# GUIDE PRATIQUE D'ANALYSES DANS LES INDUSTRIES DES CÉRÉALES

B. GODON, W. LOISEL
Coordonnateurs

COLLECTION
SCIENCES ET TECHNIQUES
AGROALIMENTAIRES

lavoisier
TEC & DOC

# 2

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

M.-F. SAMSON
J.-C. AUTRAN

# 1
# Introduction

Les propriétés remarquables des céréales, particulièrement des blés et des farines, en font des aliments de base pour la majeure partie de l'humanité. Néanmoins, notre connaissance des propriétés physico-chimiques de leurs principaux constituants, particulièrement de leurs protéines, est loin d'être complète.

Le fractionnement et la caractérisation des protéines de céréales sont, en effet, parmi les problèmes les plus complexes qui se soient posés aux biochimistes. Ces protéines sont très hétérogènes tout en ayant des caractéristiques de charge et de taille moléculaire voisines ; elles possèdent des propriétés de solubilité inhabituelles ; elles ont une forte tendance à s'agréger à la fois par l'intermédiaire de liaisons covalentes et non covalentes.

De nombreuses raisons existent pour s'intéresser au fractionnement, à l'isolement et à la caractérisation des protéines de céréales. Par exemple, la quantité et la nature des protéines exercent une influence directe sur la qualité des matières premières et leur évolution au cours des procédés de transformation. Plus particulièrement, la taille moléculaire des complexes protéiques est étroitement associée à la qualité boulangère des farines et aux caractéristiques rhéologiques des pâtes (Huebner et Wall, 1976), tout comme la présence de certaines sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) (Payne *et al.*, 1980). Si l'on parvient à identifier avec précision les polypeptides ou les motifs structuraux qui sont directement impliqués dans la qualité, alors la sélection de variétés améliorées est possible en utilisant ces polypeptides comme « marqueurs » de la qualité. Des protéines importantes au plan nutritionnel peuvent être également introduites dans les nouvelles variétés. Le fait que certaines familles de protéines constituent des marqueurs spécifiques des génotypes permet l'identification biochimique des variétés dans les lots commerciaux, tandis que les généticiens utilisent cette information pour détecter des régions chromosomiques spécifiques telles que celles introduites par des espèces étrangères pour apporter des caractéristiques agronomiques ou technologiques améliorées. Finalement, la connaissance des protéines de céréales et de leurs propriétés conduit à des méthodes précieuses d'identification, de classification et de contrôle de la qualité (Bietz, 1986).

Malgré les difficultés rencontrées, d'immenses progrès ont été accomplis ces dernières années dans les méthodes de séparation et de caractérisation des protéines de céréales, particulièrement celles appliquées aux protéines du *gluten* de blé, dénommées schématiquement *gliadines* et *gluténines* depuis les travaux d'Osborne (1907) :

En *électrophorèse*, les protéines traversent une matrice poreuse (gel de polyacrylamide, gel d'amidon) sous l'action d'un champ électrique. Les protéines possédant des vitesses de migration différentes (en raison de différences dans leur taille moléculaire et/ou de leur composition en acides aminés chargés)



vont pouvoir se séparer et être détectées en des emplacements différents. Les protéines de céréales se séparent ainsi en un grand nombre de polypeptides visualisés sous la forme d'un diagramme de « bandes », ou une carte de « spots », caractéristiques de l'échantillon analysé.

En *chromatographie liquide*, c'est un flux de solvant qui permet le transport des protéines au travers d'une colonne contenant le support chromatographique, support avec lequel elles sont susceptibles d'interagir à des degrés divers, en raison de leur taille, de leur charge électrique, ou encore de leurs caractéristiques d'hydrophobicité. Trois principaux types de chromatographie (dont la présentation sera détaillée au § 2.2 ci-dessous) ont été ainsi appliqués aux protéines de céréales :

- la chromatographie d'exclusion-diffusion ;
- la chromatographie d'échanges d'ions ;
- la chromatographie en phase inverse.

Au cours des dernières années, des types entièrement nouveaux de colonnes chromatographiques ont été inventés, utilisant le plus souvent des supports de silice. Ces nouvelles colonnes, de petite taille, chimiquement stables, supportant des pressions élevées, ont permis d'obtenir des séparations jusque là inégalées en des temps très courts. On assista alors à un développement considérable de nouvelles techniques chromatographiques, appelées « chromatographie liquide à haute pression », ou « chromatographie liquide à haute performance » (HPLC).

A l'origine, l'HPLC ne pouvait être utilisée que sur des constituants de faible poids moléculaire (lipides, pigments, vitamines, acides aminés, etc.). Jusque vers 1982, aucun fabricant ne proposait de colonne qui soit en mesure de séparer des protéines car, au delà d'un poids moléculaire de 10 000, les protéines ne pouvaient pas pénétrer dans le support ou s'y adsorbaient de façon irréversible. Ce n'est que vers 1983-1984 que des colonnes à larges pores (300 Å ou davantage) sont devenues disponibles, permettant de réaliser des séparations HPLC des protéines à partir de leurs caractéristiques de taille, de charge ionique, ou d'hydrophobicité (Barford, 1988 ; Mant et Hodges, 1991).

Dans le domaine des céréales, l'HPLC a pu être utilisée pour la caractérisation ou le dosage de la plupart des constituants des grains et des farines, particulièrement les protéines (Bietz, 1986 ; Kruger et Bietz, 1994), mais aussi les autres constituants (amidon, lipides, vitamines, acide férulique, acide phytique, aflatoxine, etc.). Comme l'analyse de ces divers constituants est traitée dans d'autres chapitres de l'ouvrage, notre chapitre sera centré sur la caractérisation des constituants protéiques.

Dans une première partie, nous rappellerons le principe des principales techniques chromatographiques, sans toutefois détailler les aspects très théoriques (pour lesquels nous renvoyons au chapitre *Chromatographie* de Lorient *et al.* (1991)). Dans une seconde partie, nous décrirons les principaux systèmes HPLC (colonnes, instrumentation). Dans la dernière partie, nous développerons les applications pratiques des techniques d'HPLC à la caractérisation des protéines des grains et des farines de céréales.

# 2 Généralités sur les techniques chromatographiques

## 2.1 PRINCIPE

Il s'agit de la réalisation d'un tri entre les différentes espèces moléculaires d'un mélange. On va ainsi forcer toutes les molécules à effectuer un parcours commun parsemé d'obstacles : certaines espèces le franchiront aisément, d'autres avec difficulté. A l'arrivée, il y aura échelonnement. Pour entraîner les molécules, il faut les véhiculer dans un fluide, la *phase mobile*, qui peut être soit un liquide, soit un gaz. L'obstacle à franchir, qui ne doit pas être entraîné par la phase mobile, doit être fixe et produire des effets reproductibles. Il constitue la *phase stationnaire*. Cette phase stationnaire, le plus souvent emprisonnée dans une *colonne*, peut être un solide, ou un liquide immobilisé sur un solide.

Les facteurs qui contrôlent la séparation sont surtout d'ordre thermodynamique : la rétention de l'échantillon sur la colonne est donc contrôlée thermodynamiquement. En pratique, la séparation idéale n'est pas réalisable : il se produit en effet un élargissement des bandes en raison surtout des phénomènes de diffusion. Les facteurs qui contrôlent la diffusion sont surtout de nature cinétique et peuvent être considérés indépendamment des facteurs thermodynamiques qui influencent la rétention.

Les performances séparatives de la chromatographie dépendent par ailleurs d'un certain nombre de paramètres. Le premier à prendre en considération est la nature des constituants à séparer et leurs caractéristiques intrinsèques. En fonction des caractères prédominants, il sera alors possible de choisir le type de chromatographie le plus adapté, ou les meilleures combinaisons chromatographiques. Le deuxième paramètre à considérer est le degré de « contamination » du constituant à séparer (concentration relative par rapport aux constituants à éliminer). Le troisième paramètre important est la concentration de la protéine dans le milieu ainsi que le pH et la force ionique de ce dernier (Cuq, 1988).

## 2.2 CLASSIFICATION DES MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

On a l'habitude de classer les méthodes chromatographiques, soit selon la nature des phases (exemple : phase liquide, phase gazeuse, gaz/solide, liquide/liquide, etc.), soit selon la technique mise en jeu (chromatographie sur colonne, chromatographie sur couche mince, etc.), soit enfin selon les phénomènes mis en jeu. C'est cette dernière classification que nous détaillerons. Elle



permet en effet de distinguer les 5 types suivants de méthodes chromatographiques (parmi lesquels 3 seulement ont été utilisés dans le cas des protéines de céréales : cf. § 2.3 ci-dessous) :

### 2.2.1 CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

C'est la plus ancienne et sans doute la mieux connue. La séparation entre les molécules est fondée sur le processus répété d'adsorption et de désorption de la phase stationnaire. Il s'agit d'une chromatographie liquide-solide (CLS).

### 2.2.2 CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGES D'IONS

La phase stationnaire est ici un solide à la surface duquel se trouvent des groupements ionisés. Un soluté ionisé de charge opposée (par exemple, une protéine) se trouvera d'autant plus retenu que sa charge (opposée à celle de la phase stationnaire) sera plus forte. Il n'y a pas de phase stationnaire idéale (tout ion a forcément un support), de sorte qu'il existe toujours plus ou moins un phénomène d'adsorption dans cette chromatographie. La phase stationnaire solide, ou matrice, est généralement poreuse et renferme dans ses pores une phase liquide qui peut jouer un rôle très important dans les séparations. On peut ainsi parler pour ce type de chromatographie de CLS, mais aussi de CLL (chromatographie liquide-liquide).

### 2.2.3 CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

La séparation est fondée sur les différences de solubilité des molécules entre phase mobile et phase stationnaire liquide (phase qui, en fait, imprègne ou est greffée sur un solide). Il s'agit alors de chromatographie liquide-liquide (CLL). Cette technique revient à multiplier les partages entre phases de la même façon que si l'on disposait de plusieurs milliers d'ampoules à décanter contenant deux solvants non miscibles.

### 2.2.4 CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION OU CHROMATOGRAPHIE DE PERMÉATION SUR GEL OU ENCORE DE « FILTRATION SUR GEL »

La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle des molécules à séparer. Celles qui sont trop volumineuses pour pénétrer dans les pores sont exclues de la phase stationnaire et sont éluées les premières, les autres étant plus ou moins retardées. Ici encore, on peut parler indifféremment de CLS ou de CLL.

### 2.2.5 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Très utilisée par les biochimistes, elle consiste à fixer sur la phase stationnaire un type de molécule capable de reconnaître une autre molécule avec une affi-

nité très élevée. On va greffer, par exemple, une enzyme, qui va complexer sélectivement le substrat correspondant (ou *vice versa)*, on encore un anticorps, qui reconnaîtra l'antigène correspondant dans la phase mobile.

## 2.3 ÉTUDE PLUS DÉTAILLÉE DES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN USAGE POUR LES CONSTITUANTS DES BLÉS ET DES FARINES

### 2.3.1 CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGES D'IONS

La phase stationnaire est ici un support insoluble contenant des groupements chargés. Ceux d'un certain type sont fixés car liés chimiquement, les autres de signe opposé étant mobiles. Ces derniers peuvent être échangés réversiblement avec d'autres ions de même charge sans aucun changement de la partie insoluble.

Les groupes ioniques fixes déterminent le type et la force de l'échangeur. Leur nombre et leur accessibilité déterminent la capacité. Le pH de la phase mobile est ici le paramètre principal de la rétention. La nature et la concentration du contre-ion sont également importantes puisqu'elles déterminent la force d'élution du tampon utilisé pour « décrocher » les protéines.

Les principaux groupements fonctionnels utilisés sont de type : sulfonate, phosphonate, ou carboxylate pour les échangeurs de cations, et de type : ammonium quaternaire, tertiaire ou secondaire pour les échangeurs d'anions. Les groupes de type sulfonate ou ammonium quaternaire sont des échangeurs d'ions forts, les autres, des échangeurs faibles.

Il existe par ailleurs différents types de matrices : type polystyrène, dextrane, agarose, cellulose et silice. Les plus utilisées ont longtemps été les CMC (carboxyméthyl celluloses), SEC/SPC (sulfoéthyl- ou sulfopropyl-celluloses), pour les échangeurs de cations, et les DEAE (diéthylaminoéthyl-celluloses) pour les échangeurs d'anions.

### 2.3.2 CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTIONS HYDROPHOBES

Dans cette technologie, les constituants sont séparés sur la base de leurs différences d'hydrophobicité de surface grâce à un support non chargé et possédant des groupes hydrophobes aliphatiques (colonnes de type octyl – ou butyl-Sepharose), ou aromatiques (phényl-Sepharose). Ce type de séparation est applicable à la plupart des protéines car celles-ci renferment toujours des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe suffisamment exposés pour permettre des interactions avec un support hydrophobe. Cette chromatographie utilise une colonne remplie d'un gel et équilibrée dans des conditions qui favorisent les interactions hydrophobes, par exemple une force ionique élevée. Après dépôt de l'échantillon, l'élution est généralement réalisée en appliquant un gradient descendant de concentration saline qui permet de désorber les protéines dans un ordre croissant d'hydrophobicité de surface.



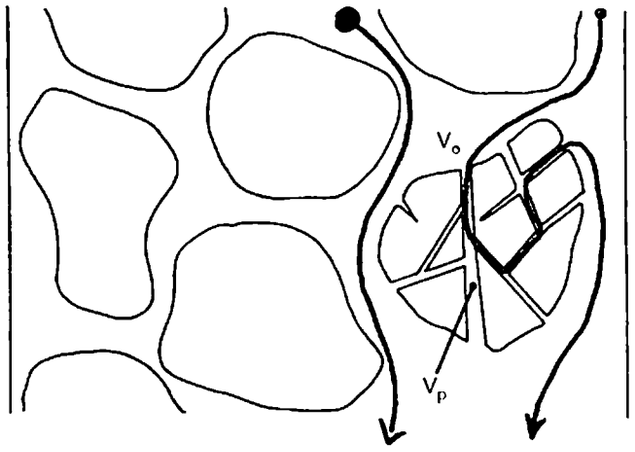
Au contraire, dans la chromatographie à polarité de phases inversées (la plus fréquemment utilisée en HPLC, sous le nom de HPLC en phase inverse, ou en phase « réverse » : RP-HPLC), la phase stationnaire est de nature apolaire (chaînes aliphatiques) et la phase mobile est constituée par un liquide polaire (eau, méthanol).

De nombreuses colonnes ont été utilisées. Initialement, on a développé des colonnes de 25 cm, avec une phase stationnaire greffée en $C_{18}$ constituée de particules de 5 ou 10 µm et comportant des pores de 300 Å. Ultérieurement, la tendance a été d'utiliser des chaînes aliphatiques plus courtes : $C_8$ ou $C_4$, des particules plus grosses et des colonnes plus courtes qui autorisent des débits plus élevés, des pentes de gradients plus fortes, sans perte de résolution. Des températures plus élevées (obtenues grâce à des fours à colonnes réglés à 50, 60, et même 70 °C) améliorent aussi très sensiblement la résolution.

Les conditions les plus classiques actuellement utilisées avec les protéines des céréales font appel à une phase mobile composée d'acétonitrile 20 % (ACN) contenant 0.1 % d'acide trifluoroacétique (TFA). L'ACN a l'avantage de posséder une faible viscosité et d'être transparent aux ultraviolets, permettant une détection à 210 nm. Le TFA est un acide organique hydrophobe qui accroît l'hydrophobicité des protéines et améliore leur discrimination grâce à un accroissement des temps de rétention. Il contribue à la solubilisation des protéines et à l'amélioration du rendement des colonnes. Sa concentration optimale est cependant difficile à déterminer car, en léger excès, s'il peut améliorer la solubilité et la résolution des courbes, il peut entraîner une déformation de la ligne de base, ainsi qu'une désamidation des protéines. Dans ce système, l'élution des différentes protéines est généralement assurée par un simple gradient linéaire d'ACN, de 20 à 55 %, le tout réalisé en 55 minutes à 50 ou 60 °C.

### 2.3.3 CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

La chromatographie d'exclusion-diffusion est fondée sur la rétention des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration ou non dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si l'on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulaire, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores : elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer statistiquement dans un plus grand nombre de pores. Les grosses molécules sont éluées par un volume $V_o$ qui correspond au volume entre les « grains » de la phase stationnaire, ou « volume mort » de la colonne. Les très petites molécules pénètrent dans le réseau du gel et sont éluées par un volume $V_t$ égal au volume total de solvant contenu dans la colonne (Figure 1). La séparation est donc fondée ici, non sur des interactions physico-chimiques avec la phase stationnaire, mais sur la dimension des molécules en solution (CUQ, 1988). Entre les deux cas limites, celui où les molécules sont totalement exclues, et celui où tous les pores de la phase stationnaire sont accessibles aux molécules considérées, le volume de rétention d'une molécule varie linéairement en fonction du volume poreux accessible. Ainsi, à chaque valeur de ce volume de rétention correspond théori-




■ **Figure 1** **Représentation schématique du cheminement de deux molécules protéiques différentes au cours d'une chromatographie d'exclusion-diffusion**

*Le coefficient de partition chromatographique K est égal au rapport (Ve-Vo)/(Vt-Vo), où Ve est le volume d'élution mesuré, Vo, le volume mort de la colonne ou volume d'exclusion et Vt, le volume total de la colonne, c'est-à-dire Vo+Vp (volume des pores).*

quement une taille de molécule. D'où l'utilisation de la technique pour la détermination des masses moléculaires.

Plusieurs types de gels peuvent être utilisés. On distingue les gels mous, semi-rigides et rigides. Seuls ces derniers sont utilisables avec des vitesses de phase mobile élevée (FPLC, par exemple).

Les gels mous sont constitués de polymères à faible taux de pontage, pour lesquels le gonflement est important. Il s'agit le plus souvent de dextranes (gels de type Sephadex G), parfois de polyacrylamide ponté par du méthylène-*bis*-acrylamide (Biogels P), d'agarose (Sepharose et Biogels A) ou de gels mixtes polyacrylamide-agarose (Ultrogels) ou polyacrylamide-dextranes (Sephacryl).

Les gels semi-rigides sont constitués de polystyrène ou d'acétate de polyvinyle.

Les gels rigides sont constitués par des silices poreuses (exemple : les gels TSK) ou des verres poreux. Résistants aux hautes pressions, ces gels sont utilisables en HPLC.

A la condition de travailler avec une force ionique suffisante, les problèmes d'adsorption irréversible sont limités avec ces types de supports. Les rendements de récupération sont généralement très élevés, beaucoup plus qu'avec la chromatographie d'échanges d'ions. Le pH de la phase mobile reste cependant souvent un paramètre critique : les colonnes HPLC de type TSK SW doivent être impérativement maintenues à des pH inférieurs à 7,0 (fonte du support silice au delà de pH 7,5 avec destruction immédiate de la colonne). En revanche, les colonnes de polymères hydrophiles TSK PW supportent une gamme étendue de pH, mais elles ne sont pas nécessairement adaptées au fractionnement des protéines.



# 3
# Description des systèmes de chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

## 3.1 EN QUOI L'HPLC SE DISTINGUE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE CLASSIQUE ?

L'HPLC se distingue de la chromatographie liquide classique par :

- le remplissage des colonnes qui est fait avec un matériau composé de particules très fines (3 à 10 µm) ;
- les colonnes sont de petite taille, réutilisables, d'environ 2 à 20 mm de diamètre et de 10 à 30 cm de longueur ;
- la pression d'entrée est élevée et le contrôle du débit de la phase mobile est très strict ;
- les dispositifs d'introduction de l'échantillon, très précis, ne nécessitent que de faibles quantités ;
- les détecteurs fonctionnent en continu et permettent la détection de quantités très petites ;
- les appareils sont automatisés ;
- les analyses sont rapides : quelques dizaines de minutes ou même quelques minutes ;
- la résolution est beaucoup plus élevée ;
- la transposition analytique / préparative est aisée : les analyses effectuées en chromatographie classique sont, la plupart du temps, réalisables en HPLC et, avec cette dernière, les purifications obtenues sont très supérieures et le temps d'exécution beaucoup plus court. (Bietz, 1986)

## 3.2 LA COLONNE : LE CŒUR DU PROCÉDÉ

La séparation proprement dite est liée essentiellement à la nature et aux caractéristiques de la colonne. Sans entrer dans le détail théorique, rappelons que le pouvoir de résolution d'une colonne dépend de trois facteurs : *l'efficacité*, exprimée en nombre de plateaux théoriques par mètre, reflète la finesse des pics des composés sortant de la colonne ; la *sélectivité* indique l'aptitude du système à les séparer, tandis que le *facteur de capacité* définit les temps de rétention des composants du mélange (Guillot, 1986).

### 3.2.1 TYPES DE PHASES STATIONNAIRES

Il existe aujourd'hui des centaines de phases stationnaires distribuées par des dizaines de fabricants. Notons parmi elles, l'importance toute particulière prise par les phases de silice greffée par des groupes X-Si-$C_n$. X est un chlorure par exemple qui effectue le greffage par réaction avec les silanols libres de la silice avec formation d'une liaison siloxane. Lorsque $C_n$ est un groupe apolaire hydrocarbure comptant de 1 à 18 atomes de carbone, ou terminé par un groupement benzénique, la silice ainsi modifiée permet d'effectuer des chromatographies en phase inverse où l'élution se fait par des solvants polaires eau, méthanol, acétonitrile principalement.

Si la plupart des phases stationnaires maintenant classiques sont préparées à partir de silice, certaines utilisent des supports polymériques – résines de Toyo Soda™, résines pour FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de Pharmacia, résines pelliculaires de Dionex par exemple. Cette innovation trouve son application dans le domaine des chromatographies d'échanges d'ions et d'exclusion-diffusion : elles peuvent travailler dans une gamme plus large de pH et, pour certaines d'entre elles, être nettoyées à la soude diluée, assurant ainsi à l'utilisateur l'élimination totale de résidus entre deux séparations.

Le greffage sur silice autorise la fixation de toutes sortes de molécules permettant la séparation de produits aux propriétés extrêmement voisines : colonnes chirales, grâce auxquelles on obtient la séparation de mélanges racémiques, ou de cyclodextrines, intéressant notamment les secteurs de la chimie fine et de la pharmacie.

### 3.2.2 DIAMÈTRE DES PARTICULES. LONGUEUR ET DIAMÈTRE DE LA COLONNE

D'autres paramètres que la phase stationnaire interviennent également dans l'optimisation du choix de la colonne : diamètre des particules, longueur et diamètre intérieur de la colonne. La colonne est d'autant plus efficace que le diamètre des particules est plus faible et qu'elle est plus longue. Mais l'allongement augmente les volumes de solvant et les temps d'analyse, tandis que la diminution de taille des particules entraîne une perte de charge importante. Pour fixer un ordre de grandeur, on peut utiliser des colonnes d'environ 25 cm de long pour des particules de 5 à 10 µm, ou de 10 à 15 cm de long pour des particules de 3 µm.

Le diamètre intérieur est choisi en fonction des quantités de produit injectées. En HPLC analytique, le diamètre le plus courant est de 4,6 mm. Il est beaucoup plus délicat d'utiliser des colonnes de 2 mm : des particules pas trop fines doivent alors être utilisées pour réduire les risques de colmatage et de pressions trop élevées.

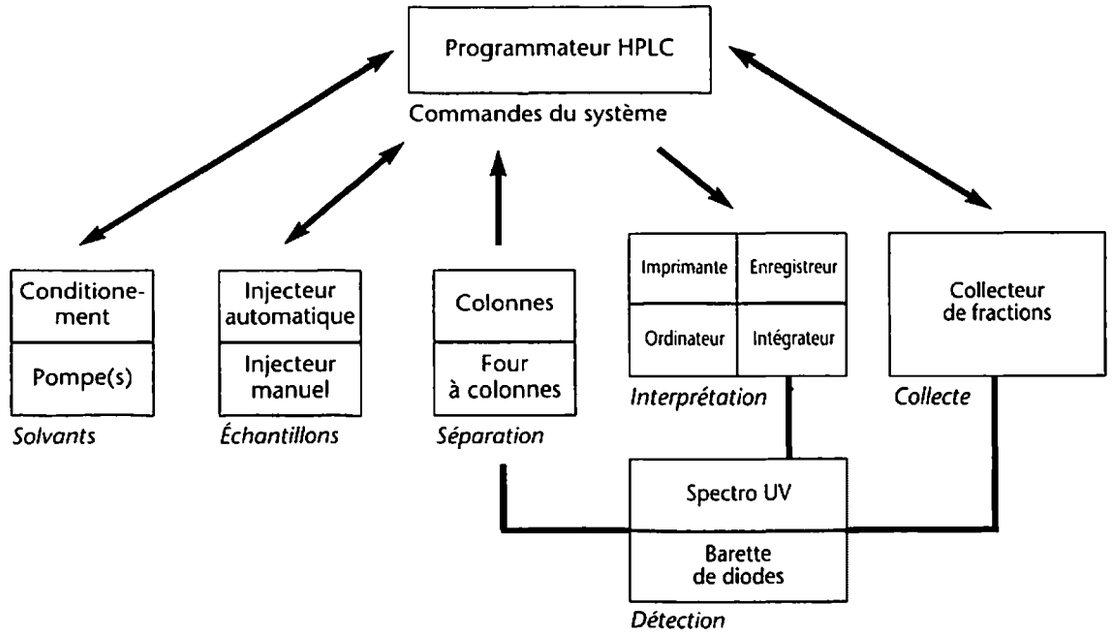
Si l'HPLC est une méthode puissante, elle est aussi onéreuse en consommables : quantités importantes de solvants d'un haut degré de pureté, colonnes dont la durée de vie est limitée. Les fabricants s'emploient à y remédier : mise au point de colonnes plus courtes, amélioration de leur longévité, services qui proposent le reconditionnement des colonnes (changement de la phase stationnaire).



### 3.2.3 L'INSTRUMENTATION

Comme pour les méthodes de séparation et les types de colonnes, il existe un large choix dans le domaine des appareillages. Aujourd'hui, le constructeur doit en effet répondre à deux demandes spécifiques des chromatographistes, demandes qui impliquent deux démarches totalement différentes. D'une part, les milieux biochimiques et biologiques souhaitent pouvoir analyser des quantités de plus en plus faibles de produits ; d'autre part, les industriels de la chimie fine et de la pharmacie considèrent, depuis quelques années que l'HPLC peut être une méthode économiquement justifiable de séparation et de purification de molécules à haute valeur ajoutée.

Le trait commun à l'ensemble de ces systèmes est d'être modulaire (*figure 2*). On compose son HPLC un peu comme on le ferait pour une chaîne haute fidélité, soit en choisissant les divers éléments dans la gamme d'un constructeur selon l'application spécifique, soit en associant des éléments provenant de constructeurs différents et en la complétant en fonction des nécessités et des impératifs budgétaires (Guillot, 1986).




■ **Figure 2** **Schéma d'un système d'HPLC**

**Les pompes**

Débit, pression, mode d'élution – isocratique ou gradient – sont conditionnés par les systèmes de pompes. L'évolution des technologies a permis d'étendre la gamme des débits vers les faibles valeurs, tout en maintenant le flux le plus constant possible et en minimisant les volumes morts. En fonction des constructeurs on trouve des systèmes intégrés ou modulaires (dissociation des têtes et des corps de pompe), des pompes mono ou multiples pistons, des pompes biocompatibles (en titane, en céramique, ou en matériau synthétique,

bien que bon nombre de spécialistes pensent, qu'à moins d'utiliser des milieux très corrosifs, le risque de relargage d'impuretés métalliques par l'acier inoxydable soit négligeable).

Naturellement, le choix et le nombre des pompes sont liés au mode de gradient. Pour un gradient haute pression, une pompe par solvant et une chambre de mélange en aval sont exigées. Pour un gradient basse pression on doit interposer des vannes proportionnelles entre les flacons de solvant et la pompe. L'utilisation de gradient requiert aussi l'acquisition d'un module de programmation piloté par microprocesseur.

### L'injection

Pour éviter de mobiliser les personnes par des tâches fastidieuses d'injection au moyen de seringues (un échantillon après l'autre), des systèmes d'injection automatique ont été mis au point, pilotés par microprocesseur, qui permettent, grâce à des boucles d'injection (de quelques $\mu$l en HPLC analytique à quelques ml en préparative), de faire fonctionner les appareils 24 heures sur 24 et d'améliorer considérablement la répétabilité des résultats.

Les échantillons injectés automatiquement ont fréquemment besoin d'être pré purifiés. Cela peut généralement se résoudre par l'addition de précolonnes et/ou par la filtration des extraits sur membranes de 0,45 $\mu$m. Dans d'autres cas, cela peut nécessiter des opérations plus compliquées : emploi de cartouches de silices à phase greffée qui permettent de retenir les impuretés, ces cartouches étant ensuite transférées dans le système HPLC où elles deviennent l'équivalent de boucles d'injection.

### Les détecteurs

La détection des composés à la sortie de la colonne, point crucial de l'HPLC, peut mettre en jeu différents principes :

La *spectrophotométrie UV-visible* qui permet de détecter les molécules possédant un chromophore, constitue le moyen de détection le plus classique en HPLC. On dispose aujourd'hui de spectrophotomètres programmables qui offrent des possibilités de mesure à plusieurs longueurs d'ondes et à différentes échelles d'absorption pour un même chromatogramme. Les meilleurs d'entre eux sont capables de détecter l'ordre de grandeur de la picomole ($10^{-12}$ mole). Ils donnent également le rapport d'absorption entre deux longueurs d'onde — information sur la pureté du produit — et permettent parfois l'enregistrement instantané des spectres — confirmation du choix de la longueur d'onde optimale. Le *nec plus ultra* dans le domaine est le spectrophotomètre à barrettes de diode, qui grâce à une lecture simultanée des intensités lumineuses à toutes les longueurs d'onde comprises entre 200 et 600 nm, fournit une information double — absorption en fonction du temps et de la longueur d'onde — permettant d'obtenir des chromatogrammes tridimensionnels et d'optimiser très rapidement les conditions chromatographiques (Guillot, 1986).

Bien que d'une extrême sensibilité (jusqu'à 30 femtomoles : $10^{-15}$ mole), la *fluorométrie* est d'un emploi moins généralisé. On rappelle qu'en fluorescence,

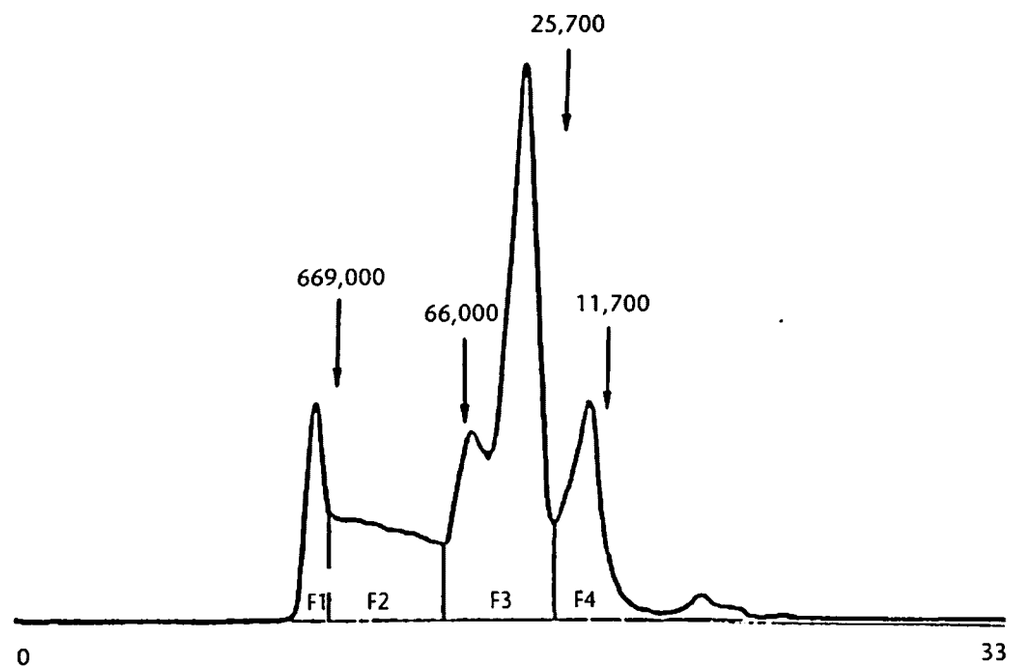


la solution est excitée à une longueur d'onde qui est en général celle de son maximum d'absorption. Une partie de l'énergie acquise par l'absorption de photons va alors se dissiper sous forme non radiative durant le temps de vie de l'état excité. L'énergie d'émission sera donc plus faible, ce qui explique que la longueur d'onde d'émission sera toujours plus grande que celle de l'excitation. La quantification des signaux obtenus exige cependant beaucoup de précautions car l'intensité de fluorescence n'obéit pas à la loi de Beer. L'inconvénient majeur de la méthode est cependant lié au nombre relativement faible de molécules qui fluorescent naturellement, amenant à mettre au point des systèmes de dérivation (réaction entre le composé à détecter et une substance chimique qui lui confère les propriétés optiques dont il est dépourvu).

D'autres techniques de détection ont été développées (indice de réfraction, conductimétrie, infra-rouge, radioactivité,...), mais ne seront pas détaillées ici, leur domaine d'application étant davantage celui des sucres, des phénols, des vitamines ou des pesticides.

### Intégration des pics et expression des résultats

Le profil d'élution des chromatogrammes (absorbance en fonction du temps de rétention) est enregistré.




**■ Figure 3 Exemple de profil d'élution en SE-HPLC des protéines extraites d'une farine de blé par le tampon phosphate de sodium 0,1 *M*, SDS 0,1 %, pH 6,9**

*Les positions d'élution des standards de poids moléculaire (respectivement : thyroglobuline, sérum albumine bovine, chymotrypsinogène A et cytochrome c) sont indiquées.*

En SE-HPLC, l'analyse en série de standards de poids moléculaire connus (exemples : thyroglobuline, 669 000 ; sérum albumine bovine, 66 000 ; chymotrypsinogène A, 25 700 et cytochrome c, 11 700) permet de calibrer la

colonne et de définir avec précision les limites des fractions du chromatogramme (*figure 3*). La surface de chacune des fractions du chromatogramme, calculée automatiquement grâce à des logiciels d'intégration de courbes, parfois après certaines interventions manuelles pour sélectionner le début et la fin d'une zone que l'on souhaite plus particulièrement quantifier. La surface de chacune des fractions est exprimée en unités d'absorbance x seconde, qui peuvent être converties en pourcentage de la surface totale du chromatogramme. Les courbes complètes peuvent être éventuellement corrigées et normalisées par traitement informatique comme l'ont décrit Sapirstein *et al.* (1989) et Scanlon (1994).

### Appareillages développés pour l'étude de biomolécules spécifiques

Certains constructeurs ont adopté une approche consistant à mettre au point un matériel ou une technique spécifiquement adapté aux demandes des biochimistes et des biologistes. Ainsi, pour la séparation de protéines et d'enzymes, Pharmacia a développé un système de FPLC entièrement biocompatible (tubes en Téflon, système de pompes à deux seringues de verre fonctionnant en opposition) qui a à la fois une vocation analytique et préparative. Les colonnes contiennent des phases constituées de particules macroporeuses et de diamètres très uniformes – sur supports polymères en échanges d'ions et perméation en gel, sur silice en phase inverse. Applied Biosystems a de son côté développé des HPLC adaptées aux problèmes de purification des peptides, protéines et oligonucléotides (avant séquençage), ainsi que d'analyse des composés issus du séquenceur, avec une limite d'analyse qui peut atteindre 0.1 picomole.

# 4
# Application aux constituants protéiques des grains et des farines de céréales

## 4.1 GÉNÉRALITÉS SUR LES PROTÉINES DES CÉRÉALES

De toutes les protéines végétales, celles du blé sont certainement les plus importantes aux plans nutritionnel (140 000 tonnes de ces protéines sont consommées chaque jour dans le monde) et fonctionnel (en raison de leur propriété unique de se rassembler sous la forme d'un gluten, propriété qui détermine le caractère panifiable ou pastifiable des blés). Les protéines du blé et des autres céréales sont cependant plus difficiles à étudier que celles de nombreux tissus végétaux ou animaux. La majeure partie des protéines du grain de blé sont en effet des protéines de réserve, insolubles dans l'eau ou les solutions salines, et seulement extractibles par des alcools dilués (gliadines), ou par des acides, bases, détergents, agents dissociants ou réducteurs (gluténines). La

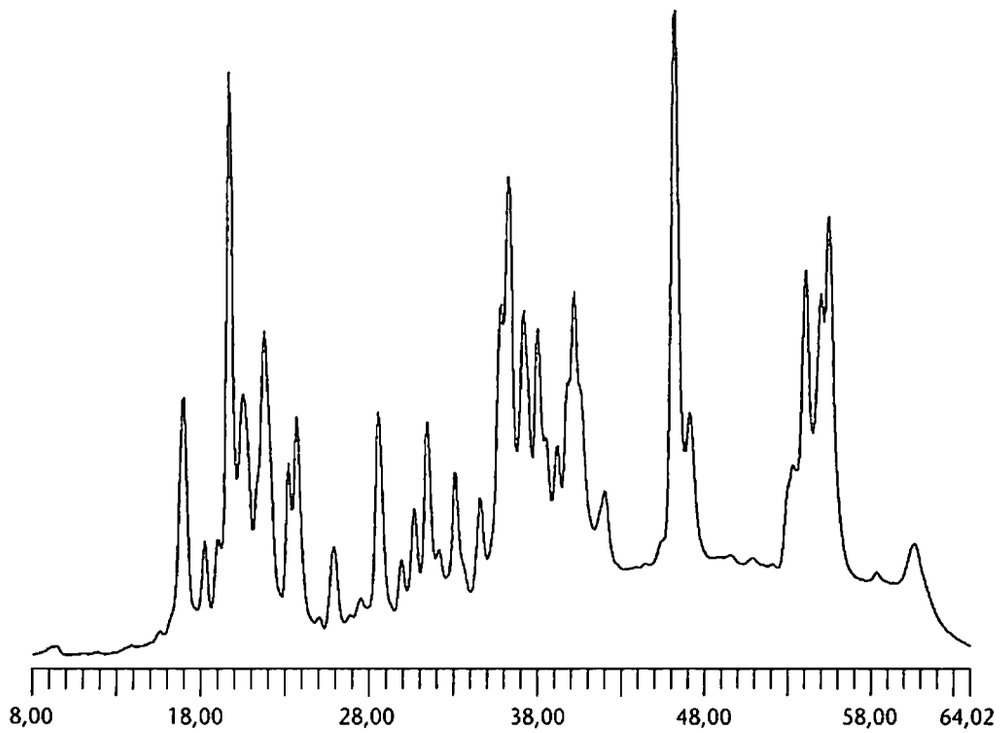


composition en acides aminés inhabituelle de ces protéines (richesse considérable en glutamine, proline et glycine), associée à une forte tendance à former des agrégats de taille très élevée par des interactions non covalentes, ou par des liaisons disulfures, explique leurs propriétés de solubilité particulières et rend inutilisables de nombreuses méthodes analytiques. Les protéines du blé sont également très hétérogènes en raison de : 1) la polyploïdie des blés, 2) l'existence de nombreux polypeptides homologues à la suite de duplications de gènes et de mutations intervenues chez les ancêtres des blés ainsi qu'au cours de leur phylogenèse, 3) l'existence de modifications post-traductionnelles. A titre d'exemple, la gliadine et la gluténine sont constituée chacune d'au moins 100 polypeptides. Une telle hétérogénéité, associée à de nombreuses homologies structurales, placent les protéines du blé parmi les protéines végétales les plus complexes à isoler et caractériser.

## 4.2 CARACTÉRISATION DES PROTÉINES DU BLÉ

Les protéines déterminent pour une large part les qualités technologique et nutritionnelle des céréales et des produits céréaliers. Leur étude revêt donc une importance considérable, que ce soit pour la sélection des variétés, le commerce ou l'utilisation industrielle. La possibilité de fabriquer des colonnes d'HPLC capables de séparer des protéines de taille élevée, telles que les protéines de réserve des céréales, est à l'origine du développement d'une méthodologie nouvelle et particulièrement performante pour le chimiste céréalier, pouvant surpasser la plupart des techniques classiques de purification et de caractérisation des protéines. En fait, trois types d'HPLC ont été utilisés en fonction des problèmes étudiés : l'HPLC en phase inverse (RP-HPLC) – la plus répandue dans le monde -, l'HPLC d'exclusion-diffusion (SE-HPLC) – qui a été largement étudiée en France – et l'HPLC d'échanges d'ions (IE-HPLC) qui a été très peu utilisée.

La RP-HPLC est devenue l'une des plus puissantes méthodes de caractérisation des protéines du blé. Grâce aux travaux d'optimisation accomplis par Bietz (1983, 1986) et Marchylo (1994), la résolution obtenue à partir des gliadines du blé s'est avérée égale ou supérieure à celle des autres techniques existantes. Par la suite, la technique a été encore affinée pour l'étude particulière des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (Burnouf et Bietz, 1984 ; Bietz et Kruger, 1994). Ainsi, la séparation d'une gliadine de blé sur une colonne $C_{18}$ à 60 °C ne donne pas moins de 40 pics, dépassant la résolution habituelle des électrophorèses (*figure 4*). Comme plusieurs de ces pics ne sont pas électrophorétiquement purs car ils renferment plusieurs composants de charge ou de taille différente, il apparaît que l'électrophorèse et la RP-HPLC restent des outils complémentaires. Popineau et Pineau (1987) et Popineau (1994) ont également examiné l'hydrophobicité de surface de gliadines purifiées et de peptides par RP-HPLC, et ont comparé les résultats à ceux de la chromatographie classique d'interactions hydrophobes. Les deux méthodes ont conduit aux mêmes interprétations, mais la RP-HPLC s'est avérée nettement plus résolutive.




■ **Figure 4** **Exemple de courbe d'élution des gliadines de blé (variété Talent) en RP-HPLC**

Toutefois, la RP-HPLC, de même que l'électrophorèse en gel, ne permet pas d'étudier les complexes protéiques de taille élevée car elle ne permet de séparer que des monomères ou des sous-unités préalablement réduites. Pour toutes les applications relative à la structure ou à la conformation des protéines, à leur profil de tailles moléculaires, à leurs relations avec les propriétés fonctionnelles en technologie, c'est donc la chromatographie SE-HPLC qui doit être utilisée (Autran, 1994) (*figure 3*). La SE-HPLC peut en effet séparer des complexes de taille relativement élevée (PM 1 000 000) et d'obtenir certaines informations sur les bases physico-chimiques de la qualité des céréales au travers du degré d'agrégation des protéines, de la contribution de chaque sous-unité protéique aux différentes tailles d'agrégats, de l'évolution du niveau d'agrégation au cours de la maturation du grain ou au cours des procédés industriels de transformation.

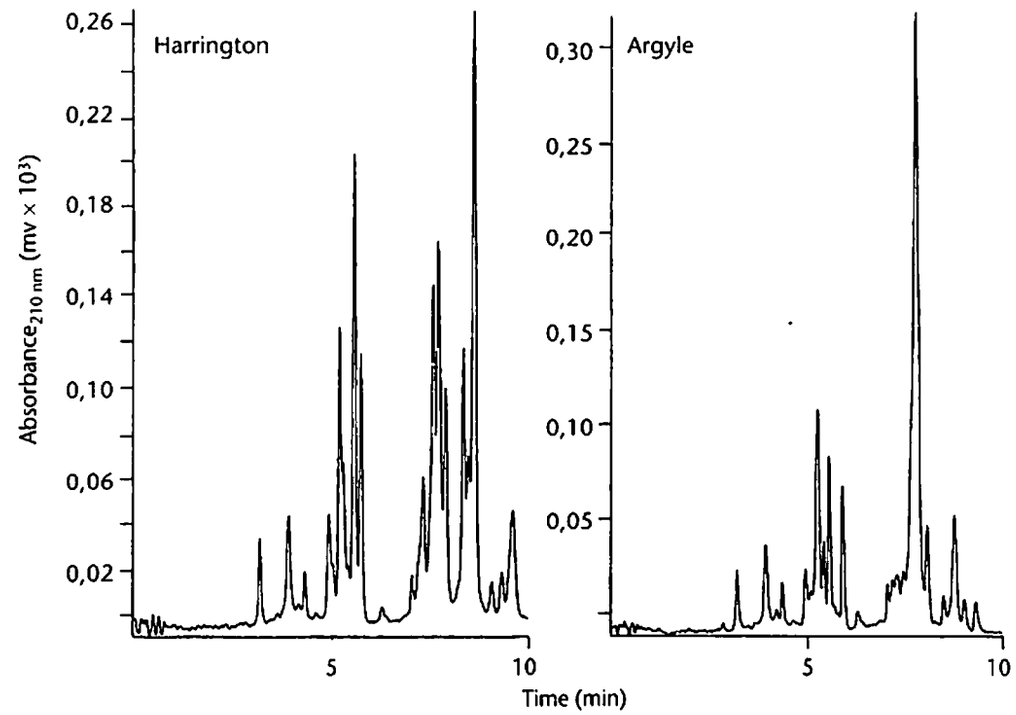
## *4.3 IDENTIFICATION DES VARIÉTÉS ET DES ESPÈCES DE CÉRÉALES*

Une application particulièrement significative de l'HPLC est l'identification des génotypes de blé et autres céréales. Bien que certains travaux aient utilisé des chromatographies d'échanges d'ions pour identifier des variétés de blé (Batey, 1994) ou d'orge (Burbidge *et al.*, 1986 ; Skerritt *et al.*, 1986), la quasi-totalité des travaux se sont fondés sur la RP-HPLC.



La RP-HPLC, tout comme l'électrophorèse, permet la différenciation et l'identification des variétés à partir de « l'empreinte digitale » que constitue le diagramme des protéines de réserve (particulièrement des gliadines) du grain (Bietz, 1983), lequel est exprimé de façon quasi constante pour un génotype donné, quels que soient les facteurs agro-climatiques. Les conditions d'extraction des gliadines ainsi que le choix et les conditions d'utilisation des colonnes ont été optimisés (Bietz *et al.*, 1984 a ; Lookhart et Bietz, 1994, Kruger et Marchylo, 1985), rendant l'HPLC applicable à tous les types de blés (Bietz *et al.*, 1984 b ; Burnouf *et al.*, 1983 ; Huebner et Bietz, 1994 a). Il a été confirmé que les diagrammes de RP-HPLC étaient bien indépendants du lieu de culture (Kruger et Marchylo, 1985), du moins qualitativement, car de légères variations quantitatives ont été décelées dans le cas de blés cultivés sur des sols déficients en soufre (Lookhart et Pomeranz, 1985).

Des développements comparables de la RP-HPLC ont été réalisés pour la plupart des céréales cultivées : l'orge (Cressey et Coles, 1987 ; Marchylo, 1994) (*figure 5*), le maïs (Paulis et Bietz, 1994), le riz (Lookhart et Juliano, 1994), l'avoine (Lookhart et Peterson, 1994), le seigle et le triticale (Kubiczek *et al.*, 1993) et le sorgho (Stephen et Smith, 1994).




■ **Figure 5** **Exemple d'identification des variétés par RP-HPLC à partir des protéines : cas de l'orge**

*Les hordéines de 2 variétés Harrington (orge à 2 rangs) et Argyle (orge à 6 rangs) sont ici séparées en 10 minutes sur colonne $C_8$. (D'après Marchylo, 1994, avec permission).*

Comme les diagrammes de RP-HPLC sont parfaitement reproductibles et caractéristiques des génotypes, ils peuvent constituer un moyen de marquage sûr lors de l'inscription des nouvelles variétés de blé sur les catalogues officiels.

Selon Huebner et Bietz (1994 a), une identification est même possible en moins de 10 minutes si l'on utilise un gradient plus court, un débit plus élevé, et en travaillant à 60 °C.

L'identification des génotypes a été également envisagée à des fins de sélection ou de criblage de semences en vue d'en déterminer la pureté variétale ou la pureté hybride. La RP-HPLC a pu ainsi révéler que de nombreuses variétés consistaient en fait en plusieurs « biotypes » génétiquement différents (Bietz et Cobb, 1985 ; Lookhart et *al.*, 1986). La pureté variétale a été déterminée, soit à partir de l'analyse d'un grand nombre de grains, soit à partir d'un mélange de grains broyés. Dans ce dernier cas, les divers composants du mélange et la composition quantitative ont pu être reconstitués par traitement informatique de la courbe du mélange (Bietz, 1986).

Dans un autre domaine, on doit également signaler le potentiel de la RP-HPLC pour distinguer le blé dur et le blé tendre à partir de l'analyse des gliadines. Comme en outre certaines gliadines (fraction ω-gliadine) sont à la fois extrêmement thermostables et spécifiques du génome D des blé tendres, il est possible d'envisager la détection et peut-être le dosage précis du pourcentage de farine de blé tendre ajouté dans les pâtes alimentaires ayant subi des traitements thermiques à haute température (McCarthy *et al.*, 1990 ; Barnwell *et al.*, 1994 ; De Noni *et al.*, 1994 ; Autran, 1995).

Les chromatogrammes de SE-HPLC, qui ne sont constitués que de 4-5 pics ne se prêtent normalement pas à la discrimination des variétés. Des possibilités d'identification variétale reposant sur la SE-HPLC ont toutefois été mises en évidence par Bertrand *et al.* (1990) qui ont fondé leur analyse, non pas sur les simples paramètres temps de rétention et surface des pics, mais sur l'analyse discriminante du signal digitalisé de la courbe d'élution complète (prenant donc en compte la forme et les épaulements mineurs de celle-ci).

## 4.4 ÉTUDES GÉNÉTIQUES

Les premières analyses de gliadines (Bietz *et al.*, 1984 b ; Burnouf *et al.*, 1983) et de gluténines (Burnouf et Bietz, 1984) ont montré que l'HPLC permettait de déterminer la localisation chromosomique des gènes correspondants. Ceci est donc fondamental pour la sélection lorsqu'on a affaire à des protéines qui déterminent directement les propriétés fonctionnelles du gluten et de la pâte (Bietz et Burnouf, 1985 ; Burnouf et Bietz, 1985). Comme en électrophorèse, la composition particulière en sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) a été trouvée associée à la qualité boulangère des blés, de sorte que sa détermination par RP-HPLC permet une prédiction de la qualité. La comparaison des différentes sous-unités de la gluténine à partir de lignées aneuploïdes a également montré que les sous-unités de haut poids moléculaire avaient des hydrophobicités de surface moins élevées que les sous-unités de faible poids moléculaire (FPM). Burnouf et Bietz (1987) ont démontré que des souches de *Triticum* et d'*Aegilops* diploïdes et tétraploïdes possédaient des compositions différentes et que la RP-HPLC constituait un moyen pour sélectionner des génotypes atypiques et potentiellement intéressants. Une synthèse complète des applications de l'HPLC dans l'étude génétique des blés (variabilité, héritabilité, localisation chromosomique des gènes) a été publiée par Lafiandra *et al.* (1994).



## 4.5 COMPRÉHENSION DE LA STRUCTURE ET DES PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES PROTÉINES

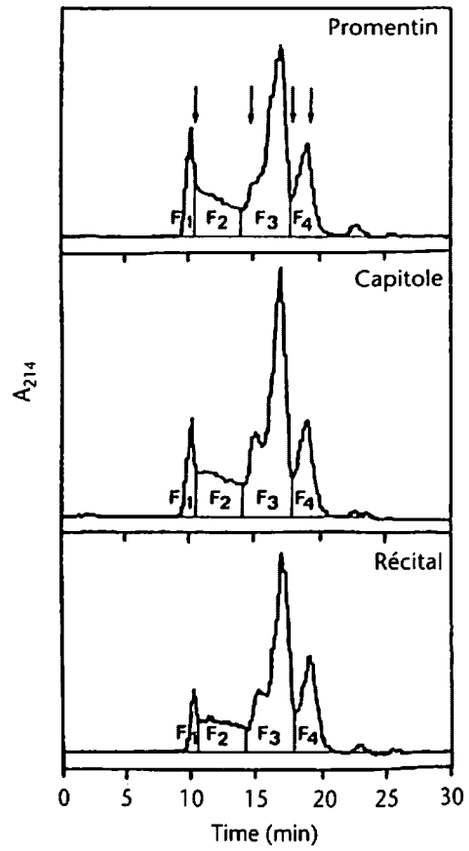
Le potentiel considérable de l'HPLC en matière de purification des protéines est apparu à partir du moment où il a été possible de séparer, sur une colonne de RP-HPLC préparative, un mélange de 5 mg de protéines de blé avec une excellente résolution. Huebner et Bietz (1984) ont ainsi réussi à isoler des constituants gliadines purs par RP-HPLC, en quantités suffisantes pour en permettre la caractérisation plus fine. Certaines de ces fractions se sont avérées quasiment homogènes à la fois en RP-HPLC analytique et en électrophorèse. Il a été également possible de purifier par HPLC les principales SG-HPM associées à la qualité boulangère (Burnouf et Bietz, 1985). Huebner et Bietz (1984) ont cependant montré que, dans le cas d'extraits protéiques complexes, il était préférable d'opérer une purification préalable par SE-HPLC, ou échange d'ions, car aucune de ces techniques prise indépendamment ne permet réellement l'obtention de polypeptides purs.

Plus récemment, Seilmeier *et al.* (1987) et Wieser *et al.* (1990, 1994 a, b) ont rapporté l'isolement et la quantification des 50 principaux polypeptides de la variété de blé Rektor par extraction sélective et RP-HPLC préparative, permettant une caractérisation biochimique approfondie (analyse des acides aminés, séquence N-terminale). Ces résultats ont permis de classer les protéines du blé en 3 groupes : 1) sous-unités gluténines HPM x et y ; 2) $\omega_5$- et $\omega_{1,2}$-gliadines et 3) sous-unités gluténines FPM et α- et γ-gliadines. En fonction de l'hydrophobicité de surface, l'ordre d'élution de ces différents groupes est le suivant : $\omega_5$-gliadines, $\omega_{1,2}$-gliadines, gluténines HPM, α-gliadines + gluténines FPM et γ-gliadines. Les différences quantitatives et qualitatives observées au niveau des pics RP-HPLC entre les variétés de blé ont permis de confirmer que les fractions gliadines sont principalement utiles à l'identification des variétés tandis que les sous-unités gluténines sont davantage associées aux propriétés de la pâte et à la qualité boulangère.

## 4.6 PRÉDICTION DE LA QUALITÉ TECHNOLOGIQUE DES CÉRÉALES

La SE-HPLC et la RP-HPLC possèdent un potentiel considérable en matière d'appréciation ou de prédiction de la qualité des grains et des farines de céréales, en particulier de la qualité boulangère des blés tendres ou de la qualité pastière des blés durs.

La distribution des tailles moléculaires des protéines natives, associées à la qualité boulangère ou aux propriétés rhéologiques de la pâte, avait été déterminée par Huebner et Wall (1976) par chromatographie d'exclusion classique. Bietz (1984) a alors déterminé les poids moléculaires des protéines non réduites par SE-HPLC et a pu confirmer par cette méthode beaucoup plus rapide et plus sensible, la corrélation entre la distribution de poids moléculaire et la qualité boulangère. Une nouvelle confirmation a été apportée par Huebner et Bietz (1985), mais la technique de SE-HPLC ne connut pas de développement important aux U.S.A. en raison de problèmes d'extractibilité des protéines de la farine, et de stabilité des extraits protéiques. Les seules applications ont été en effet la prédiction de la qualité boulangère à partir du rapport entre sous-unités gluténines HPM et FPM, ainsi que la détection des blés germés à partir du changement du profil des tailles moléculaires des protéines.




■ **Figure 6 Profils d'élution des protéines de farine de 3 variétés de blé de qualité boulangère différente**

*Les positions d'élution de 4 standards de poids moléculaire sont indiquées.*

En France, par contre, plusieurs études ont été consacrées à la SE-HPLC dans le but de prédire la qualité boulangère des blés tendres au niveau de la sélection des variétés (Dachkevitch et Autran, 1989 ; El-Haddad *et al.*, 1995 ; Jia *et al.*, 1996), de la prédiction de la qualité des lots de blé récoltés (Scheromm *et al.*, 1992 ; Brenda, 1993 ; Jia *et al.*, 1996), de la qualité des farines dans



l'industrie (Méritan, 1990), ainsi que la qualité des glutens (Méritan, 1990 ; Godon, 1991) (*figure 6*). Ces développements ont été rendus possibles grâce à une amélioration des conditions d'extraction (2 heures à 60 °C) visant à stabiliser au moins 24 heures les extraits protéiques, de manière à permettre l'utilisation d'injecteurs automatiques programmables (Dachkevitch, 1989).

En pratique, un extrait de protéines (non réduites) à partir de grain broyé ou de farine comporte 4 pics en SE-HPLC (voir figure 5 ci-dessus). La prédiction de la force boulangère a été possible en prenant en compte la proportion de pic 1 (agrégats protéiques de taille > $10^6$), ou encore le rapport : pic 1/pic 2 (*tableau 1*). La proportion de pic 2 (agrégats de taille moléculaire moyenne, riches en sous-unités gluténines FPM) a été trouvée davantage corrélée à l'extensibilité de la pâte et au volume du pain en panification française (Dachkevitch, 1989). Également, la localisation préférentielle d'un polypeptide dans l'un des pics 1 ou 2 de SE-HPLC, ou dans le résidu d'extraction a permis à Méritan (1990) de calculer un index de qualité pour les principales sous-unités gluténines.

TABLEAU 1

COEFFICIENTS DE CORRÉLATION ENTRE LES PROPORTIONS DES FRACTIONS 1, 2 ET 3, SÉPARÉES EN SE-HPLC ET LES PARAMETRES DE LA QUALITÉ BOULANGERE

(D'après Singh *et al.*, 1989 b, avec autorisation)

| | Percent Area | | |
|---|---|---|---|
| Attribute | Peak 1 | Peak 2 | Peak 3 |
| Flour protein | 0,51 | 0,14 | - 0,92*** |
| Loaf volume | 0,72** | - 0,52* | - 0,49 |
| Extensibility | 0,84*** | - 0,48 | - 0,72** |
| Max. resistance | 0,84*** | - 0,63* | - 0,56* |
| Extensigraph area | 0,89*** | - 0,59* | - 0,68** |
| Dough devt. time | 0,72** | - 0,14 | - 0,92*** |
| Dough breakdown | - 0,57 | 0,17 | 0,68** |
| Water absorption | 0,14 | 0,44 | - 0,70** |
| Mixograph devt. time | 0,84*** | - 0,66** | - 0,52* |

En raison de ses performances intéressantes (rapidité, automatisation, interprétation informatisée des courbes, travail sur des micro quantités, etc.) l'outil SE-HPLC apparaissait alors adapté à un usage en routine pour la prédiction de la qualité dans les programmes de sélection (Autran, 1987 ; Örsi *et al.*, 1987 ; Lundh et Macritchie, 1989 ; Sutton *et al.*, 1989). Toutefois, outre le coût élevé de l'appareillage et des consommables (et la trop faible durée de vie des colonnes), deux problèmes ont limité jusqu'ici le développement de la méthode : l'instabilité des extraits et le caractère non exhaustif de l'extraction des protéines. Aujourd'hui, ces problèmes ne sont pas totalement résolus, bien qu'on soit arrivé à les résoudre indépendamment l'un de l'autre. Ainsi, Singh *et al.* (1990 a, b) et Brenda (1993) parviennent à extraire 100 % des protéines de la farine grâce à une sonication des extraits (*tableau 2*), tandis que Batey *et al.* (1991) proposent des modifications du tampon d'élution pour accroître la durée de vie des colonnes). De nouvelles recherches sont toutefois nécessaires

pour parvenir à concilier extraction exhaustive, stabilité des extraits et durée de vie des colonnes.

TABLEAU 2

EFFET DE LA SONICATION SUR L'EXTRACTIBILITÉ ET LA SÉPARATION PAR SE-HPLC DES PROTÉINES DE LA FARINE

(D'après Singh *et al.*, 1989 a, avec autorisation)

| Treatment | % Protein Recovery[a] | HPLC Area P1 | HPLC Area P2 | HPLC Area P3 | Abs. HPLC Area[b] P1 | Abs. HPLC Area[b] P2 | Abs. HPLC Area[b] P3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stirring only | | | | | | | |
| 120 min | 65,4 | 20,2 | 53,5 | 26,3 | 56 | 148 | 73 |
| Sonification | | | | | | | |
| Setting 10 | | | | | | | |
| 2 min | 97,1 | 37,4 | 41,4 | 21,3 | 135 | 149 | 77 |
| 4 min | 97,6 | 35,8 | 42,7 | 21,5 | 130 | 155 | 78 |
| Setting 7 | | | | | | | |
| 2 min | 94,6 | 37,9 | 41,2 | 21,0 | 130 | 142 | 72 |
| 4 min | 95,6 | 36,4 | 41,7 | 21,9 | 129 | 148 | 78 |
| Setting 3 | | | | | | | |
| 10 min | 94,9 | 36,6 | 41,7 | 21,8 | 131 | 149 | 78 |

[a]*Based on Kjeldahl N in the residues*

[b]*Arbitrary unit for HPLC peak area* $\times 10^{-5}$

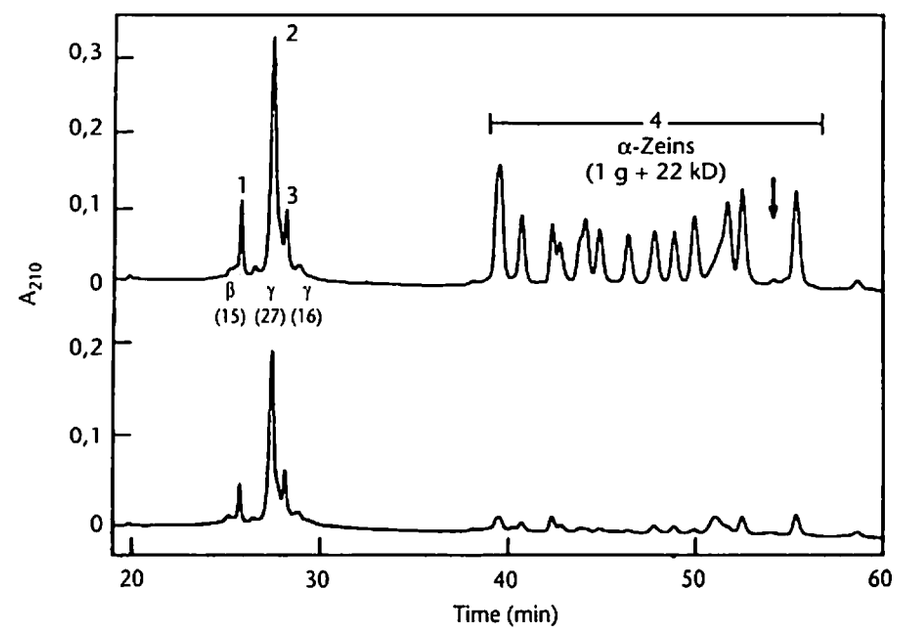
Du point de vue des équipes d'Amérique du Nord, c'est au contraire la RP-HPLC qui a été trouvée la mieux adaptée pour la prédiction de la qualité des blés. La RP-HPLC permet en effet une identification des génotypes, donc d'un potentiel de qualité. Elle permet aussi de détecter des protéines qui sont des marqueurs spécifiques de la qualité.

Ainsi, la présence ou l'absence de sous-unités gluténines HPM par RP-HPLC permet, comme par électrophorèse, une prédiction de la force boulangère des blés tendres (Payne *et al.*, 1980 ; Burnouf et Bietz, 1984 ; Burnouf et Bietz, 1985 ; Huebner et Bietz, 1994 b). La quantification obtenue par RP-HPLC est cependant apparue plus fiable que celle obtenue par densitométrie des diagrammes électrophorétiques et a permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'effet de ces protéines sur la qualité est avant tout d'ordre quantitatif. Le simple rapport HPM/FPM constitue d'ailleurs un indice de qualité boulangère. Enfin, d'autres fractions, telles que des gliadines très hydrophobes, ont également pu être identifiées comme étant des facteurs de la qualité boulangère (Huebner et Bietz, 1986).

Dans le cas des blés durs, Bietz *et al* (1984) ont retrouvé en RP-HPLC les pics des protéines corrélées à la qualité pastière. Ces pics correspondaient en effet aux γ gliadines dites « 42 » et « 45 » en électrophorèse. Une version rapide de cette RP-HPLC permet en outre la prédiction du type γ-gliadine en moins de 10 minutes. Par SE-HPLC, Autran *et al.* (1988) ont également rapporté des relations étroites entre le pourcentage des fractions 1 et 2, la viscoélasticité du gluten et l'appartenance aux types γ-gliadine « 42 » ou « 45 » tandis que Bénétrix et *al.* (1994 a) ont mis en évidence des différences dans la cinétique d'agrégation des protéines de deux variétés différentes de blé dur au cours de la maturation du grain.



Certains autres problèmes de qualité technologique des céréales ont été également approchés par HPLC. La dureté des grains a été ainsi trouvée associée à certains pics spécifiques appartenant aux gliadines chez le blé tendre (Huebner et Gaines, 1992) et aux γ-zéines chez le maïs (Paulis *et al.*, 1993 ; Dombrick-Kortzman et Bietz, 1993 ; Pratt *et al.*, 1995) (*figure 7*), tandis que la répartition des gliadines dans les produits de mouture et de turboséparation des blés a été suivie par Lookhart *et al.* (1989).




■ **Figure 7 Chromatogrammes RP-HPLC des zéines de deux maïs, respectivement de type « hard » (en haut) et « soft » (en bas)**
*(D'après Dombrink-Kurtzman et Bietz, 1993, avec autorisation)*

Chez l'orge, enfin, l'aptitude de lots de grains au maltage a pu être prédite à partir de la composition en hordéines (notamment en C-hordéines) par RP-HPLC (Orive *et al.*, 1991 ; Janes et Skerritt, 1993) ou par SE-HPLC (Skerritt et Janes, 1992 ; Bénétrix *et al.*, 1994 b).

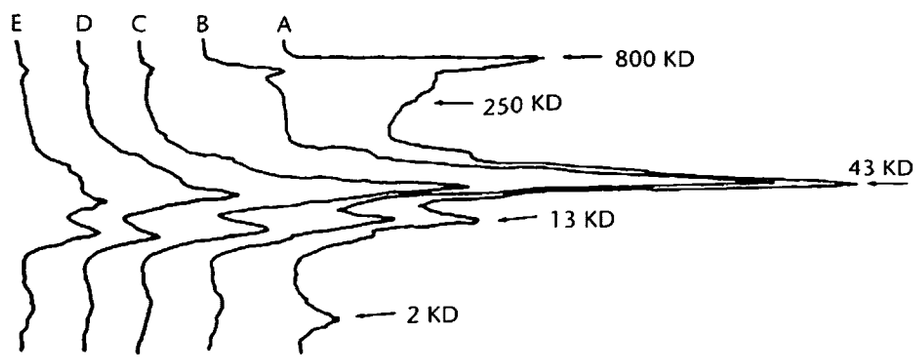
## 4.7 ÉTUDE DES INTERACTIONS PROTÉIQUES AU COURS DES PROCESSUS TECHNOLOGIQUES

A partir de certaines observations sur l'amélioration de la séparation des gliadines lorsque la RP-HPLC est réalisée à des températures élevées, il a été suggéré que l'HPLC pourrait permettre d'approcher le rôle des liaisons hydrogènes

dans l'agrégation des gliadines et plus généralement d'étudier les interactions entre protéines, ou entre protéines et autres constituants. Des conditions non optimales de séchage ou de stockage ont pu ainsi être décelées en analysant les profils des courbes de RP-HPLC (Meier *et al*, 1985), indiquant que l'HPLC pourrait être utilisée pour optimiser les conditions de séchage et de conservation des grains et des farines et donc de contribuer à une amélioration de la qualité.

Les modifications subies par les protéines de la farine (degré d'agrégation, dépolymérisation) au cours de la panification ont été suivies au moyen de la RP-HPLC par Menkovska *et al.* (1987, 1988) et par Jia (1995) tandis que Pomeranz *et al.* (1989) ont réalisé une étude analogue au cours de la fabrication de biscuits.

Chez le blé dur, la SE-HPLC a permis de préciser la cinétique thermique d'insolubilisation des protéines de la pâte alimentaire fraîche (Favier *et al.*, 1996) et particulièrement le rôle des sous-unités gluténines FPM dans la qualité culinaire des pâtes, en raison de leurs propriétés agrégatives, notamment sous l'effet des traitements de séchage à haute ou très haute température (*figure 8*) (Ait-Mouh, 1989 ; Autran *et al.*, 1989 ; Feillet *et al.*, 1989).




**■ Figure 8 Chromatogrammes SE-HPLC des extraits phosphate-SDS**

*(A) semoule de blé dur (A) ; pâte séchée à 55 °C ; (B) pâte traitée 2 heures à 90 °C à respectivement 13 % (C), 18 % (D) et 24 % (D) d'humidité.*

La RP-HPLC a été également utilisée pour caractériser les protéines qui réagissent avec les lipides (Zawistowska *et al.*, 1986) et révéler des changements conformationnels résultant du clivage de liaisons disulfures ou de l'alkylation de résidus cystéines (Bietz, 1986 ; Burnouf et Bietz, 1984). Dans l'avenir, l'approche des interactions protéiques et des changements conformationnels pourrait donc devenir une importante application pour l'HPLC.



# 5 Conclusion

Après s'être développées sur colonnes classiques à basse pression, chromatographie d'exclusion-diffusion et chromatographie en phase inverse ont décuplé leur puissance en passant dans le domaine de la haute performance et font désormais partie des outils de base pour l'étude de la composition et de la qualité des céréales et des aliments à base de céréales.

Bien que l'HPLC n'ait été réellement appliquée aux constituants protéiques des blés et des farines que depuis une douzaine d'années, elle est maintenant largement adoptée pour approcher et résoudre de nombreux problèmes. L'HPLC est en effet une méthode extrêmement utile et efficace en raison de ses caractéristiques de : rapidité, sensibilité, pouvoir de résolution, possibilités d'automatisation complète et de quantification informatique des résultats, ainsi que de complémentarité avec les autres méthodes. Les méthodes d'HPLC sont d'ailleurs toujours en pleine évolution et de nombreuses améliorations sont encore à venir notamment en matière de colonnes.

Les méthode d'HPLC présentent aussi divers inconvénients : les appareillages restent coûteux et sophistiqués ; leur utilisation et leur maintenance nécessitent du personnel qualifié ; le coût d'une analyse reste assez élevé (particulièrement en SE-HPLC) en raison de la pureté élevée requise pour les réactifs, du prix élevé des colonnes et des précolonnes, et de leur durée de vie limitée (d'autant plus qu'on analyse des produits complexes ou des extraits protéiques bruts) ; les analyses, bien que rapides, sont séquentielles (à la différence de l'électrophorèse qui permet toujours l'analyse simultanée de 20, 30, ou 40 échantillons. Pour les analyses de protéines, l'électrophorèse demeure donc un concurrent sérieux de l'HPLC, notamment en routine, sur des produits à faible valeur ajoutée. Cette compétition HPLC/électrophorèse pourrait d'ailleurs rebondir avec le développement prévisible des technologies d'électrophorèse capillaire.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


**Ait-Mouh O., 1989.** *Influence des conditions de séchage à haute température sur les propriétés des pâtes alimentaires.* Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

**Autran J.C., 1994.** Size-exclusion high-performance liquid chromatography for rapid examination of size differences of wheat and cereal proteins. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 326-372.

**Autran J.C., 1987.** Biochemical tests for the evaluation of wheat technological quality : their potential in breeding programs. In : « Proc. Seminar on Hard Wheats in the E.E.C. : Agronomical, Biochemical, Genetic and Technological Aspects (B. Borghi, Ed.), San Angelo Lodigiano (Milano), 3-5 June, pp. 19-37. EEC Report EUR 11172 EN. *Tec. Molitoria,* **38 (7)** : 557-558.

**Autran J.C., 1995.** Determination of common wheat in pasta products : an update of the achieved studies in the European (BCR) collaborative study (in German). *Getreide Mehl und Brot,* **49 (5)** : 272-277.

**Autran J.C., Ait-Mouh O., and Feillet P., 1989.** Thermal modification of gluten as related to end-use properties. *In : Wheat is Unique : Structure, Composition, Processing, End-Use Properties, and Products* (Y. Pomeranz, ed.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA. Chap. 33, 563-593.

**Autran J.C., Dachkevitch T., and Feillet P., 1988.** *Size-exclusion high-performance liquid chromatography of bread wheat and durum wheat proteins : An efficient tool for predicting quality in breeding programs and investigating physico-chemical basis of quality.* Presented at the 73rd Meeting of the American Association of Cereal Chemists, October 9-13, 1988, San Diego, California.

**Barford R.A., 1988.** High performance liquid chromatography of proteins : status and trends. *In : Methods Protein Anal.* (J.P. Cherry and R.A. Barford, eds), AOCS, Champaign, IL, USA : 87-108.

**Barnwell P., McCarthy P.K., Lumley I.D., and Griffin M., 1994.** The use of reversed-phase high performance liquid chromatography to detect common wheat (*Triticum aestivum*) adulteration of durum wheat (*Triticum durum*) pasta products dried at low and high temperatures. *J. Cereal Sci.,* **20 (3)** : 245-252.

**Batey I.L., 1994.** HPLC ion-exchange chromatographic separations of cereal and legume proteins. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 373-392.

**Batey I.L., Gupta R.B., and MacRitchie F., 1991.** Use of size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins : an improved chromatographic procedure. *Cereal Chem.,* **68 (2)** : 207-209.

**Bénétrix F., Kaan F., and Autran J.C., 1994 a.** Changes in protein complexes of durum wheat in the developing seed. *Crop Sci.,* **34 (2)** : 462-468.

**Bénétrix F., Sarrafi A., and Autran J.C., 1994 b.** Effects of genotype and nitrogen nutrition on protein aggregates in barley. *Cereal Chem.,* **71 (1)** : 75-82.

**Bertrand D., Courcoux P., Autran J.C., Méritan R., and Robert P., 1990.** Stepwise factorial discriminant analysis of continuous digitalized signals. Application to chromatograms of wheat proteins. *J. Chem.,* **4** : 413-427.

**Bietz J.A., 1983.** Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.,* **255** : 219-238.

**Bietz J.A. 1986.** High performance liquid chromatography of cereal proteins. *In :Advances in Cereal Science and Technology* (Y. Pomeranz, Ed.) American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN., USA, Vol. 8 : 105-170.

**Bietz J.A., and Burnouf T., 1985.** Chromosomal control of wheat gliadin : analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Theor. Appl. Genet.,* **70 (6)** : 599-609.

**Bietz J.A., and Cobb L.A., 1985.** Improved procedures for rapid wheat varietal identification by reversed-phase high-performance liquid chromatography of gliadins. *Cereal Chem.,* **62 (5)** : 332-339.

**Bietz J.A., and Kruger J.E., 1994.** The evolution of cereal protein analysis by HPLC. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 1-14.

**Bietz J.A., Burnouf T., Cobb L.A., and Wall J.S., 1984 a.** Gliadin analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography : optimisation of extraction conditions. *Cereal Chem.,* **61 (2)** : 124-129.

**Bietz J.A., Burnouf T., Cobb L.A., and Wall J.S., 1984 b.** Wheat varietal identification and gliadin analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.,* **61 (2)** : 129-135.

**Brenda L., 1993.** *Caractérisation des protéines de blé par chromatographie liquide à haute performance de tamisage moléculaire : Application à l'appréciation de la qualité boulangère des farines.* Projet Industriel, Université de Technologie de Compiègne.

**Burbidge M.J., Batey I.L., Campbell W.P., Skerritt J.H., and Wrigley C.W., 1986.** Distinction between barley varieties by grain characteristics, electrophoresis, chromatography and antibody reaction. *Seed Sci. Technol.,* **14 (3)** : 619-629.

**Burnouf T., and Bietz J.A., 1984.** Reversed-phase liquid chromatography of reduced glutenin, a disulfide – bonded protein of wheat endosperm. *J. Chromatogr.,* **299** : 185-199.

**Burnouf T., and Bietz J.A., 1985.** Chromosomal control of glutenin subunits in aneuploid lines of wheat by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Theor. Appl. Genet.,* **70 (6)** : 610-619.

**Burnouf T., and Bietz J.A., 1987.** Identification of wheat cultivars and prediction of quality by reversed – phase high-performance liquid chromatography analysis of endosperm storage proteins. *Seed Sci. Technol.,* **15 (1)** : 79-99.

**Burnouf T., Bietz J.A., COBB L.A., and Wall J.S., 1983.** Chromatographie liquide haute performance des gliadines de variétés de blé tendre (Triticum aestivum L.) cultivées en France et possibilités d'identification variétale. *C. R. Acad. Sci. Paris,* Série III, **297 (7)** : 377-382.

**Cressey P.J., and Coles G.D., 1987.** Identification of New Zealand barley cultivars by reversed-phase high-performance liquid chromatography. N.Z. *J. Agric. Res.,* **30 (4)** : 407-412.

**Cuq J.L., 1988.** La chromatographie liquide. Cours à l'Université de Montpellier II.

**Dachkevitch T., 1989.** *Étude des complexes protéiques du blé tendre par chromatographie liquide à haute performance de tamisage moléculaire (SE-HPLC) : relation avec la qualité technologique.* Thèse, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

**Dachkevitch T., and Autran J.C., 1989.** Prediction of baking quality of bread wheats in breeding programs by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.,* **66 (6)** : 448-456.

**De Noni I., de Bernardi G., and Pellegrino L., 1994.** Detection of common wheat (*Triticum aestivum*) flour in durum wheat (*Triticum durum*) semolina by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) of specific albumins. *Food Chem.,* **51 (3)** : 325-329.

**Dombrink-Kurtzman M.A., and Bietz J.A., 1993.** Zein composition in hard and soft endosperm of maize. *Cereal Chem.,* **70 (1)** : 105-108.

**El-Haddad L., Aussenac T., Fabre J.L., and Sarrafi A., 1995.** Relationships bet-

ween polymeric glutenin and the quality characteristics for seven common wheats (*Triticum aestivum*) grown in the field and greenhouse. *Cereal Chem.*, **72 (6)** : 598-601.

**Favier J., Samson M.F., Aubled C., Morel M.H., et Abecassis J., 1996.** Suivi par SE-HPLC de la cinétique thermique d'insolubilisation des protéines de la pâte alimentaire fraîche. *Sci. Aliments* (sous presse).

**Feillet P., Ait-Mouh O., Kobrehel K., and Autran J.C., 1989.** The role of low molecular weight glutenins in the determination of cooking quality of pasta products : An overview. *Cereal Chem.*, **66 (1)** : 26-30.

**Godon B., 1991.** Des méthodes pour caractériser les glutens industriels. *Ind. Alim. Agric.*, **108 (3)** : 131-140.

**Guillot G., 1986.** Picomole et kilogramme : les deux dimensions de la CLHP. *Biofutur*, Supplément au n° **52** : 3-13.

**Huebner F.R., and Bietz J.A., 1984.** Separation of wheat gliadins by preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, **61 (5)** : 449-454.

**Huebner F.R., and Bietz J.A., 1985.** Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **327** : 333-342.

**Huebner F.R., and Bietz J.A., 1986.** Assessment of the potential breadmaking quality of hard wheats by reversed-phase high-performance liquid chromatography of gliadins. *J. Cereal Sci.*, **4** : 370-388.

**Huebner F.R., and Bietz J.A., 1994 a.** RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes : Wheat. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 97-120.

**Huebner F.R., and Bietz J.A., 1994 b.** RP-HPLC for assessment of quality in cereals and legumes : breadmaking quality (wheat). *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 206-234.

**Huebner F.R., and Gaines C.S., 1992.** Relation between wheat kernel hardness, environment, and gliadin composition. *Cereal Chem.*, **69 (2)** : 148-151.

**Huebner F.R., and Wall J.S., 1976.** Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking qualities. *Cereal Chem.*, **53 (2)** : 258-269.

**Janes P.W., and Skerritt J.H., 1993.** High performance liquid chromatography of barley proteins : relative quantities of hordein fractions correlate with malt extract. *J. Inst. Brew.*, **99 (1)** : 77-84.

**Jia Y.Q., Masbou V., Aussenac T., Fabre J.L., and Debaeke P., 1996.** Effects of nitrogen fertilization and maturation conditions on protein aggregates and on the breadmaking quality of Soissons, a common wheat cultivar. *Cereal Chem.*, **73 (1)** : 123-130.

**Kruger J.E., and Marchylo B.A., 1985.** Selection of column and operating conditions for reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins in Canadian wheat. *Can. J. Plant Sci.*, **65 (2)** : 285-298.

**Kruger J.E., and Bietz J.A., 1994.** *High-performance liquid chromatography of cereal and legume proteins.* Americal Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA.

**Kubiczek R.P., Huebner F.R., and Bietz J.A., 1993.** Reversed-phase high-performance liquid chromatography of secalins : applications to rye cultivar identification. *J. Cereal Sci*, **17 (3)** : 191-201.

**Lafiandra D., Poceddu E., Colaprico G., and Margiotta B., 1994.** Combined reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and electrophoretic techniques in genetics and breeding of wheat storage proteins. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA).

**Lookhart G.L., Albers L.D., and Bietz J.A., 1986.** Comparison of polyacrylamide gel and high-performance liquid chromatography analyses of gliadin polymorphism in the wheat cultivar Newton. *Cereal Chem.*, **63 (6)** : 497-500.



**Lookhart G.L., and Bietz J.A., 1994.** Protein extraction and sample handling techniques. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 51-66.

**Lookhart G.L., and Juliano B.O., 1994.** RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes : Rice. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 175-183.

**Lookhart G.L., and Peterson D.M., 1994.** RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes : Oats. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 184-199.

**Lookhart G.L., and Pomeranz Y., 1985.** Gliadin high-performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis patterns of wheats grown with fertilizer treatments in the United States and Australia on S deficient soil. *Cereal Chem.*, **62 (3)** : 227-229.

**Lookhart G.L., Menkovska M., and Pomeranz Y., 1989.** Polyacrylamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography patterns of gliadins from wheat sections and milled and air-classified fractions. *Cereal Chem.*, **66 (4)** : 256-262.

**Lorient D., Lhuguenot J.C., et Voilley A., 1991.** Chromatographie. *In : Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-Alimentaires* (G. Linden, ed.), Lavoisier Tec & Doc : 74-114.

**Lundh G., and MacRitchie F., 1989.** Size-exclusion HPLC characterization of gluten protein fractions varying in breadmaking potential. *J. Cereal Sci.*, **10** : 247-253.

**Mant C.T., and Hodges R.S., 1991.** *High performance liquid chromatography of peptides and proteins : Separation, analysis and conformation*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

**Marchylo B.A., 1994.** Practical considerations in the RP-HPLC analysis of cereal and legume proteins. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 15-50.

**Marchylo B.A., 1994.** RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes : Barley. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 162-174.

**Marchylo B.A., and Kruger J.E., 1988.** The effect of injection volume on the quantitative analysis of wheat storage proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, **65 (3)** : 192-198.

**Margiotta B., Colaprico G., D'Ovidio R., and Lafiandra D., 1993.** Characterization of high Mr subunits of glutenin by combined chromatographic (RP-HPLC) and electrophoretic separations and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of their encoding genes. *J. Cereal Sci.*, **17 (3)** : 221-236.

**McCarthy P.K., Scanlon B.F., Lumley I.D., and Griffin M., 1990.** Detection and quantification of adulteration of durum wheat flour by flour from common wheat using reversed phase HPLC. *J. Sci. Food Agric.*, **50** : 211-226.

**Meier P., Windemann H., and Baumgartner E., 1985.** Analysis of whole gliadin from untreated and heat-treated wheat flours by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Z. Lebensm. - Unters. Forsch.*, **180 (6)** : 467-473.

**Menkovska M., Lookhart G.I., and Pomeranz Y., 1987.** Changes in gliadin fractions during breadmaking : Isolation and characterization by high-performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, **64 (4)** : 311-314.

**Menkovska M., Pomeranz Y., Lookhart G.L., and Shogren M.D., 1988.** Gliadin in crumb of bread from high-protein wheat flours of varied breadmaking potential. *Cereal Chem.*, **65 (3)** : 198-201.

**Méritan R., 1990.** *Étude des protéines de blé tendre par chromatographie liquide à haute performance de tamisage moléculaire : contribution à l'appréciation de la qualité boulangère.* Thèse (Doctorat), Institut National Agronomique Paris-Grignon.

**Orive M., Batalla G., Cervero J.A., and Torrent J., 1991.** Nonconventional methods for rapid production and malting/brewing quality evaluation of new barley varieties. *In : Proc. Congr. -Eur. Brew. Conv., 23rd* : 153-160.

**Örsi F., Pallagi E., Békés F., and Lasztity R., 1987.** Investigation of wheat proteins by high performance gel chromatography. *Proc. 3rd International Workshop on Gluten Proteins,* 6-9 May, Budapest, Hongrie (F. Bekes, Ed.) : 141-160.

**Osborne T.B., 1907.** *The proteins of the wheat kernel.* Carnegie Inst. Washington, Washington DC., Pub. No 84.

**Paulis J.W., and Bietz J.A., 1994.** RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes : Maize. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 135-161.

**Paulis J.W., Peplinski A.J., Bietz J.A., Nelsen T.C., and Bergquist R.R., 1993.** Relation of kernel hardness and lysine to alcohol-soluble protein composition in quality protein maize hybrids. *J. Agric. Food Chem.,* **41 (12)** : 2249-2253.

**Payne P.I., Harris P.A., Law C.N., Holt L.M., and Blackman J.A., 1980.** The high-molecular-weight subunits of glutenin : structure, genetics and relationship to bread-making quality. *Ann. Technol. agric.,* **29 (2)** : 309-320.

**Pollini C., and Tonatello C., 1990.** HPLC characterization of proteins during pasta production. New trends in cereal food, Symposium ICC, Vienne.

**Pomeranz Y., Lookhart G.L., Rubenthaler G.L., and Alberts L.A., 1989.** Changes in gliadin proteins during cookie making. *Cereal Chem.,* **66 (6)** : 532-534.

**Popineau Y., 1994.** Evaluation of hydrophobicity of wheat proteins and peptides by HIC and RP-HPLC. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 393-426.

**Popineau Y., et Pineau F., 1987.** Investigation of surface hydrophobicities of purified gliadins by hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and apolar ligand binding. *J. Cereal Sci.,* **5** : 215-231.

**Pratt R.C., Paulis J.W., Miller K., Nelsen T., and Bietz J.A., 1995.** Association of zein classes with maize kernel hardness. *Cereal Chem.,* **72 (2)** : 162-167.

**Sapirstein H.D., Scanlon M.G., and Bushuk W., 1989.** Normalization of high-performance liquid chromatography peak retention times for computerizing comparison of wheat prolamin chromatograms. *J. Chromatogr.,* **469** : 127-135.

**Scanlon M.G., 1994.** Data handling in HPLC and use of computers. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 67-96.

**Scheromm P., Martin G., Bergoin A., and Autran J.C., 1992.** Influence of nitrogen fertilization on the potential bread-baking quality of two cultivars differing in their responses to increasing nitrogen supplies. Cereal Chem., **69 (6)** : 664-670.

**Seilmeier W., Wieser H., and Belitz H.D., 1987.** High-performance liquid chromatography of reduced glutenin : Amino acid composition of fractions and components. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.,* **185 (6)** : 487-489.

**Singh N.K., Donovan G.R., and MacRitchie F., 1990 a.** Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. II. Relative quantity of glutenin as a measure of breadmaking quality. *Cereal Chem.,* **67 (2)** : 161-170.

**Singh N.K., Donovan G.R., Batey I.L., and MacRitchie F., 1990 b.** Use of sonication and size-exclusion high-performance liquid chromatography in the study of wheat flour proteins. I. Dissolution of total proteins in the absence of reducing agents. *Cereal Chem.,* **67 (2)** : 150-161.

**Skerritt J.H., and Janes P.W., 1992.** Disulphide-bonded 'gel protein' aggregates in barley : quality-related differences in composition and reductive dissociation. *J. Cereal Sci.,* **16 (3)** : 219-235.

**Skerritt J.H., Batey I.L., and Wrigley C.W., 1986.** New approaches to barley variety identification and quality studies. *Proc. Conv. Inst. Brew.,* 19th : 55-62.



**Stephen J., and Smith C., 1994.** RP-HPLC for varietal identification in cereals and legumes : Sorghum. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 201-205.

**Sutton K.H., Hay R.L., and Griffin W.B., 1989.** Assessment of the potential bread baking quality of New Zealand wheats by RP-HPLC of glutenins. *J. Cereal Sci.,* **10** : 113-121.

**Wieser H., Seilmeier W., and Belitz H.-D., 1990.** Characterization of high molecular weight subunits of glutenin separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Cereal Sci.,* **12 (3)** : 223-227.

**Wieser H., Seilmeier W., and Belitz H.-D., 1994 a.** Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. *J. Cereal Sci.,* **19 (2)** : 149-155.

**Wieser H., Seilmeier W., and Belitz H.-D., 1994 b.** Use of RP-HPLC for a better understanding of the structure and functionality of wheat gluten proteins. *In : HPLC of Cereal Proteins and Legumes* (J.E. Kruger and J.A. Bietz, eds), American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN (USA) : 235-272.

**Zawistowska U., Bietz J.A., and Bushuk W., 1986.** Characterization of low-molecular-weight protein with high affinity for flour lipid from two wheat classes. *Cereal Chem.,* **63 (5)** : 414-419.