du tampon A pendant 5 min, les protéines sont éluées par un gradient de 10 mM.min<sup>-1</sup> de LiCl, jusqu'à atteindre 350 mM. On passe ensuite de 350 à 500 mM de LiCl en 5 min, on maintient la molarité de 500 mM pendant 5 min, après quoi on revient à une molarité de LiCl de 0 mM (tampon A). La durée totale de l'expérience est de 57 min, pour un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>. La densité optique est lue à la longueur d'onde de 280 nm, avec une densité optique pleine échelle égale à 0,2. Les premiers pics protéiques apparaissent lorsque le gradient atteint 100 mM de LiCl, aucun pic n'étant plus visible après 350 mM. Les éluats sont collectés à partir du temps 16 min toutes les 1,20 min.

Une partie aliquote de 0,4 ml de chacune des fractions collectées en sortie de colonne est précipitée à l'acétone (voir *Préparation des échantillons*).

Après chaque passage, la colonne est lavée en inversant le flux avec un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>. On injecte ensuite 3 fois 1 ml de NaOH 0,5 M, SDS 0,5 % puis 2 fois 1 ml de méthanol. La colonne est alors rééquilibrée en tampon A jusqu'à l'obtention d'une ligne de base correcte, ce qui demande environ 15 min.

---

### 3 - RÉSULTATS

---

#### 3.1 Caractérisation des SG-FPM et des SG-HPM par chromatographie échangeuse de cations IE-FPLC et SDS-PAGE

Les deux approches chromatographiques les plus fréquentes pour l'étude physico-chimique des gluténines sont la chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) (BURNOUF et BIETZ, 1989; WIESER *et al.*, 1989; MARCHYLO *et al.*, 1992) et la chromatographie d'exclusion-diffusion (SE-HPLC) (HUEBNER et BIETZ, 1985). Aucune de ces deux techniques n'a toutefois permis jusqu'ici de séparer des SG-FPM sans contamination par d'autres classes de protéines. Par exemple, l'analyse sur SDS-PAGE en conditions réductrices des agrégats séparés par SE-HPLC montre qu'ils sont composés de plusieurs classes de protéines (DACHKEVITCH et AUTRAN, 1989). D'autre part, si un extrait est susceptible de contenir à la fois des gliadines et des SG-FPM, l'étude de ces dernières ne sera guère possible en raison du recouvrement de leur zone de migration électrophorétique avec celle des gliadines dans les diagrammes SDS-PAGE. Enfin, bien que la RP-HPLC permette une bonne résolution des sous-unités gluténines à l'échelle analytique (BURNOUF et BIETZ, 1989), il reste difficile d'identifier les SG-FPM séparées, car la quantité de protéines obtenue en sortie de colonne est la plupart du temps insuffisante pour permettre leur caractérisation précise en SDS-PAGE.

Une autre méthode chromatographique a donc été retenue ici pour la caractérisation des sous-unités gluténines réduites et alkylées : la séparation sur colonne échangeuse de cations (IE-FPLC). Ce type de colonne, habituellement considéré comme analytique, a été utilisé à un niveau semi-préparatif puisqu'il a été possible ici de fractionner des quantités de l'ordre de 5 mg de protéines, nécessaire à l'analyse électrophorétique de toutes les fractions obtenues. Comme au pH acide

utilisé (pH 4,5), les gluténines sont chargées positivement, la séparation se fait selon le nombre d'acides aminés chargés de la protéine, mais aussi en fonction du nombre de résidus cystéine présents, car l'alkylation par la 4-vinylpyridine apporte une charge positive par résidu. Les fractions récupérées en sortie de colonne IE-FPLC ayant été analysées en SDS-PAGE, une double caractérisation des SG-FPM a pu être réalisée : selon la charge et selon le poids moléculaire.

### 3.1.1 Répétabilité des chromatogrammes IE-FPLC

Une étude de répétabilité a été réalisée sur deux variétés. Nectar et Davidoc ont été choisies en raison de leur composition différentes en SG-FPM et SG-HPM (allèles SG-FPM *Glu-A3 a*, *Glu-B3 f*, *Glu-D3 a* et SG-HPM *Glu-A1 2\**, *Glu-B1 7*, *Glu-D1 5-10* pour Nectar, allèles SG-FPM *Glu-A3 f/b*, *Glu-B3 f*, *Glu-D3 f* et SG-HPM *Glu-A1 1*, *Glu-B1 7-8*, *Glu-D1 2-12* pour Davidoc, (MELAS, 1994).

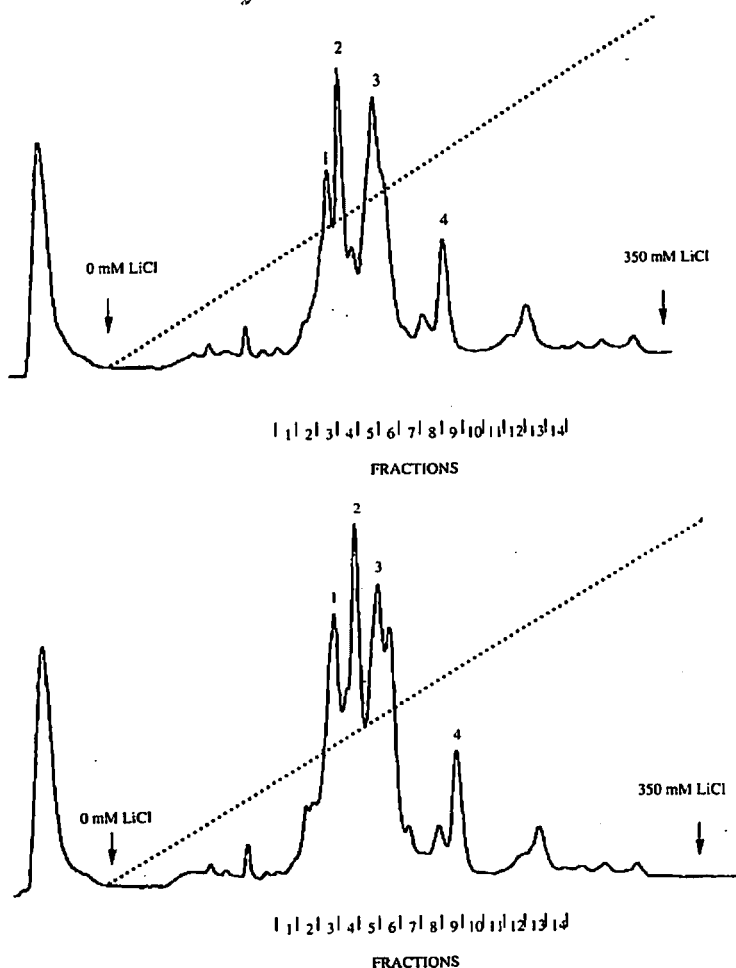
La répétabilité de la séparation chromatographique a été vérifiée en extrayant 3 fois, indépendamment, les gluténines des deux variétés, Nectar et Davidoc. Ensuite, 1 ml de chacun des extraits (soit environ 5 mg) a été injecté sur la colonne et la manipulation a été répétée une fois. Les chromatogrammes obtenus sont différents (fig. 1a et 1b) avec 4 pics majeurs pour la variété Nectar et 4 autres pics majeurs pour la variété Davidoc. Pour chacun des pics, 6 valeurs de temps de rétention sur la colonne ont été mesurées (3 extraits x 2 répétitions). Le calcul de la moyenne et de l'écart type de ces valeurs a montré que le coefficient de variation ne dépassait pas 2 % (tabl. 2), indiquant une très bonne répétabilité des chromatogrammes.

### 3.1.2 Caractérisation par SDS-PAGE des fractions séparées en IE-FPLC

Les gluténines des deux variétés Nectar et Davidoc ont été séparées en IE-FPLC. Les fractions obtenues en sortie de colonne, collectées toutes les 1,2 min à partir du temps 16 min (14 tubes analysés, au total), précipitées par l'acétone, puis reprises par la solution d'extraction, ont été analysées en SDS-PAGE 10 % (fig. 2a et 2b). Les SG-FPM de la zone C sont apparues comme les premières protéines éluées de la colonne ; on ne les retrouve pas après la fraction 6. Ensuite viennent les SG-FPM de la zone B et les SG-HPM de type x. Les SG-HPM de type y, qui ne sont éluées que pour des valeurs du gradient LiCl supérieures à 280 mM de LiCl, n'ont pas été retrouvées dans les 14 fractions analysées. L'éluion tardive des SG-HPM de type y semble s'expliquer par leur plus grande richesse en résidus cystéine que celles des SG-HPM de type x (SHEWRY *et al.*, 1992). A signaler que, dans la suite des interprétations, notamment dans l'analyse densitométrique, on n'a pris en considération que les fractions se situant dans les zones principales des diagrammes (SG-HPM de type x, SG FPM de type B et C), en négligeant celles parfois visibles dans le front du diagramme, qui ne correspondent pas à des sous-unités gluténines classiquement décrites.

## 3.2 Caractérisation des allèles SG-HPM selon la charge, les groupements cystéines alkylés et le poids moléculaire

Des études antérieures avaient permis d'observer que la composition allélique des SG-FPM est, de même que celle des SG-HPM, associée à certains paramètres technologiques. La caractérisation physico-chimique (charge, poids moléculaire) des SG-FPM et des SG-HPM codées par ces allèles peut donc permettre d'expliquer les corrélations observées en termes de fonctionnalité.



**Figure 1**

Chromatogramme IE-FPLC des sous-unités-gluténines. Le gradient en LiCl, du début (0 mM LiCl) à la fin (350 mM LiCl), le numéro des pics considérés, ainsi que les zones correspondant aux 14 fractions collectées sont indiqués

*IE-FPLC chromatogram of glutenin subunits. The LiCl gradient from the start (0 mM LiCl) to the end, (350 mM LiCl), peak number and zones corresponding to the 14 collected fractions are indicated*

- a. Variété Davidoc.
- b. Variété Nectar.

### 3.2.1 Analyse des SG-FPM

L'analyse des SG-FPM de 22 variétés (voir Matériel et Méthodes) a permis d'observer que chacun des trois génomes A, B et D code pour des SG-FPM que l'on peut caractériser par leur poids moléculaire et leur ordre d'éluion sur la colonne (données non présentées). Toutes les protéines codées par le *génom*e A



Tableau 2

Etude de la répétabilité des chromatogrammes IE-FPLC. Mesure de la variation des temps de rétention des 4 pics majeurs des variétés Davidoc et Nectar

Table 2

*Study of repeatability of the IE-FPLC chromatograms. Measurement of the variation in retention times of the 4 main peaks of varieties Davidoc and Nectar*

DAVIDOC				
Pics n°	1	2	3	4
Temps ret.*				
Moyenne	18,67	20,88	24,59	29,7
Écart type	0,17	0,17	0,5	0,096
C.V.**	0,91	0,81	2	0,32
NECTAR				
Pics n°	1	2	3	4
Temps ret.*				
Moyenne	19,74	21,056	24,88	30,09
Écart type	0,39	0,055	0,32	0,33
C.V.**	1,97	0,26	1,28	1,09

L'expérience a été répétée 2 fois sur 3 extraits différents, soit 6 mesures par variété.

\* Temps ret. : temps de rétention.

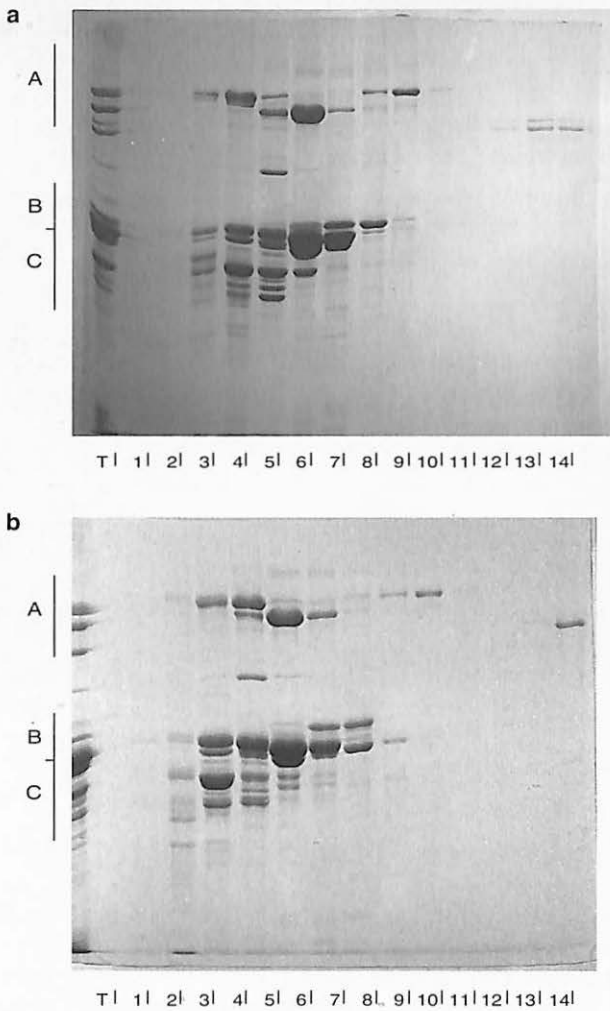
\*\* C.V. : coefficient de variation.

*The experience was repeated twice from three different extracts, i.e. 6 measurements per variety.*

\* *Temps ret. : retention time.*

\*\* *C.V. : coefficient of variation.*

(les protéines correspondant aux allèles *f/b* de Davidoc et *o* de Nectar sont identifiées sur les diagrammes des *fig. 2a* et *2b*) apparaissent ainsi presque toujours dans la zone B des électrophorogrammes SDS-PAGE. Bien que ces protéines soient éluées par de relativement faibles différences de force ionique (entre environ 110 et 260 mM de LiCl), ce qui implique que leur charge varie donc dans des limites étroites, elles se distribuent sur une large étendue du chromatogramme (de la fraction 3 à la fraction 9), certains blocs alléliques, comme le *o* de Nectar, codant pour des protéines particulièrement chargées positivement. L'identification des protéines codées par les différents allèles des autres génomes (résultats non détaillés) a permis de montrer que le *génom*e B de Davidoc et de Nectar code pour la majorité des protéines présentes dans la zone B, mais également pour quelques protéines de la zone C et de la zone D. Ces protéines sont éluées de la colonne en milieu de gradient, entre les fractions 3 et 8. Elles présentent donc une diversité de charge à peine inférieure à celle des protéines codées par le génome A, mais leur répartition de taille est étendue. Quant aux SG-FPM codées par le *génom*e D, elles ont des poids moléculaires plus homogènes, ce génome codant pour des SG-FPM présentes en majorité dans la zone C. Ces dernières protéines sont les moins chargées de toutes, car elles sont éluées en début de gradient (entre les fractions 2 et 7). D'une manière générale, on remarque que les protéines les moins chargées positivement migrent dans la zone C, alors que les plus chargées migrent dans la zone B.



**Figure 2**

Analyse des sous-unités glutéiniques séparées sur colonne IE-FPLC, par SDS-PAGE.

Les 14 fractions sont analysées en comparaison de l'extrait témoin déposé sur la colonne qui contient l'ensemble des sous-unités glutéiniques (T).

Les numéros des sous-unités SG-HPM des témoins sont indiqués à gauche des diagrammes. Les principales sous-unités SG-FPM codées par le génome A (allèles *f/b* de Davidoc et *o* de Nectar) sont repérées (\*) sur les diagrammes des fractions chromatographiques

*SDS-PAGE analysis of glutenin subunits separated on IE-FPLC column.*

*The 14 fractions are analysed in comparison with the standard extract loaded on the column containing all glutenin subunits (T). HMW-GS numbers of the standards are indicated on the left of the patterns. The main LMW-GS bands encoded by the genome A (alleles *f/b* of Davidoc et *o* of Nectar) are identified (\*) on the patterns of the chromatographic fractions*

a. Variété Davidoc (allèles SG-HPM : *f/b*, *f*, *f* et SG-FPM : 1, 7/8, 2/12).

b. Variété Nectar (allèles SG-HPM : *o*, *f*, *a* et SG-FPM : 2\*, 7, 5/10).

### 3.2.2 Description de certains allèles SG-HPM

A la sortie de la colonne IE-FPLC, on retrouve à la fois les SG-FPM et les SG-HPM, séparées selon leur charge. Seules les 14 premières fractions dans lesquelles se retrouvent les SG-FPM (et les SG-HPM de type x) ont été décrites dans cette étude, sachant que (*fig. 1a et 1b*) les pics élués tardivement sont exclusivement constitués de SG-HPM de type y.

En raison du mode de collecte et de la présence de pics composites, une même sous-unité peut se retrouver dans deux ou trois fractions contiguës. Inversement, d'une variété à une autre, la rétention d'une "même" sous-unité peut se révéler différente et montrer ainsi que les allèles correspondants sont distincts.

Parmi les SG-HPM de type x, 6 sous-unités ont été caractérisées : 1Ax1, 1Ax2\*, 1Bx6, 1Bx7, 1Dx2 et 1Dx5 (nomenclature de PAYNE et LAWRENCE, 1983).

Les SG-HPM codées par le génome D sont parmi les premières à être éluées de la colonne. Ainsi, la SG-HPM 1Dx2 est la moins chargée positivement, car elle apparaît dans les fractions de 3 à 7 (*tabl. 3*), la deuxième SG-HPM à apparaître étant la 1Dx5.

De façon intéressante, d'autres SG-HPM comme la 1Bx7, la 1Ax1, la 1Ax2\* et la 1Bx6 n'apparaissent pas dans la même fraction IE-FPLC, selon la variété considérée. La 1Ax2\* de Pactole est même éluee dans les fractions 15-16, au-delà des zones décrites dans le tableau 3. La 1Bx7 paraît ainsi exister sous 2 formes : l'une peu chargée (présence dans les fractions 6 et 7) et l'autre davantage chargée (présence dans les fractions 8 à 10) ; la 1Bx1 se retrouve dans la

**Tableau 3**

Répartition des SG-HPM (nomenclature de PAYNE et LAWRENCE, 1983)  
dans les fractions n° 1 à 14) éluées de la colonne IE-FPLC

**Table 3**

*Distribution of HMW-GS (nomenclature of PAYNE and LAWRENCE, 1983)  
in the fractions numbered from 1 to 14 eluted from the IE-FPLC column*

	Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Variété	SG-HPM														
Andain	7-8, 5-10							5		7	7				
Aubaine	2*, 7-8, 5-10					5	5	5		7	7		2*	2*	
Arval	6-8, 5-10					5	5					6	6	6	
Apollo	6-8, 2-12			2	2	2					6	6	6		
Baroudeur	7-9, 2-12			2	2	2		7	7	7					
But	7, 2-12			2	2	2		7	7	7					
Carat	6-8, 2-12					2	2							6	6
Chalou	1, 6-8, 2-12				2	2	2						1,6	1,6	1,6
Cargo	2*, 7-8, 5-10						5	5		7	7			2*	2*
Cobra	7, 5-10					5	5		7	7					
Corot	7, 2-12				2	2			7						
Davidoc	1, 7-8, 2-12				2	2	7	7		1					
Epiroux	7, 2-12				2	2				7	7				
Match	1, 7-8, 2-12					2				7	7	1	1		
Nectar	2*, 7, 5-10				5	5	7	7		2*	2*				
Pactole	2*, 7-8, 2-12			2	2	2				7	7				
Sensor	2*, 6-8, 5-10					5	5	5				2*, 62*, 6			
Thésée	6-8, 2-12				2	2	2					6	6	6	
	Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

fraction 9 et dans les fractions de 11 à 14 ; la 1Ax2\* et la 1Bx6 sont présentes soit dans les fractions 9 à 11, soit dans les fractions 12 à 14. Cette différence de temps d'élution peut refléter un nombre d'acides aminés chargés différents ou de résidus cystéine variable.

Par ailleurs, la présence de sous-unités de même appellation (selon la nomenclature de PAYNE et LAWRENCE, 1983) dans des fractions différentes de chromatographie a été observée. Les sous-unités présentant apparemment plusieurs formes sont la 1Bx7, la 1Bx6, la 1Ax1 et la 1Ax2\*. Rappelons que MARCHYLO *et al.* (1992) avaient démontré pour la sous-unité 1Bx7 l'existence de deux formes (7 et 7\*) qui diffèrent par leur migration en SDS-PAGE, tout en ayant des temps d'élution comparables en RP-HPLC, la SG-HPM 7 étant génétiquement liée (appartenance au même "bloc allélique") à la 8 ou à la 8\*, la 7\* étant liée à la 8, à la 8\*, ou à la 9. Dans le présent travail, la forme la plus chargée de sous-unité 1Bx7, que l'on trouve seule (chez But, Cobra, Corot, Epiroux) ou en combinaison avec la 8 (Andain, Aubaine, Cargo, Match, Pactole), pourrait donc correspondre à la SG-HPM 7, tandis que la forme la moins chargée, qui apparaît seule (chez Nectar) ou associée à la 8 (Davidoc) ou à la 9 (Baroudeur), pourrait correspondre à la SG-HPM 7\* de MARCHYLO *et al.* (1992). De la même façon, la SG-HPM 1Ax1 paraît renfermer une forme peu chargée (présente chez Davidoc) et une forme davantage chargée, que nous proposons d'appeler 1Ax1\*\* (Chalou). Egalement, la SG-HPM 1Bx6 paraît renfermer une forme peu chargée (Sensor) et une forme davantage chargée, que nous proposons d'appeler 1Bx6\* (Carat).

D'autres auteurs ont rapporté l'existence d'isoformes parmi les SG-HPM. SUTTON (1991) a ainsi mis en évidence, par RP-HPLC, deux formes différentes pour les sous-unités 8 (8 et 8\*) et 2\* (2\* et 2\*\*). LAFIANDRA *et al.* (1993) ont également décrit deux formes de sous-unités 5 (5 et 5\*) différentes par leur taille, leur point isoélectrique et leur hydrophobicité de surface (RP-HPLC). Ces auteurs rapportent que les premières SG-HPM à être éluées de la colonne en RP-HPLC sont les SG-HPM de type y codées par le génome D (Dy), suivies des SG-HPM By, Dx, Bx et Ax, les sous-unités By et Dx se superposant aux autres. On note qu'avec l'IE-FPLC l'ordre d'élution est inversé, les sous-unités de type Dx, Bx et Ax étant éluées avant les sous-unités de type y.

Le présent travail fondé sur la IE-FPLC permet donc de confirmer l'existence d'au moins deux formes différentes pour plusieurs SG-HPM de type x, résultat qui, dans le cas de 1Ax1 et 1Bx6, n'avait jamais été observé par des techniques de RP-HPLC, d'IEF ou de SDS-PAGE.

La question de l'origine de la diversité observée sur les SG-HPM reste posée. SHEWRY *et al.* (1992) distinguent deux voies possibles pour l'évolution des SG-HPM selon le domaine de la protéine (répétitif ou non) considéré. Les changements qui ont lieu dans le domaine non répétitif sont des substitutions d'un seul acide aminé et des délétions et/ou insertions de petite taille. Dans le domaine répétitif, les phénomènes mis en jeu sont des duplications et/ou délétions de bloc entier ou de plusieurs blocs d'acides nucléiques par recombinaisons inégales. Ces auteurs pensent que la longueur et la régularité du domaine répétitif des SG-HPM seraient reliées aux qualités boulangères de la pâte.

On peut en déduire que les différences observées en SDS-PAGE pour les SG-HPM seraient dues à des duplications et/ou des délétions dans le domaine répétitif, celles révélées par d'autres techniques (A-PAGE, IEF, RP-HPLC,...) étant probablement dues à des mutations ponctuelles, sachant que les acides aminés basiques sont localisés préférentiellement dans le domaine non répétitif.

### 3.3 Étude de la distribution des SG-FPM selon leur charge : relation avec les paramètres de la qualité

Le rôle fonctionnel des SG-FPM au niveau des propriétés de la pâte a été exploré en essayant de mettre en évidence une relation entre les caractéristiques physico-chimiques, représentées ici par la distribution de charge des SG-FPM, et les paramètres de la qualité. Afin d'étudier cette distribution, les gels d'électrophorèse ont été analysés par densitométrie. La somme des aires correspondant aux SG-FPM a ainsi été calculée, redistribuée en pourcentage par fraction chromatographique et mise en regard de la composition allélique des variétés. Les relations entre la distribution de charge des SG-FPM et les paramètres de l'alvéographe de Chopin ont alors fait l'objet d'une analyse statistique.

#### 3.3.1 Comparaison de la distribution de charge de variétés dont la composition allélique au locus *Glu 3* diffère seulement pour le génome A

Les protéines codées par le locus *Glu-A3* présentant une grande variation dans leur distribution de charge (résultats non présentés), il était intéressant d'explorer par priorité ce génome en vue de rechercher une explication physico-chimique des relations mises en évidence précédemment (MELAS, 1994) entre les allèles *Glu-A3* et les paramètres *W* et *G* de l'alvéographe.

Le pourcentage de SG-FPM présentes dans les 14 fractions de chromatographie pour les variétés Match (allèles SG-FPM *m*, *b* et *f*) et Epiroux (allèles SG-FPM *o*, *b* et *f*) a été reporté sur un graphique (fig. 3). On observe que ces deux

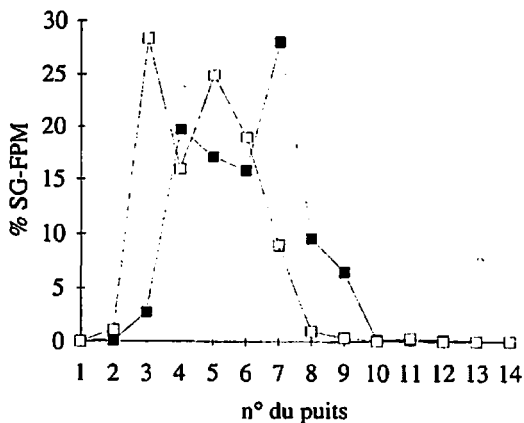
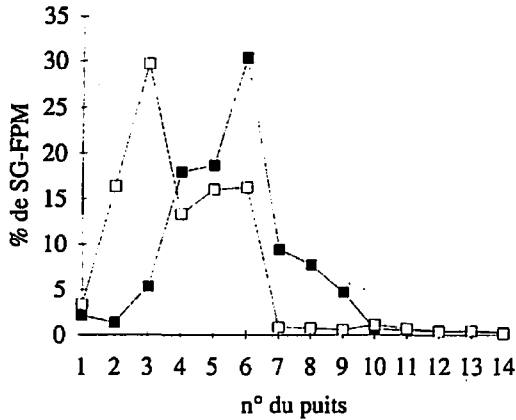


Figure 3

Comparaison de la distribution de charge des SG-FPM des variétés Epiroux et Match, possédant respectivement les compositions alléliques SG-FPM *o*, *b*, *f* et *m*, *b*, *f*. Le graphique représente le pourcentage de SG-FPM présentes dans chacune des 14 fractions.

Comparison of the charge distribution of LMW-GS between the varieties Epiroux and Match, with LMW-GS allelic compositions *o*, *b*, *f* and *m*, *b*, *f*, respectively. The graph indicates the percentage of LMW-GS present in each of the 14 fractions.

—■— épiroux *o*, *b*, *f*  
 —□— match *m*, *b*, *f*



**Figure 4**

Comparaison de la distribution de charge des SG-FPM des variétés Pactole et Aubaine, possédant respectivement les compositions alléliques SG-FPM *o, f, b*, et *m, f, b*. Le graphique représente le pourcentage de SG-FPM présentes dans chacune des 14 fractions

*Comparison of the charge distribution of LMW-GS between the varieties Pactole and Aubaine, with LMW-GS allelic compositions *o, f, b* and *m, f, b*, respectively. The graph indicates the percentage of LMW-GS present in each of the 14 fractions*

—■— pactole *o, f, b*  
 —□— aubaine *m, b, f*

variétés présentent une distribution de charge différente. Ainsi, chez Epiroux, le graphique est déplacé vers les fractions les plus chargées, en comparaison de celui de Match. Pour d'autres variétés telles que Pactole et Aubaine, de composition allélique en SG-FPM respective *o, f, b* et *m, f, b*, on retrouve les mêmes différences de distribution de charge apparemment liées à la présence des allèles *o* ou *m* (fig. 4). Bien que ces variétés diffèrent aussi notamment au niveau des autres loci portés par les sept chromosomes du génome A, ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse d'une liaison entre la distribution de charge et la composition allélique.

### 3.3.2 Discrimination des variétés selon leur distribution de charge

Après densitométrie des diagrammes électrophorétiques de chacune des variétés, l'aire des pics correspondant spécifiquement à des SG-FPM a été additionnée pour les 14 fractions de chromatographie, puis recalculée en pourcentage des SG-FPM totales de la variété. Cette distribution du pourcentage des SG-FPM dans les différentes fractions est donnée dans le tableau 4. On observe que la principale source de variation se situe entre les fractions 2 et 9, les pourcentages de SG-FPM dans les autres fractions étant insignifiants. Après comparaison des coefficients de variation des pourcentages de SG-FPM au sein de chacune de ces fractions et à partir d'une simulation visant à maximiser la discrimination des variétés selon la base de la distribution de charge, on a été amené à rassembler ces fractions 2 à 9 en trois groupes correspondant respectivement aux

Tableau 4

Répartition du pourcentage des SG-FPM dans les 9 principales fractions de chromatographie IE-FPLC. L'aire correspondant aux SG-FPM a été déterminée par densitométrie des électrophorégrammes SDS-PAGE des éluats, puis recalculée en pourcentage par fraction. La composition allélique des 22 variétés est indiquée dans les trois colonnes de droite (génomes, A, B et D, respectivement)

Table 4

*Distribution of the percentage of LMW-GS in the 9 main chromatographic (IE-FPLC) fractions. The area corresponding to LMW-GS was determined from densitometric scanning of SDS-PAGE electrophoregrams of eluates, then calculated in percentage per fraction. The allelic composition of the 22 varieties (genomes A, B and D, respectively) is indicated in the three columns at the right hand side of the table*

Variétés	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	D
Andain	0,9	8,0	31,1	24,6	15,7	8,1	8,6	0,7	m	seigl.	f
Apollo	3,7	27,6	15,6	18,5	24,7	5,2	1,1	0,4	o	seigl.	b
Artaban	5,1	25,2	17,2	28,5	22,1	0,7	0,5	0,2	nul	f	b
Arval	6,4	20,7	17,5	32,1	15,8	3,2	1,0	0,6	f	g	b
Aubaine	3,3	16,4	29,7	13,4	16,0	16,3	0,8	0,7	m	f	b
Austerlitz	5,4	21,3	17,7	28,2	17,8	5,3	1,6	0,7	m	f	b
Baroudeur	9,7	29,8	7,6	27,2	16,5	2,6	0,8	0,7	o	g	b
But	2,6	13,6	13,3	21,4	22,0	20,8	3,2	0,1	o	f	b
Carat	2,2	12,1	29,1	13,3	25,7	12,5	0,7	0,6	nul	g	b
Cargo	3,6	16,0	19,8	12,8	23,3	13,0	1,3	1,1	f	g	b
Chalou	4,1	14,8	17,9	21,6	24,8	11,8	1,4	0,7	f	e	b
Cobra	3,7	23,9	19,7	18,8	29,6	1,8	0,5	0,7	f	g	b
Corot	2,8	11,4	22,8	23,1	22,2	11,8	2,1	0,9	o	f	b
Créneau	2,4	3,1	4,8	22,2	33,3	24,7	1,2	1,0	a	b	f
Darius	1,6	5,1	19,8	23,2	23,1	13,8	9,4	1,5	o	e	nul
Davidoc	1,8	5,9	19,3	20,0	29,9	17,4	2,9	0,5	f	f	f
Epiroux	0,1	2,8	19,7	17,1	15,8	28,1	9,6	6,4	o	b	f
Match	1,1	28,4	15,9	24,9	19,0	9,0	1,0	0,4	m	b	f
Nectar	0,1	3,9	26,0	19,7	28,0	13,5	7,6	0,8	o	f	a
Pactole	1,3	5,4	18,0	18,7	30,4	9,4	7,8	4,7	o	f	b
Sensor	1,8	10,0	2,5	19,0	40,4	20,6	2,7	0,3	m	seigl.	b
Thésée	3,4	5,7	17,1	12,4	39,6	16,3	1,6	0,2	f	e	f

fractions 2-3-4, 5-6 et 7-8-9. Pour quantifier les différences observées et discriminer de façon simple les variétés selon leur distribution de charge, on a alors établi pour chaque variété un index de charge (IC), obtenu à partir de la distribution des SG-FPM entre ces trois groupes de fractions, selon le mode de calcul détaillé ci-dessous.

#### Calcul de l'index de charge (IC) de chaque variété

- Un coefficient - 1 a été attribué à la somme des pourcentages de fractions 2 et 3, car un pourcentage élevé dans les premières fractions traduit un déficit de charges positives.

- Un coefficient + 1 a été attribué à la somme des pourcentages de SG-FPM présentes dans les fractions 7, 8 et 9.

- Par contre, les variétés étant manifestement mal discriminées par les valeurs des pourcentages dans les fractions 4, 5 et 6 (ces fractions étant d'ailleurs celles dans lesquelles on observe un maximum de superposition entre les protéines attribuables à l'un ou l'autre des allèles), ces fractions n'ont pas été prises en compte pour le calcul de l'index de charge.

L'index de charge (IC) a alors été formulé de la façon suivante :

$$IC = -1 \times [\% (2 + 3)] + 1 \times [\% (7 + 8 + 9)]$$

L'exploitation d'un tel indice peut apparaître criticable. En effet, le mode de calcul de IC se fonde sur seulement 40 à 60 % des sous-unités gluténines alors qu'il est la résultante de tous les allèles présents. Les relations observées avec la distribution allélique au sein de chacun des génomes considérés séparément doivent donc être considérées avec prudence, d'autant qu'il faut attendre de certaines variétés, notamment celles possédant des fragments du chromosome 1RS du seigle (Apollo, Sensor,...), un comportement atypique.

Il nous est néanmoins apparu qu'un tel index pouvait avoir une valeur opérationnelle pour la discrimination de certains allèles, particulièrement ceux des loci *Glu-A3* et *Glu-D3* (aucune discrimination n'ayant pu être obtenue entre les allèles du locus *Glu-B3*) et apporter un élément original dans la recherche des bases physico-chimiques de la qualité potentielle de ces allèles.

#### *Index de charge et allèles du locus Glu-A3*

L'index de charge tend à discriminer les variétés en deux groupes selon la composition allélique au locus *Glu-A3* (tabl. 5). D'une manière générale, les variétés possédant un IC négatif ou inférieur à 10 sont des variétés de composition allélique *Glu-A3 f, m* ou nul, à l'exception de Créneau, Davidoc et Sensor. Inversement, une majorité de variétés dont l'index de charge est supérieur à 10 possède l'allèle *o* (exceptions : Baroudeur et Apollo).

**Tableau 5**

Relation entre l'index de charge (IC) et la composition allélique en SG-FPM pour le génome A. IC est calculé à partir du pourcentage de SG-FPM présentes dans les fractions 2, 3, 7, 8 et 9 selon la formule  $IC = -1 \times [\%(2 + 3)] + 1 \times [\%(7 + 8 + 9)]$

**Table 5**

Relationship between charge index(IC) and allelic composition of LMW-GS for the genome A. IC was calculated from the percentage of LMW-GS present in the fractions 2, 3, 7, 8 and 9 according to the formula :  $IC = -1 \times [\%(2 + 3)] + 1 \times [\%(7 + 8 + 9)]$

Variétés	IC	Glu-A3	Glu-B3	Glu-D3
Baroudeur	-36,06	<i>o</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Artaban	-29,13	nul	<i>f</i>	<i>b</i>
Cobra	-25,40	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Apollo	-25,07	<i>o</i>	nul	<i>b</i>
Arval	-22,93	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Austerlitz	-19,76	<i>m</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Match	-19,61	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>f</i>
Chalou	-5,64	<i>f</i>	<i>e</i>	<i>b</i>
Cargo	-5,36	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Aubaine	-2,58	<i>m</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Carat	-1,05	nul	<i>g</i>	<i>b</i>
Corot	0,49	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
But	7,84	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Andain	7,85	<i>m</i>	nul	<i>f</i>
Thésée	8,70	<i>f</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
Pactole	10,42	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Sensor	11,53	<i>m</i>	nul	<i>b</i>
Davidoc	12,52	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>
Darius	16,54	<i>o</i>	<i>e</i>	nul
Nectar	17,14	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>a</i>
Créneau	20,40	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>f</i>
Epiroux	34,76	<i>o</i>	<i>b</i>	<i>f</i>



### Index de charge et allèles du locus *Glu-D3*

Les variétés tendent également à se distribuer en deux groupes en fonction de leur index de charge selon les allèles *b* et *f* au locus *Glu-D3* (tabl. 6). Ainsi, un IC négatif ou faiblement positif (< 10) caractérise les allèles *b* (exceptions : Sensor et Pactole), alors que les variétés possédant l'allèle *f* ont un index de charge positif (exception : Match).

Parmi les variétés qui font exception, on rencontre donc fréquemment Sensor et Apollo qui sont connues pour être des variétés possédant la translocation 1BL/1RS et qui, ne possédant donc pas d'allèle codé par le locus *Glu-B3*, ont une distribution de charge atypique de leurs SG-FPM. Il ressort d'ailleurs d'une analyse visuelle des électrophorogrammes que ces variétés surproduisent les SG-FPM codées par les loci *Glu-A3* et *Glu-D3* (MOREL *et al.*, 1994).

**Tableau 6**

Relation entre l'index de charge (IC) et la composition allélique en SG-FPM pour le génome D. IC est calculé à partir du pourcentage de SG-FPM présentes dans les fractions 2, 3, 7, 8 et 9 selon la formule  $IC = -1 \times [\%(2 + 3)] + 1 \times [\%(7 + 8 + 9)]$

**Table 6**

Relationship between charge index(IC) and allelic composition of LMW-GS for the genome D. IC was calculated from the percentage of LMW-GS present in the fractions 2, 3, 7, 8 and 9 according to the formula :  $IC = -1 \times [\%(2 + 3)] + 1 \times [\%(7 + 8 + 9)]$

Variétés	IC	Glu-A3	Glu-B3	Glu-D3
Nectar	17,14	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>a</i>
Arval	-22,93	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Cargo	-5,36	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Chalou	-5,64	<i>f</i>	<i>e</i>	<i>b</i>
Cobra	-25,40	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
Aubaine	-2,58	<i>m</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Austerlitz	-19,76	<i>m</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Sensor	11,53	<i>m</i>	nul	<i>b</i>
Artaban	-29,13	nul	<i>f</i>	<i>b</i>
Carat	-1,05	nul	<i>g</i>	<i>b</i>
Apollo	-25,07	<i>o</i>	nul	<i>b</i>
Baroudeur	-36,06	<i>o</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
But	7,84	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Corot	-0,37	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Pactole	10,42	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
Créneau	20,40	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>f</i>
Davidoc	12,52	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>f</i>
Thésée	8,70	<i>f</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
Andain	7,85	<i>m</i>	nul	<i>f</i>
Match	-19,61	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>f</i>
Epiroux	34,76	<i>o</i>	<i>b</i>	<i>f</i>
Darius	16,54	<i>o</i>	<i>e</i>	nul

### Relation avec les paramètres de la qualité

Dans des travaux antérieurs fondés sur une analyse statistique par segmentation, permettant de dissocier l'effet respectif de la variation des SG-HPM et des SG-FPM sur les paramètres de la qualité boulangère, on avait observé l'association entre, d'une part, l'allèle *Glu-A3 m* et le paramètre *W* de l'alvéographe et, d'autre part, l'allèle *o* et le paramètre *G* (GAZANHES *et al.*, 1991 ; MELAS, 1994). Or, le "bloc allélique" *o* apparaît ici coder pour l'une des gluténines les plus chargées parmi les SG-FPM (fig. 2b). Une telle protéine possède donc, soit davantage de charges positives, soit davantage de résidus cystéine que les autres.

Dans l'hypothèse où des valeurs élevées de  $G$  seraient liées au nombre de résidus cystéine, on serait en accord avec les résultats de FULLINGTON *et al.* (1987) qui mettent en évidence la relation entre l'extensibilité d'une pâte et le nombre de liaisons disulfures présentes dans les gluténines. Dans ce cas, des valeurs élevées du  $W$  seraient plutôt en rapport avec une charge positive faible, ce qui semble être le cas ici des protéines correspondant aux allèles  $m$  et  $f$ .

Il n'a malheureusement pas été possible de renforcer ces derniers résultats par des dosages de cystéines en raison de la nature de l'agent alkylant retenu (4-vinyl-pyridine). Un autre agent alkylant aurait permis ces dosages mais non de révéler, comme la 4-vinyl-pyridine, des différences en matière de charge positive des protéines.

---

#### 4 - DISCUSSION

---

Par chromatographie sur colonne échangeuse de cations IE-FPLC, méthode jusqu'ici peu exploitée chez les protéines de céréales, les gluténines réduites et alkylées ont été séparées selon leur charge positive. La répétabilité du protocole a été testée et on a pu observer que les protéines des 22 variétés analysées étaient éluées dans un ordre précis : SG-FPM de type C, SG-FPM de type B, SG-HPM de type x puis de type y.

La connaissance des protéines codées par les allèles SG-FPM et SG-HPM a été approfondie grâce à une caractérisation selon la charge (IE-FPLC) et le poids moléculaire (SDS-PAGE). Bien que le matériel végétal utilisé dans ce travail ne permette pas de réaliser d'analyse statistique des effets respectifs des SG-HPM et des SG-FPM dans l'expression de la qualité, l'étude particulière des SG-FPM a montré des différences qui nous paraissent pouvoir contribuer à expliquer certaines propriétés de la pâte.

En particulier, la distribution de charge permettant, dans une certaine mesure, de discriminer les SG-FPM en fonction de leur composition allélique, on a fait l'hypothèse que les différences de charge pourraient participer à l'explication des relations mises en évidence entre qualité boulangère et sous-unités gluténines. Les SG-FPM ne seraient pas alors de simples marqueurs de la qualité d'une pâte mais bien des éléments fonctionnels déterminant, en association avec les SG-HPM, des propriétés de la pâte.

Cette hypothèse peut être discutée en termes d'interactions entre protéines. Ainsi, dans une situation où les charges présentes sur les SG-FPM réduites et alkylées seraient peu importantes (par exemple en raison d'un faible nombre de résidus cystéine), les propriétés d'une pâte seraient principalement influencées par des interactions non covalentes (hydrogène, hydrophobe). Les allèles SG-FPM de type *Glu-A3 a* ou  $m$ , présents dans les fractions les moins chargées, correspondraient à ce cas de figure.

Au contraire, dans le cas où les SG-FPM porteraient un nombre de charges élevé du fait de nombreux résidus cystéine, les propriétés de la pâte seraient principalement influencées par des liaisons disulfures. Il est intéressant de mettre en parallèle ce dernier élément de discussion avec les travaux de FULLINGTON

et al. (1987). En effet, pour ces derniers auteurs, un pourcentage élevé de cystéine est une condition nécessaire au glissement ordonné des chaînes protéiques qui caractérise l'extensibilité d'une pâte. Or, la présence de SG-FPM dans les fractions les plus chargées est caractéristique de l'allèle *Glu-A3 o* qui est précisément associé aux valeurs les plus élevées du paramètre *G*.

Les relations mises en évidence entre la distribution de charge des SG-FPM et les paramètres (*W* ou *G*) de l'alvéographe de Chopin pourraient trouver des applications pratiques en complétant et en affinant les outils biochimiques existants, qui sont fondés sur la variabilité des seules SG-HPM.

Par exemple, la sélection de blés possédant à la fois une composition en SG-HPM de type 5-10 et des SG-FPM peu chargées devrait concerner des blés possédant des valeurs élevées de *W* (> 250). Inversement, des blés possédant des SG-FPM très chargées (allèle *Glu-A3 o*) associées à des SG-HPM de type 2-12 devraient présenter des profils adaptés aux besoins des biscuitiers, avec à la fois des valeurs de *W* plus faibles (100-150) et des valeurs de *G* élevées (> 22).

---

## 5 - CONCLUSION

---

Un protocole original de caractérisation des SG-FPM et SG-HPM selon la charge (IE-FPLC) et le poids moléculaire (SDS-PAGE) a été mis au point, constituant une alternative aux méthodes de caractérisation physico-chimique classiques des gluténines (SE-HPLC et RP-HPLC).

De nouvelles formes de SG-HPM (1Ax1\*\* et 1Bx6\*) ont été mises en évidence. En outre, la distribution de charge des SG-FPM réduites et alkylées a permis de discriminer les variétés en fonction de leur composition allélique grâce au calcul d'un index de charge (IC). La relation entre allèle *Glu-A3 o* et extensibilité de la pâte (*G*) s'accompagne d'un IC à tendance positive ; à l'inverse, la relation entre présence de l'allèle *Glu-A3 m* et force boulangère (*W*) élevée s'accompagne d'un IC à tendance négative. Cette relation entre la charge et les paramètres de la qualité semble jouer en faveur de l'hypothèse d'un rôle fonctionnel pour les SG-FPM et suggère d'intégrer la variabilité des SG-HPM et des SG-FPM dans les programmes de sélection variétale pour une meilleure maîtrise des caractéristiques rhéologiques de la pâte boulangère ou biscuitière.

---

## REMERCIEMENTS

---

Cette recherche a été réalisée avec un financement de la Commission des communautés européennes dans le cadre du Programme ECLAIR AGRE 0052

"To Explore and Improve the Industrial Use of EC Wheats" (1991-1994). Les auteurs adressent leurs remerciements à Marie-Hélène MOREL et à Pierre FEILLET pour leur aide et leurs nombreux conseils au cours de la réalisation de ce travail.

Reçu le 24 avril 1995, révisé le 12 janvier 1996, accepté le 6 mars 1996.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRANLARD G., 1987. Prediction of bread wheat quality from HMW glutenins and gliadins. In: LÁSTITY R., BÉKÉS F., (eds), *Proc. 3rd Int. Workshop on Gluten Proteins*, Budapest, May 9-12, 604-612, World Scientific.
- BRANLARD G., DARDEVET M. 1985. Diversity of grain protein and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. *J. Cereal Sci.*, **3**, 345-354.
- BURNOUF T., BIETZ J.A., 1989. Rapid purification of wheat glutenin for reversed-phase high-performance liquid chromatography. Comparison of dimethyl sulfoxide with traditional solvents. *Cereal Chem.*, **66**, 121-127.
- DACHKEVITCH T., AUTRAN J.C., 1989. Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, **66**, 448-456.
- FULLINGTON J.G., MISKELLY D.M., WRIGLEY C.W., KASARDA D.D., 1987. Quality related endosperm proteins in sulfur-deficient and normal wheat grain. *J. Cereal Sci.*, **5**, 233-245.
- GAO L., NG P.K.W., BUSHUK W., 1992. Structure of glutenin based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chem.*, **69**, 452-455.
- GAZANHES V., MOREL M.H., AUTRAN J.C. 1991. The low-molecular-weight glutenin composition of French bread wheats glutenin and its effect on dough properties. *Cereal Foods World*, **36**, 723.
- GRAVELAND A., BOSVELD P., LICHTEN-DONK W.J., MARSEILLE J.P., MOONEN J.H.E., 1985. A model for the molecular structure of the glutenins from wheat flour. *J. Cereal Sci.*, **3**, 1-16.
- GUPTA R.B., SHEPHERD K.W., 1987. Genetic control of LMW glutenin subunits in bread wheat and association with physical dough properties. In: LÁSTITY R., BÉKÉS F., (eds), *Proc. 3rd Int. Workshop on Gluten Proteins*, Budapest, May 9-12, 13-19, World Scientific.
- GUPTA R.B., BÉKÉS F., WRIGLEY C.W., 1990 a. Predicting values of LMW glutenin alleles for dough quality of bread wheat. In: BUSHUK W., TKACHUK R., (eds), *Gluten proteins 1990*, 615-620, AACC, St Paul, Mn.
- GUPTA R.B., MACRITCHIE F., SHEPHERD K.W., ELLISON F., 1990 b. Relative contribution of LMW and HMW subunits to dough strength and dough stickiness of bread wheat. In: BUSHUK W., TKACHUK R. (eds), *Gluten proteins 1990*, 71-80, AACC, St Paul, Mn.
- GUPTA R.B., MACRITCHIE F., 1991. A rapid one step one dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin in wheat. *J. Cereal Sci.*, **14**, 105-109.
- HUEBNER F.R., BIETZ J.A., 1985. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **327**, 333-342.
- KASARDA D.D., 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality. In: POMERANZ Y. (ed), *Wheat is Unique: Structure, Composition, Processing, End-use Properties and Products*, 277-302, AACC, St Paul, Mn.
- KHAN K., BUSHUK W., 1979. Studies of glutenin XII. Comparison by SDS-PAGE of unreduced and reduced glutenin from various isolation and purification procedure. *Cereal Chem.*, **56**, 63-68.

- LAFIANDRA D., D'OVIDIO R., PORCEDDU E., MARGIOTTA B., COLAPRICO G., 1993. New data supporting high *Mr* glutenin subunits 5 as the determinant of quality differences among the pairs 5 + 10 vs. 2 + 12. *J. Cereal Sci.*, **18**, 197-205.
- MARCHYLO B.A., LUKOW O.M., KRUGER J.E., 1992. Quantitative variation in high molecular weight glutenin subunit 7 in some Canadian wheats. *J. Cereal Sci.*, **15**, 29-37.
- MELAS V., MOREL M.-H., FEILLET P., 1993. Les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire : des protéines d'avenir ? *Ind. Céréol.*, **84**, 3-14.
- MELAS V., MOREL M.-H., AUTRAN J.-C., FEILLET P., 1994. Simple and rapid method for purifying low-molecular-weight subunits of glutenin from wheat. *Cereal Chem.*, **71**, 234-237.
- MELAS V., 1994. Sous-unités gluténines de faible poids moléculaire du blé tendre. Variabilité génétique, caractérisation biochimique, relation avec la qualité technologique. Thèse de doctorat. Université Montpellier II, Sciences et techniques du Languedoc.
- METAKOVSKY E.V., 1991. Gliadin allele identification in common wheat II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet. Breed.*, **45**, 325-344.
- MOREL M.H., BONICEL J., MELAS V., AUTRAN J.C., 1994. Multiple approach (IEF, SDS-PAGE and A-PAGE) of the composition of LMW subunits of glutenin and its effect on dough properties. In : *Gluten Proteins 1993, Proceedings of the 5th International Gluten Workshop*, June 7-9, 1993, 244-254, Association of Cereal Research, Detmold.
- PAYNE P.I., CORFIELD K.G., BLACKMAN J.A., 1979. Identification of a high-molecular-weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theor. Appl. Genet.*, **55**, 153-159.
- PAYNE P.I., LAWRENCE G.J., 1983. Catalogue of alleles for the complex loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, **11**, 29-35.
- SHEWRY P.R., HALFORD N.G., TATHAM A.S., 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.*, **15**, 105-120.
- SINGH N.K., SHEPHERD K.W., 1985. The structure and genetic control of a new class of disulfide linked proteins in wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.*, **71**, 79-92.
- SINGH N.K., SHEPHERD K.W., 1988. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, **75**, 628-641.
- SINGH N.K., SHEPHERD K.W., CORNISH G.B., 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *J. Cereal Sci.*, **14**, 203-208.
- SUTTON K.H., 1991. Qualitative and quantitative variation among high molecular weight subunits detected by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.*, **14**, 25-34.
- WIESER H., SEILMEIER W., BELITZ H.D., 1989. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of ethanol-soluble and ethanol-insoluble reduced glutenin fractions. *Cereal Chem.*, **66**, 38-41.