

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université Mentouri-Constantine**  
**Faculté des Sciences**  
**Département de Biologie Végétale et Ecologie**

N° d'Ordre :.....

N° de série :.....

**Mémoire de Magistère**  
**En GENETIQUE ET AMELIORATION DES PLANTES**  
**Option**  
**GENOMIQUE ET TECHNIQUES AVANCEES DES VEGETAUX**

**Diversité des sous-unités gluténines HPM et FPM, sous-unités  
sécalines HPM et 75k gamma-sécalines d'une collection de triticales  
hexaploïdes**

**Présenté par : Amri sihem**

**Membres de jury :**

<b>Présidente :</b>	N. KHALFALLAH.	Prof. Université Mentouri Constantine
<b>Rapporteur :</b>	D. KHELIFI.	Prof. Université Mentouri Constantine
<b>Examineurs :</b>	A. BENGHEDOUAR.	Prof. Université Mentouri Constantine
	A. HAMIDECHI.	MC. Université Mentouri Constantine

Année Universitaire 2010-2011

## Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon encadreur, le professeur Khelifi Douadi, pour son aide précieuse et ces conseils judicieux .Je lui assure le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme Khalfallah N. Professeurs à L'université Mentouri, pour son aide et ces conseils et pour avoir accepter de présider mon jury.

Mes remerciements vont également à Mr Benguedouar A., Professeurs à L'université Mentouri et à Mr Hamidechi A. Maître de conférence à l'Université Mentouri qui me font l'honneur d'examiner mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Melle Iness, pour sa précieuse aide, je remercie également Mr Belbekri N. et Mme Tourki M., ingénieurs de laboratoire pour leur aide et leurs encouragements.

A mes amis de promotion, j'adresse un grand merci pour leur soutien et leur aide.

*Amri sihem*

## Dédicaces

Je dédie ce travail à tous ceux que  
j'aime et tous ceux qui m'aiment

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	7
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographique</b>	
1. Présentation des triticales.....	9
1.1. Historique.....	9
1.2. Définition.....	11
1.3. Structure génomique des triticales.....	13
1.3.1. Triticales primaires.....	14
1.3.2. Triticales secondaires.....	15
1.4. Caractéristiques agronomiques et nutritionnelles des triticales.....	15
2. Protéines du blé.....	17
2.1. Classification.....	18
2.2. Les protéines de réserves (protéines de gluten).....	19
2.3. Extraction et séparation des protéines.....	20
2.3.1. Les gliadines.....	22
a. Composition en acides aminés.....	23
b. Séquences.....	25
c. Configuration des gliadines.....	25
2.3.2. Les gluténines.....	26
2.3.2.1. Les sous-unités de glutanines à faible poids moléculaire (FPM).....	27
2.3.2.2. Les sous-unités de glutenines à haut poids moléculaire (HPM).....	27
a. Composition en acides aminés.....	28
b. Séquence.....	28
c. Structure et conformation.....	29
d. Localisation chromosomique.....	30
2.4. Effet des protéines de réserve sur la qualité technologique des blés.....	33
3. Les protéines du seigle et du triticales.....	35
3.1. Les protéines de réserve du seigle et leur localisation chromosomique.....	35
3.2. Les protéines de réserve du triticales et leur effet sur la panification.....	37

**Chapitre II : Matériels et Méthodes ..... 39**

1. Matériel végétal..... 40

2. Méthodes d'étude..... 40

    2.1. L'électrophorèse..... 40

        2.1.1. Définition..... 40

        2.1.2. Principe de la SDS-PAGE..... 42

        2.1.3. Préparation des gels..... 43

            a. Le gel de séparation (running gel)..... 43

            b. Le gel de concentration (stacking gel)..... 43

            c. Le tampon d'électrophorèse..... 44

            d. La migration..... 44

3. Méthodes d'extraction des sécalines et des gluténines du triticale..... 44

4. Fixation et coloration..... 47

5. Lecture des gels..... 50

6. Analyses statistiques..... 52

**Chapitre III : Résultats et Discussion .....53**

1. Analyse électrophorétique du polymorphisme des SG-HPM, des sécalines HPM, des 75k gamma-sécalines, et SG-FPM..... 54

2. Diversité allélique des sous-unités gluténines et des sécalines..... 54

3. Calcul des fréquences alléliques..... 65

4. Comparaison des fréquences alléliques des triticales étudiés avec ceux cultivés en Europe..... 67

5. Indice de similarité des diagrammes variétaux..... 70

    5.1. Calcul des indices de similarité des triticales..... 70

    5.2. Distances génétiques..... 73

<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>76</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>77</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>87</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>88</b>
<b>Annexes</b>	

## INTRODUCTION

Depuis des millénaires, les céréales ont représenté l'aliment le plus consommé. Mais au fil des ans, les habitudes alimentaires des nations riches ont privilégié la viande comme nourriture indispensable et relégué céréales et graines au second plan. Et pourtant, les céréales c'est un panier de fibres, vitamines et minéraux. Les céréales c'est le plein de bonnes choses.

La nature offre plus de 300 000 espèces végétales. Et pourtant, trois céréales représentent à elles seules 75% de la consommation mondiale céréalière. Médecins, diététiciens et nutritionnistes s'accordent pour dire que les céréales ont d'incontestables avantages pour la santé, notamment sur le plan nutritionnel. Riches en nutriments et micro-nutriments, elles sont une réponse aux problèmes nutritionnels de notre époque.

De même que le blé s'est constitué par l'association naturelle de plusieurs espèces de graminées sauvages, à la fin du 19e siècle, les hommes ont tenté d'associer les qualités du blé et la rusticité du seigle en croisant ces deux espèces cultivées.

Connu depuis la fin du XIXe siècle, d'abord considéré comme une curiosité botanique, le triticales a progressivement été l'objet de tentatives d'amélioration dans divers pays. D'abord plante de laboratoire, le triticales intéressa petit à petit les sélectionneurs puis les agriculteurs. Les efforts des uns et des autres, à travers le monde, en ont fait aujourd'hui une espèce cultivée un peu partout, de plus en plus connue et appréciée.

L'intensification des recherches dans le monde à partir de 1930 a permis des avancées, en Amérique et en Europe de l'Est notamment, sans aboutir toutefois à la mise au point de plantes ayant un intérêt économique suffisant. Progressivement, de nombreux instituts de différents pays ont abandonné leurs travaux sur cette espèce.

Au début des années 60, les recherches ont repris l'introduction de variétés différentes dans les croisements (blé dur par exemple), et l'utilisation des nouveaux outils de la biologie cellulaire puis moléculaire ont enfin permis l'obtention de lignées agronomiquement intéressantes.

La première variété commercialisée par un pays européen a été produite par l'INRA ; sa mise sur le marché date de 1979. L'optique était d'obtenir un blé qui aurait incorporé dans son patrimoine héréditaire la "rusticité" du Seigle (résistance au froid, aptitude à pousser en sols pauvres - et conservé l'aptitude du Blé tendre à la panification). Récemment, une étude de diversité génétique des protéines de réserve des triticales hexaploïdes cultivés en France a été entreprise par Aimour (2002).

Notre travail s'inscrit dans ce contexte, il s'agit d'évaluer la diversité génétique d'une collection de triticales hexaploïdes, fournie par UMR (Amélioration et Santé Des Plantes) INRA de Clermont-Ferrand.

Dans la première partie de ce travail, il sera essentiel de présenter les caractéristiques biochimiques et génétiques des protéines de réserve du blé et du seigle ainsi que leur fonctionnement, la seconde partie décrira le matériel végétal, les processus expérimentaux et les méthodes d'étude ainsi que les méthodes d'interprétation utilisées, la troisième et dernière partie sera consacrée à la mise en évidence du polymorphisme des protéines de réserves des triticales hexaploïdes étudiés, au déterminisme des loci impliqués dans l'expression de ces protéines de réserves ainsi que les principaux allèles présents sur ceux-ci.



## **1. Présentation des triticales :**

### **1.1. Historique :**

Dès 1875, Wilson informait la société botanique d'Edimbourg qu'il avait obtenu une plante stérile d'un croisement de blé avec du seigle. Le premier triticales fertile a été produit en 1888 par Rimpau. Il est à noter, par ailleurs, que certains auteurs, ont signalé l'observation de cette plante dans la nature, sans croisement artificiel, mais d'un croisement naturel et donc sans aucune intervention de l'homme.

Mais la culture de cette nouvelle céréale n'a pris quelque importance qu'au cours des premières décennies du 20<sup>e</sup> siècle et ce n'est que ces dernières années que des chercheurs d'Union Soviétique et d'Europe, Muntzing en Suède notamment, ont commencé à envisager la possibilité d'en faire une culture commerciale.

Leurs efforts sont restés cependant infructueux en raison de l'infertilité persistante de ce produit hybride, de sa tendance à donner des grains ridés et de l'impossibilité d'obtenir de grandes quantités de nouveaux hybrides fertiles (désignés sous le nom de triticales primaires pour les distinguer des triticales secondaires, descendance améliorée des primaires) Varughese, T.Barker et E.Saari (1971).

En 1937, des chercheurs français, grâce à de nouvelles techniques qui consistent en l'utilisation de la colchicine (un alcaloïde toxique extrait du colchique qui est une plante à bulbe), ont pu rendre cet hybride fertile en doublant le nombre de ses chromosomes. Enfin, des travaux réalisés depuis 1950 ont permis la création d'un triticales autogame, génétiquement stable et agronomiquement intéressant. Cette avancée a poussé de nombreuses universités et instituts de recherche à travers le monde entier à s'intéresser à cette plante originale.

En 1968, un centre international spécialisé dans l'amélioration du maïs et du blé, connu sous le nom de CIMMYT, situé au Mexique, obtient une souche de triticales appelée Armadillo, dotée de caractéristiques très intéressantes.

Enfin, depuis 1974, les potentialités du triticales dépassent pour la première fois celles du blé tendre, soit de l'un des parents du triticales. En 1980, et plus précisément en France, la première variété française de triticales du nom de "Clercal" est née.

A la même période et cette fois-ci en Pologne, une variété d'hiver est obtenue baptisée "Lasko", cette dernière est devenue plus tard la variété la plus cultivée en Europe. En France, la mise en culture du triticales a commencé officiellement en 1983, (tab. 1)

Il faut savoir qu'en Europe le triticales s'est surtout développé dans les pays du Nord, mais souvent au détriment de la culture du seigle et surtout de l'orge. Là où le blé avait des difficultés pour réussir, à cause des excès d'eau durant la période hivernale, le triticales trouvait sa place pour s'y substituer.

En Afrique ou plus spécialement en Algérie, c'est en 1971 seulement que le triticales a été introduit. Du matériel végétal (semences) issu de la souche Armadillo en provenance du CIMMYT était réceptionné. C'est le début des essais de comportement en Algérie, en un mot de la recherche sur cette culture.

C'est l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) dépendant du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural qui s'occupe du développement de cette culture. Depuis l'introduction de cette espèce, de nombreuses sélections, intéressantes pour les conditions algériennes, ont été réalisées à partir de variétés en provenance de plusieurs régions du monde.

En 1987, un programme de multiplication de semences de variétés sélectionnées a été entamé par l'ITGC. Entre-temps, la vulgarisation pris le relais. Seulement, sur le terrain, la production n'a pas suivi. De multiples raisons en sont la cause.

**Tableau 1 : Evolution de la production du blé, du seigle et du triticale dans les dernières décennies, (source F.A.O)**

<b>Production (MT)</b>	<b>1980</b>	<b>1990</b>	<b>2001</b>
<b>Blé</b>			
Monde	440244801	592273015	566842633
Union Européenne	67566784	88980565	92922200
France	23781008	33345808	32065000
<b>Seigle</b>			
Monde	24977975	37895189	22690538
Union Européenne	5922228	6255975	6365270
France	408500	235300	124000
<b>Triticale</b>			
Monde	1294011	5405995	11255813
Union Européenne	15000	1303793	5272869
France	0	623517	1139000

## 1.2. Définition :

Le nom du triticale résulte de deux origines. La première partie "tritic" provient des premières lettres du nom scientifique du blé (*triticum*) source d'ovule et la deuxième "ale" des dernières lettres du nom scientifique du seigle (*secale*) source de pollen, tous deux se rattachent à la tribu des Triticeae. En effet, ce sont ces deux céréales qui ont été croisées par l'homme et dont le résultat a donné le triticale. Etant un croisement entre ces deux espèces *Triticum* X *Secale*, le nom scientifique retenu a été *Triticosecale*.

Il faut préciser que le blé tendre, l'un des parents du triticale, originaire du proche orient, est la céréale la plus cultivée au monde, elle produit une farine que nous consommons sous forme de pain de boulanger. Le deuxième parent, le seigle originaire de Transcaucasie, est cette céréale qui donne une farine foncée et avec laquelle du pain "noir" était autrefois fabriqué. Ce dernier n'est pas cultivé en Algérie, seules de faibles surfaces ont été cultivées du temps de la colonisation. On le rencontre en Europe sous forme de pain appelé "pain de seigle" caractérisé par une couleur très foncée et d'un très bon goût, (fig. 1).

**Classification scientifique :**

Royaume : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Liliopsida

Ordre : Poales

Famille : Poaceae

Tribu : Triticeae

Genre : × *Triticosecale*

**Nom binomial :**

*Triticosecale* × Wittm. a. ex. Camus.

**Synonymes :**

× *Triticale* Tscherm-Seys. Müntzing ex



**Figure 1 : les grains de (a) : seigle, (b) : blé, (c) : triticale**

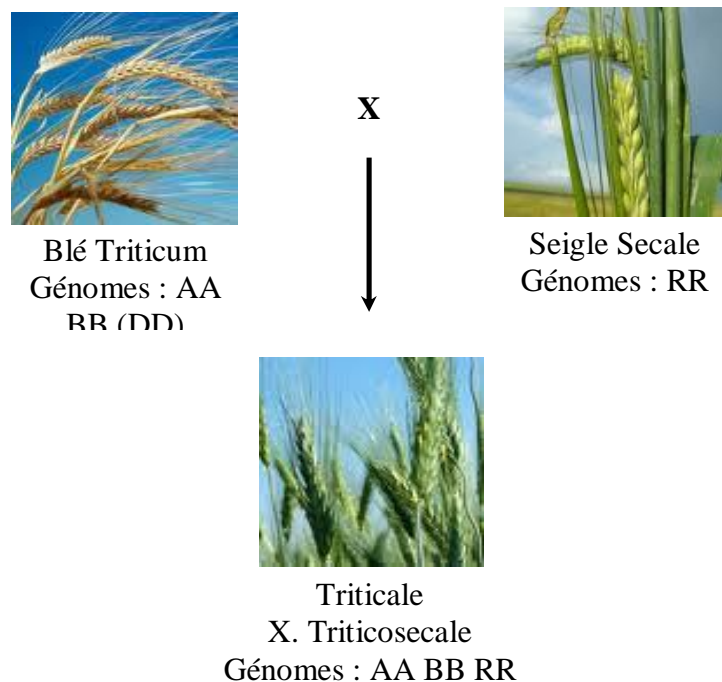
### 1.3. Structure génomique des triticales :

D'un point de vue génétique, on sait que le génome de seigle et les génomes des *Triticum* sont assez fortement apparentés. Les analyses biochimiques, puis moléculaires ont montré l'existence de grandes similitudes quant en "**fond génétique**" et leurs ADN (Appels, 1982 in Gallais and Bannerot, 1992), on peut d'ailleurs ranger les 7 chromosomes de seigle dans les 7 groupes d'homéologie définis pour le blé, malgré les différences d'organisation.

D'autre part, les chromosomes de seigle sont plus gros que ceux des blés, et ils s'en distinguent facilement en utilisant les techniques des caryotypes à bandes (**C-banding**) : ils comportent en effet de gros télomères fortement coloriables, alors que les chromosomes de blé comportent des bandes souvent plus ténues et surtout davantage localisées autour des centromères. Les chromosomes des différents génomes peuvent donc être identifiés par ces techniques (Lukaszewski et Gustafon, 1989).

D'un point de vue systématique, le triticales est un genre "artificiel" comportant plusieurs espèces amphidiploïdes, c'est-à-dire résultant de l'inion de stocks chromosomiques d'espèces appartenant au blé (*Triticum*) et aux seigles (*Secale*) par hybridation et doublement du nombre de chromosomes de l'hybride.

Le seigle apportant systématiquement **2n=2x=14** chromosomes, et les blés : 14, 28 ou 42 suivant l'espèce utilisée, on pourra obtenir des triticales à **28** chromosomes (tétraploïdes), **42** chromosomes (hexaploïdes) ou à **56** chromosomes (octoploïdes), (tab. 2), (Gallais and Bannerot, 1992).



**Figure 2: Origine des triticales hexaploïdes cultivés**

**Tableau 2 : Répartition des espèces blé, seigle et triticale en fonction des niveaux de ploïdie (Gallais and Bannerot, 1992).**

2x	4x	6x	8x
<b>AA</b>	<b>AA BB</b>	<b>AA BB DD</b>	
<i>Triticum monococcum</i>	<i>Triticum durum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	
<b>BB</b>		<b>AA BB RR</b>	
?		Triticale hexaploïdes	
<b>DD</b>	<b>A/B A/B RR</b>		<b>AA BB DD RR</b>
<i>Aegilops squarrosa</i>	Triticale tétraploïde		<i>Triticale</i>
<b>RR</b>	<b>DD RR</b>	<b>DD A/B A/B RR</b>	octaploïde
<i>Secale cereale</i>	Amphiploïde ( <i>Ae. Squarrosa</i> x Siegle)	Amphiploïde ( <i>Ae. Squarrosa</i> x Triticale tétraploïde)	

### 1.3.1. Triticales primaires :

Les produits qui surgissent directement de croisement du blé avec le seigle (suivi par le dédoublement des chromosomes) sont appelés triticales primaires. Se sont des triticales purs, non modifiées par hybridation. Avec des degrés différents, ils partagent les problèmes de stérilité partielle, un faible rendement et des types agronomiques pauvres.

Mais ce sont des lignés-homozygotes pures en raison de dédoublement des chromosomes pour toutes les paires de gènes. De ce fait, ils sont stables comme variété de culture standard, ils restent les mêmes, année après année. Ils sont, cependant, un peu plus instables que les variétés de blé normal.

### **1.3.2. Triticales secondaires :**

Les sélectionneurs de plantes, en découvrant que les triticales primaires ne sont pas agronomiquement utiles, ont commencé à les hybrider avec d'autres types primaires et avec le blé, et même avec d'autres espèces. Ces croisements ont donné un autre type de triticales appelés "triticales secondaires" car ils ont de nouvelles combinaisons chromosomiques de blé et/ou du seigle. Actuellement, à l'exception de certains triticales primaires octoploïdes développés et utilisés en chine, les triticales secondaires forment la base de l'industrie de triticales dans le monde.

### **1.4. Caractéristiques agronomiques et nutritionnelles des triticales :**

Le triticales cultivé est composé de trois génomes : A, B et R (figure 2), le blé donneur du génome A et B est connu pour son potentiel de rendement élevé et son adaptation à des milieux relativement secs. Le seigle, donneur du génome R, a un potentiel de rendement plus faible mais s'adapte bien au froid et la sécheresse, aux sols acides et il est cultivé à la quasi totalité des aires géographiques, (Amiour, 2002)

Analogue à celle du blé, la qualité nutritive du triticales lui est même parfois supérieure à sous certains aspects. Sa teneur en lysine notamment, ainsi que sa meilleure digestibilité protéinique et la composition équilibrée des minéraux qu'il contient le rendent spécialement apte à remplacer ou à compléter d'autres céréales dans l'alimentation humaine ou animale (Varughese, Barker et Saari, 1971).

Le potentiel de rendement du triticales n'est pas très éloigné de celui du blé (des productions dépassant 100q/ha ont été obtenues) et les rendements peuvent facilement atteindre 80q/ha en région de grande culture.

Dans les régions de culture traditionnelle du seigle et les zones marginales pour le blé (Massif Central, Bretagne, Dauphiné...), les rendements sont bien sûr moindres, mais ils sont souvent supérieurs à ceux du blé, de l'orge et du seigle.

Les performances plus médiocres du seigle, pourtant adapté à ces situations difficiles, sont en partie dues à sa grande sensibilité à la verse (tendance des tiges à se coucher sur le sol), qui conduit à limiter la fumure azotée.

Le triticales présente au contraire une bonne résistance à la verse, malgré une taille relativement élevée (mais inférieure à celle du seigle). Moins sensible que la plupart des cultivars de blé et de seigle à l'asphyxie en terres battantes, le triticales est également susceptible de bien exploiter des terres plus légères ; ces qualités expliqueraient la bonne régularité de production enregistrée lors des essais.

Enfin, sa résistance vis-à-vis des maladies (du feuillage notamment) permet une utilisation moindre de fongicides et en fait une culture à la fois moins coûteuse, moins risquée et plus respectueuse de l'environnement.

Ses caractéristiques agronomiques permettent au triticales de s'adapter aux conditions pédo-climatiques des régions d'élevage, où il peut souvent remplacer le seigle, en zones de demi-montagne et dans les bas-fonds de plaine humide notamment. Les caractéristiques du grain renforcent cette orientation vers l'élevage.

La farine du triticales est en effet non panifiable selon les normes industrielles (pétrissage intensif), et elle ne peut guère constituer qu'un complément de la farine de blé pour certains pains spéciaux. Ses qualités fourragères sont en revanche très intéressantes, sa valeur énergétique est comparable à celle du blé et supérieure à celle des orges et du seigle ; contrairement à ce dernier, le triticales est bien accepté par les bêtes et ne contient pas d'inhibiteurs de croissance pour les animaux.

Enfin, il présente une teneur exceptionnelle, supérieure de 25% à celle du blé, en lysine (tab.3) ; or cet acide aminé "essentiel" (que les animaux ne peuvent synthétiser et qui doit être fourni par l'alimentation) constitue un facteur limitant de la ration céréalière du porc, nécessitant une complémentation en soja.

Le triticales peut se substituer en totalité au blé dans la ration des bovins, des ovins et de nombreux monogastriques (porcs notamment). La seule exception concerne les volailles, en



particulier pour les poules pondeuses : la richesse relative en pentosanes (gênants pour la digestion de ces animaux) du triticale limite sa contribution à 40% de la ration.

Sa production de paille supérieure à celle du blé constitue un atout supplémentaire pour les éleveurs.

**Tableau 3 : Teneur en acides aminés chez le blé, le seigle et le triticale  
(Lasztity, 1984)**

<b>Acides aminés</b>	<b>Blé</b>	<b>Seigle</b>	<b>Triticale</b>
Arginine	4.71	4.93	5.25
Cystéine	2.19	1.90	2.97
Histidine	2.02	2.20	2.40
Isoleucine	4.70	4.26	3.70
Leucine	6.72	6.68	6.98
Lysine	2.79	3.42	3.31
Méthionine	1.30	1.68	1.63
Phénylalanine	4.96	4.82	4.94
Thréonine	2.84	3.70	3.20
Tryptophane	1.28	1.13	1.11
Tyrosine	3.72	3.27	2.84
Valine	4.48	5.21	4.52

## **2. Les protéines du blé :**

Les protéines du blé sont les plus connues parmi les protéines des céréales, elles ont la propriété unique de former après hydratation une masse cohérente, insoluble et viscoélastique, le gluten, ce qui a poussé à susciter depuis le 18<sup>ème</sup> siècle l'intérêt des chercheurs et a poussé à étudier ces protéines, (Benmbarek, 2004).

Du point de vue quantitatif, les protéines sont le deuxième élément en importance dans la farine et la semoule de blé. Leur teneur varie de 8% à 16% (base sèche) selon l'espèce et le degré de maturité du grain.

Dans la farine de blé, de 70 à 80 protéines différentes ont été identifiées dont les quatre classes principales sont les albumines, les globulines, les prolamines (gliadines) et les glutélines (gluténines) Boudreau et Ménard (1992)

## 2.1. Classification :

Les premières études menées autour des protéines de réserve remontent au 18<sup>e</sup> siècle (Beccari, 1745). En 1924, Osborne propose une première classification basée sur leurs solubilités respectives :

- ✓ dans l'eau c'est les albumines,
- ✓ dans les solutions salines c'est les globulines,
- ✓ dans un mélange hydro-alcooliques c'est les prolamines,
- ✓ les glutélines insoluble dans toutes les solutions précédentes.

Bien que ce fractionnement soit encore largement utilisé, il est maintenant reconnu que les quatre classes ne sont pas tout à fait pures et qu'il y a des contaminations d'une classe à l'autre d'après Amour (2002).

La nouvelle classification proposée par Milfin, Field et Shewry après de nombreux travaux est basée sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des protéines des céréales. Cependant, sur la base de résultats biochimique obtenus une classification selon la fonction biologique des ces protéines est d'un point de vue plus scientifique plus acceptable. Elles peuvent donc être divisées en deux grandes classes :

**Les protéines cytoplasmiques ou métabolique actives :** qui correspond aux albumines et les globulines, elle contient les enzymes, les protéines membranaires, les protéines de régulation non enzymatique, les protéines des organelles, etc.

**Les protéines de réserves** qui correspondent aux gliadines (prolamines chez les céréales) et les gluténines (glutélines chez les céréales), et elles ne sont présentes que dans l'albumen.

Une autre classification basée sur la morphologie de la graine est aussi possible, au niveau de la graine, les protéines sont divisées en trois groupes : protéines de l'albumen, protéines de la couche à aleurone et protéine de l'embryon, ces différentes possibilités de classification sont résumées dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Classification des protéines des céréales (Lasztity, 1984)**

Selon la morphologie du grain	Selon la fonction biologique	Selon la solubilité	Selon la composition chimique
Protéines de l'albumen	Métaboliquement actives/ protéines cytoplasmiques	Albumines	Protéines simples
	Enzymes		Protéines complexes
Protéines de la couche à Aleurone	Protéines membranaires	Globulines	Lipoprotéines
	Protéines des ribosomes		
	Protéines de régulation	Prolamines	Glycoprotéines
	Autres protéines		
Protéines de réserves	Glutélines	Protéines nucléaires	
Protéines de l'embryon	Protéines de faible poids moléculaires		
	Protéines de haut poids moléculaire		

## 2.2. Les protéines de réserves (protéines de gluten) :

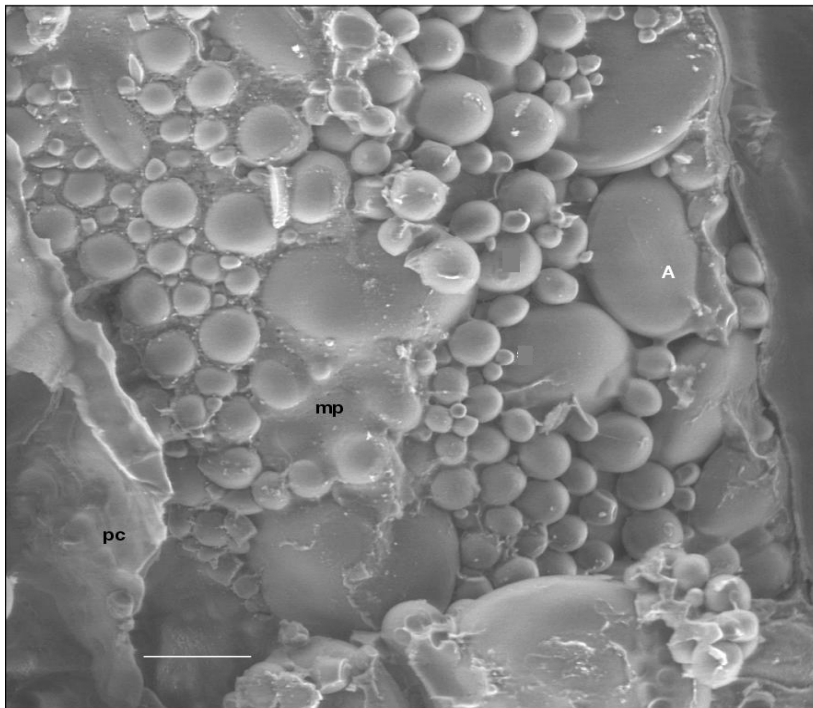
Les protéines de réserve du riz et du blé constituent la principale base alimentaire à travers le monde. Ces protéines sont synthétisées et accumulées dans l'endosperme au cours du développement de la graine pour la germination éventuelle de la graine.

Elles sont composées de 10% d'albumine et de globuline et de 90% de gluten (Schofield et Booth, 1983 *in* Benmoussa, 1999).

Après l'élimination de l'amidon, des lipides, des albumines, des globulines et d'autres protéines solubles par une série de lavages à l'eau, on récupère une masse protéique insoluble dans l'eau. Cette masse, qui à l'état humide est à la fois visqueuse et élastique, s'appelle le gluten, (fig. 3).

A l'état natif le gluten est un polymère formé de gliadines et de gluténines (Shewry et *al.*, 1984). L'élasticité et la ténacité du gluten sont généralement des propriétés attribuées à la présence des glutenines, alors que sa viscosité est associée à celle des gliadines Tatham et Shewry. 1985). Les gliadines qui se répartissent en groupes oméga, bêta, alpha et gamma-gliadines, sont des protéines monomériques dont les ponts disulfures sont intramoléculaires (MacRachie. 1985).

Par contre, les gluténines constituent un mélange de sous-unité réparties en deux classes: une a haut poids moléculaire (HPM) et l'autre faible poids moléculaire (FPM) (Shewry et Tatham, 1990). Les ponts disulfures intra et intermoléculaire jouent un rôle majeur dans l'établissement de la structure tridimensionnelle des sous-unités de gluténines et de leur degrés de polymérisation (Shewry et *al.*, 1995). Le gluten a une forte teneur en glutamine et proline et faible en lysine, histidine et arginine qui sont des acides aminés basiques.



**Figure 3: Granules d'amidon entourés de la matrice protéique**  
**Vue au microscope électronique à balayage. Echelle : 10µm**  
**A : granule d'amidon, mp : matrice protéique, pc : paroi cellulosique**

### **2.3. Extraction et séparation des protéines :**

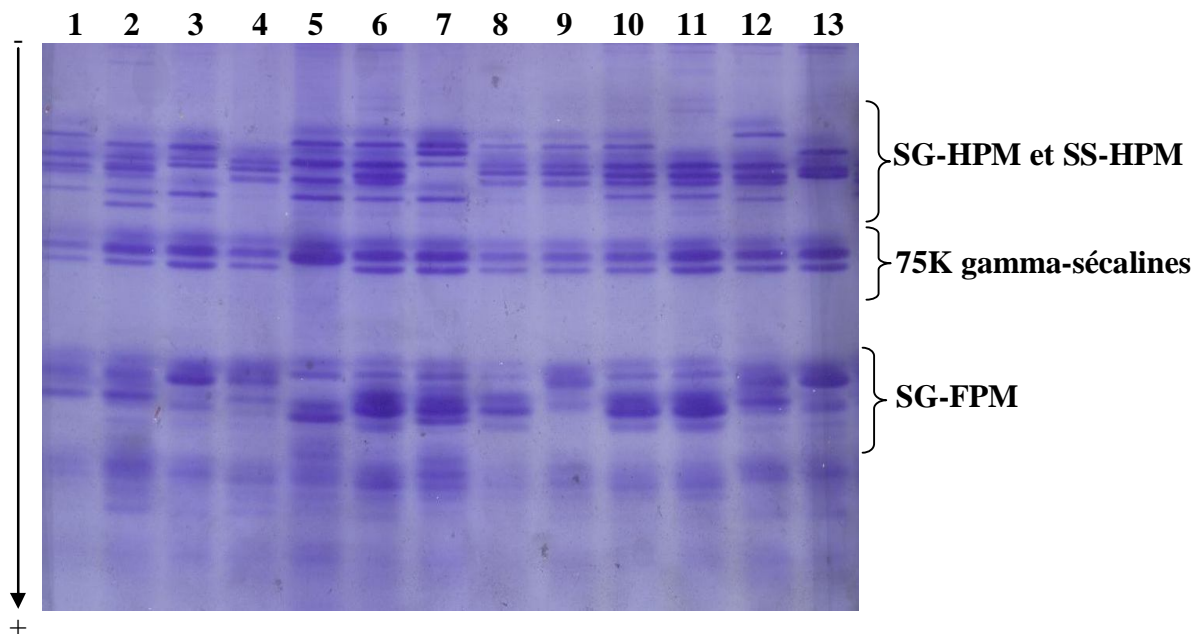
Depuis la séparation d'Osborne basée sur la solubilité des protéines, les méthodes et les techniques d'extraction et de séparation des ces dernières ont beaucoup évoluées. Des techniques de haute résolution ont été employées comme la chromatographie (Bietz, 1986, Bean et Lookhart, 1997) et l'électrophorèse (Payne et *al.*, 1979 ; Wrigley et *al.*, 1982 ; Branlard et *al.*, 1992a) pour avoir plus d'information et de détails sur les protéines.

Deux types d'électrophorèse ont été utilisés pour la séparation des protéines de réserve du blé :

- **L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu acide (PAGE)** est utilisée pour la séparation des gliadines qui sont des protéines monomériques (ce qui les différencie des gluténines, de type polymérique) associées par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes, leur poids moléculaire est compris entre 30 et 80kDa. La vingtaine de gliadines individualisée dans une variété de blé par cette technique sont classées en fonction de leur mobilité croissante en quatre classes :  $\omega$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ - et  $\alpha$ - gliadines. L'électrophorèse des gliadines s'est avérée être un moyen très efficace d'identification variétale (Autran et *al.*, 1973 ; Wrigley et Shepherd, 1974 ; Bushuk et Zillman, 1978) car elle présente une très grande diversité.
  
- **L'électrophorèse en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS-PAGE)** : utilisée pour la séparation des gluténines qui sont la fraction des protéines du blé insoluble dans l'eau, les solutions salines et l'éthanol à 70%, et représentent 40 à 50 % des protéines totales de la farine. Ce sont des polymères avec un poids moléculaire compris entre quelques centaines de mille et plusieurs millions de DA.

Ces polymères de gluténines sont réduits par un agent réducteur (2-mercaptoéthanol ou dithiothreitol) en sous-unités de 25 à 130kDa. Après séparation par SDS PAGE, deux groupes de gluténines sont distingués : les sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) de 70 à 120kDa et les sous-unités de faibles poids moléculaire (SG-FPM) de 25 à 50kDa (fig. 4).

Ces protéines présentent une diversité moins importante que celle des gliadines.



**Figure 4 : Séparation des sous unités de gluténines et Sécalines par SDS-PAGE**

### 2.3.1. Les gliadines :

Comme les autres composantes du gluten, les gliadines sont caractérisées par leur insolubilité dans l'eau. Les gliadines représentent de 40 à 50% des protéines de réserve dans le grain de blé (Shewry et *al.*, 1986). Ce sont des protéines monomères solubles dans l'éthanol 70% dont les ponts disulfures sont intramoléculaires (Kasarda, 1989).

L'analyse par électrophorèse a montré que les gliadines forment un groupe de prolamines hautement hydrogène forme de plus de 100 composantes (Anderson et *al.*, 1997; Payne, 1987). Leur polymorphisme est si important qu'il sert de moyen d'identification variétale (Evans et *al.*, 1972). L'étude de la composition en gliadines sur 70 variétés a montré qu'elles sont formées de 20% d'alpha, 28% de bêta, 34% de gamma et 18% d'oméga gliadines (Branlard et Dardevet, 1985).

Les omégas gliadines se distinguent des autres familles par leur poids moléculaire (55-75 kDa), une forte teneur en glutamine et en proline et surtout par l'absence de cystéine. Alors que, les alpha, bêta et gamma-gliadines contiennent moins de glutamine et de proline. Mais elles sont riches en acides aminés soufrés avec des poids moléculaires variant de 30kDa à 60kDa.

La facilité d'extraction des gliadines est à la source de plusieurs travaux sur leur structure et leur relation avec la qualité de la pâte (Coulson et Sirn, 1964; MacRichie et *al.*, 1990). Malheureusement, les études sur des combinaisons de sous-unités de glutenine à haut poids moléculaire et de gliadines dans différents cultivars ont révélé une relative influence des gliadines sur les propriétés rhéologiques de la pâte (Branlard et Dardevet, 1985; Lagudah et *al.*, 1987). De plus, les effets des gliadines sur la qualité de la pâte ont été attribués à l'association de ces dernières avec les glutenines à faible poids moléculaire FPM (Payne et *al.*, 1987).

#### **a. Composition en acides aminés :**

La composition en acides aminés des gliadines est caractérisée par un taux élevé de glutamine et de proline (tab.5) (Weiser et *al.*, 1987), par contre leur teneur en acides aminés basiques est très faible.

Les  $\alpha$ -,  $\beta$ - gliadines représentent 45 à 60% des gliadines totales, et possèdent 6 cystéines engagées dans les liaisons intramoléculaires. La différenciation entre  $\alpha$ - et  $\beta$ - gliadines peut être artificielle et donc elles peuvent être réunies au sein de la même famille des  $\alpha$ - gliadines ou ( $\alpha/\beta$  gliadines).

Les  $\gamma$ -gliadines représentent 30 à 40% des gliadines totales, et contiennent huit cystéines, généralement engagé dans quatre ponts disulfures intramoléculaires leur structure est fortement analogue à celle des sous-unités gluténines de faibles poids moléculaires (SG-FPM), mais leur composition en acides aminés est proche de celle des  $\alpha$ -gliadines sauf qu'elle se différencie par une teneur légèrement plus élevée en glutamines, proline et phénylalanine et plus faible en tyrosine.

Les  $\omega$ - gliadines se différencient des  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ - gliadines par leur teneur très élevée en glutamine, proline et phénylalanine et par l'absence d'acides aminés soufrés (cystéines et méthionines), elles sont incapables de participer à la formation d'un réseau protéique par formation de liaisons covalentes.

La teneur en acides aminés chargés (lysine, arginine, histidine, acide aspartique, acide glutamique) est très faible et celle des résidus hydrophobes est élevée (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine).

La particularité de la composition en acides aminés des gliadines a une influence sur la charge, la structure et la conformation des la valeur nutritionnelle.

**Tableau 5 : Composition en acides aminés des principales fractions protéiques du grain du blé (mol %). Réduit de Cheftel et *al.*, 1985. ND : non déterminé.**

	Albumines	Globulines	Gliadines	Gluténines
<b>Asp</b>	7.0	6.0	2.8	3.6
<b>Thr</b>	2.8	4.8	2.4	3.4
<b>Ser</b>	5.2	11.1	6.1	6.9
<b>Glx</b>	14.0	5.1	34.4	28.9
<b>Pro</b>	8.5	3.6	16.2	11.9
<b>Gly</b>	4.8	9.5	3.1	7.5
<b>Ala</b>	7.3	6.1	3.3	4.4
<b>Cys</b>	6.5	13.4	3.3	2.6
<b>Val</b>	8.1	2.4	4.8	4.8
<b>Met</b>	0	0.4	1.2	1.4
<b>Ile</b>	3.7	1.4	4.3	3.7
<b>Leu</b>	9.5	9.0	6.9	6.5
<b>Tyr</b>	2.2	1.6	1.8	2.5
<b>Phe</b>	3.5	2.4	4.3	3.6
<b>His</b>	3.2	1.8	1.9	1.9
<b>Lys</b>	8.7	10.6	0.6	2.0
<b>Arg</b>	5.0	10.6	2.1	3.0
<b>Trp</b>	ND	ND	0.4	1.3

➤ **La charge** : Les gliadines sont considérées comme les protéines les moins chargées; car en effet, elles ne contiennent que 6 à 11 résidus basiques par molécule (lysine, histidine, arginine) Feillet, 2000, Ewart en 1983 confirme que 85 à 95% des résidus acides glutamiques et acides aspartique sont sous forme amidée (glutamine, asparagine), ainsi il n'y aurait que 8 à 9 groupes carboxyliques libre par molécule.

Dans une étude comparative par Kasarda et *al.*, 1976, la sérum albumine, qui a un poids moléculaire voisin de celui des  $\omega$ -gliadines, contient 95 groupes carboxyliques libres par molécules.

➤ **Structure et conformation** : Les  $\omega$ -gliadines ne contiennent ni d'hélices- $\alpha$ , ni de feuillets- $\beta$  à cause de leur forte teneur en proline qui interrompte la structure ordonnée de ce type. Leur domaine N-terminal, répétitif, contient une majorité de coude  $\beta$  qui



contribueraient à la formation d'une structure en spirale (grain de blé), par contre la forte teneur en résidus apolaires rend possible une conformation non globulaire.

➤ **La valeur nutritionnelle :** la faible teneur des protéines de réserve du grain blé en lysine demeure un facteur limitant de la valeur nutritionnelle de ce dernier. Aucune gliadine purifiée jusqu'alors n'a présenté une forte teneur en lysine, sauf dans les cas de contamination de la fraction prolamine par des albumines ou des globulines.

## **b. Séquences :**

Grâce à la technologie et à la science les séquences d'acides aminés de quelques gliadines sont connues. Kasarda et *al.*, (1974) et Bietz et *al.*, (1977) regroupent les séquences N-terminale en trois types  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\omega$  (le type  $\alpha$  correspond aux  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma 1$  gliadines). D'après Lasztity (1984) la séquence N-terminale des  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ - gliadines est commune : Valine-Arginine-Valine-Proline-Glutamate-Leucine-Glutamate-Proline.

Le domaine C-terminal (homologue pour les différentes gliadines) est constitué de séquences non répétitives renfermant la quasi-totalité des acides aminés soufrés (6 à 8 résidus de cystéine) et permettent la création de 3 à 4 ponts disulfure intracaténaux.

Les séquences N-terminale des  $\gamma 1$  et  $\gamma 2$  et les  $\omega$ -gliadines sont très différentes les unes des autres, l'analyse de ces séquences montre l'existence certaine de séquences répétitives pour toutes les gliadines débutant après environ 12 acides aminés N-terminaux. Ces séquences ne sont très identiques pour les types  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\omega$  mais seraient cependant très voisines associant sous 3 glutamines est une proline. Dans aucune des gliadines la séquence Proline-Proline n'a été trouvée.

## **c. Configuration des gliadines :**

La conformation des gliadines monomériques peut varier en fonction des conditions du milieu. Elles peuvent passer de l'état de pelote statistique pour des pH inférieurs à 5 (diamètre de la molécule 70Å) à celui de protéine globulaire compacte (diamètre de 40Å) lorsque le pH du milieu est supérieur à 5 et que la force ionique est très faible (voisine de

zéro). Ces structures globulaires s'agrègent pour donner des structures fibrillaires (diamètre de l'hélice 60Å) quand le pH est supérieur à 5 et la force ionique différente de zéro. Ces modifications de conformation s'accompagnent de modification de l'hydrophobie de surface.

Les gliadines pauvres en soufre (gliadine  $\omega$ ) sont riches par contre en glutamine, proline et phénylalanine mais l'hydrophobie de surface est inférieure aux gliadines  $\gamma$ ,  $\alpha$ , et  $\beta$ . Les  $\omega$ -gliadines ne contiennent ni hélice  $\alpha$ , ni feuillet  $\beta$ , mais contiennent des coudes  $\beta$ . Cette structure est stabilisée par les interactions hydrophobes entre les résidus d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et les liaisons hydrogènes se trouvant dans les résidus glutamines. Comme la teneur en cystéine est faible (voire nulle), les liaisons disulfures ne sont pas importantes pour la conformation des  $\omega$ - gliadines.

Le domaine répétitif pourrait dans de nombreux cas recouvrir la totalité de la séquence. La structure en hélice  $\alpha$  des gliadines est très stable (Tatham et Shewry, 1985). Selon Popineau et Pineau, 1988) les principales forces de stabilité de la gliadines sont attribuées au nombre très élevé de liaison hydrogènes, bien que les liaisons disulfures aident aussi à la stabilité.

### 2.3.2. Les gluténines :

Les gluténines sont des polymères de protéines dont les chaînes polypeptidiques élémentaires, qualifiées de sous-unités de gluténines, sont réunies par des ponts bisulfures intermoléculaires (Shewry et *al.*, 1995). Leur capacité à se polymériser leur permet d'atteindre un poids moléculaire de plusieurs millions de dalton.

En plus de représenter 40 à 50% des protéines de réserve totale de la graine de blé, elles jouent un rôle déterminant dans la qualité de la farine de blé (Gupta et *al.*, 1990; Payne et *al.*, 1987; Wrigley et Bietz, 1988). Selon leur mobilité dans un gel SDS-PAGE, ces gluténines sont regroupées en deux classes de sous-unités: une plus mobile, regroupe les gluténines à faible poids moléculaire (FPM), l'autre moins mobile, est représentée de par des gluténines à haut poids moléculaire (HPM).

### 2.3.2.1. Les sous-unités de gluténines à faible poids moléculaire (FPM) :

Les gluténines à FPM sont des sous-unités solubles en milieu acide ou dans 70% en présence d'agents réducteurs (Payne *et al.*, 1987). Ces prolamines sont riches en acides aminés soufrés, ayant la capacité de se polymériser. Les sous-unités de gluténines à FPM constituent un important groupe de polypeptides représentant 60 à 70% des gluténines, impliquées dans les propriétés rhéologiques du gluten (Seiimeier *et al.*, 1991 *in* Benmoussa), dont les poids moléculaires sont compris entre 30 kDa et 75 kDa (MacRitchie *et al.*, 1990).

Les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire (FPM) ont été classées en trois groupes (Payne et Corfield, 1979 ; Jackson *et al.*, 1983) :

- ✓ Groupe B : le groupe majeur, qui correspond à des sous-unités très basiques ayant une faible mobilité en SDS-PAGE que les  $\omega$ -gliadines ;
- ✓ Groupe C ; il est mal défini car il correspond à la même mobilité que les  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -gliadines en SDS-PAGE. Leur poids moléculaire varie entre 31 à 36 kDa.
- ✓ Groupe D : ses constituants présentent les plus fortes mobilités en SDS-PAGE. Ce groupe représente les protéines les plus acides de l'endosperme.

### 2.3.2.2. Les sous-unités de gluténines à haut poids moléculaire (HPM) :

Plusieurs études ont été rapportées sur la variation des gluténines à HPM et leur contribution à la qualité de la farine (Gupta *et al.*, 1990; MacRitchie *et al.*, 1990; Kloster *et al.*, 1991). Précisément, un effet significatif de la variation de leurs allèles sur l'élasticité de la pâte a été rapporté par Payne *et al.*, (1984). C'est un groupe qui représente 30 à 40% des gluténines.

En se basant sur la position des sous-unités HPM dans un gel SDS-PAGE (Payne *et al.*, 1981) ont suggère leur subdivision en deux sous-groupes. L'un dont les sous-unités de type y qui migrent plus rapidement sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide SDS avec un poids moléculaire variant de 67 à 74 kDa et l'autre dont les sous-unités de type x migrent plus lentement avec un poids moléculaire de 83-120 kDa (Shewry *et al.*, 1984).

### **a. Composition en acides aminés :**

L'acide aminé dominant est l'acide glutamique qui se présente sous sa forme amidée : la glutamine. Il a été déjà montré que les sous-unités à FPM possèdent une composition en acide aminé voisinant celles des  $\alpha$  et  $\gamma$ -gliadines avec davantage de sérines et moins d'alanine (Weiser et *al.*, 1990)

La teneur en cystéine est de 0.4% dans le groupe de type x et de 1.3% dans celui de type y. Le domaine N-terminal possède la quasi-totalité des résidus de cystéine. D'ailleurs, la région N-terminale de la séquence de type x contient 3 résidus cystéine versus 5 pour celle du type y, alors que le domaine C-terminal ne contient qu'un seul résidu de cystéine dans les deux types de sous-unités (Shewry et *al.*, 1989).

Cette différence du nombre de cystéines entre les domaines peut être expliquée par des délétions le long des séquences d'acides aminés des sous-unités de gluténine. Le taux élevé des acides aminés non polaires, comme la leucine, permet les liaisons hydrophobes entre les chaînes protéiques. La petite quantité d'acides aminés acides et basiques permet la dissolution des gluténines uniquement dans des solvants acides ou basiques.

Les groupes disulfures peuvent être clivés par le 2-Mercaptoéthanol (Bietz et *al.*, 1973) et ainsi les gluténines sont réduites jusqu'à plus de 15 sous-unités différentes partagées entre deux groupes en SDS-PAGE (Hamauzu et *al.*, 1972 ; Huebner et Wall, 1974 ; Payne et Corfield, 1979) à savoir les sous-unités gluténines HPM et les sous-unités gluténines FPM (Bietz et *al.*, 1977 ; Payne et Corfield ; 1979).

### **b. Séquence :**

La comparaison entre les séquences d'acides aminés des sous-unités de gluténine à FPM a montré la présence d'une séquence consensus subdivisée en deux grands domaines (Colot et *al.*, 1989; Okita et *al.*, 1985; Cassidy et Dvorak, 1991 *in* Benmoussa ). Le domaine I est situé à l'extrémité N-terminal et contient des motifs répétés, tandis que le domaine II n'en possède pas (fig.2).

La structure du domaine I est conservé chez les autres protéines de réserve du blé, du seigle et de l'orge, ce qui permet de supposer que ce domaine est probablement essentiel à l'adressage des protéines de réserve (Galili et *al.*, 1993). Le domaine II est aussi subdivisé en 3 sous domaines (A, B et C) interrompus par des régions courtes (11, 12, 13 et 14). 11 et 13 sont riches en glutamines et sont spécifiques aux gliadines à FPM (Shewry et *al.*, 1989).

La structure primaire des sous-unités à HPM est marquée par 3 domaines : un domaine N-terminal non répétitif de 80 à 100 résidus, un domaine central répétitif de 400 à 700 résidus et un domaine C-terminal d'une quarantaine de résidus. Les domaines N et C-terminal renferment de nombreux acides aminés chargés et la quasi-totalité des acides aminés soufrés. Le domaine répétitif est constitué par la répétition d'un hexapeptide (QQPGQG) dans le quel viendra s'insérer un hexapeptide (YYPTSP) et un tripeptide (QQP ou QPG).

Les différences entre  $\alpha$  et  $\gamma$  HMW-GS résident au niveau des parties N-terminal et partie répétitive ainsi qu'au niveau du nombre de résidus de cystéine (4 dans la  $\alpha$  SG-HPM dont 3 en N-terminal et un en C-terminal ; et dans la  $\gamma$  SG-HPM 4 résidus en N-terminal et 1 résidu dans la partie répétitive et le domaine C-terminal).

Au point de vue de la structure secondaire on met en évidence que le domaine répétitif est constitué par de nombreux coudes béta inverses entraînant la formation d'une spirale qui confère les propriétés élastiques du gluten. Les domaines N et C-terminal sont sous forme globulaire et renferment des hélices alpha.

### **c. Structure et conformation :**

La structure des sous-unités gluténines et celle des gliadines monomériques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  sont semblables (Kreis et *al.*, 1985) Cette homologie mise en évidence par Kasarda et *al.* (1984) indique que les gènes codant pour les gliadines et les gluténines FPM dériveraient probablement d'un gène ancestral unique. Cette divergence a donc donné naissance aux principales sous familles et aux sous-unités gluténines FPM.

Plusieurs modèles de la structure des gluténines de blé ont été proposés. L'un des premiers modèles moléculaires a été celle de :

Ewart (1968), il a été ensuite modifié par le même auteur en 1972 et 1979. Il a fait intervenir des sous-unités de masse moléculaire voisine de 45kDa renfermant au minimum 4 cystéines qui donneront des ponts disulfure intra et intercaténaire. Il est possible avec ce modèle d'expliquer l'élasticité du gluten par la cassure des ponts disulfure entraînant un allongement de la molécule et la reformation des ponts qui permet un retour à la forme initiale.

Khan et Bushuk (1979) ont proposé un modèle qui prend en considération les deux modèles précédents. Les HMW-GS sont associées par des ponts disulfures et les LMW-GS sont associées aux HMW-GS par interactions hydrophobes. Sur cet ensemble vient s'associer les gliadines par des liaisons faibles énergie.

La conformation des SG-HPM est caractérisée par une large proportion de coudes  $\beta$ . La présence des coudes  $\beta$  ainsi que les super hélices formées par la succession des hexa nanopptides dans le domaine répétitif sont supposé être à l'origine de l'élasticité des gluténines (Tatham *et al.*, 1985). Les domaines N-terminaux contiennent quelques structures en hélice  $\alpha$ .

#### **d. Localisation chromosomique :**

Le génome du blé contient 16 milliards de bases (Feillet, 2000). Les protéines du gluten ont fait l'objet d'une importante bibliographie (Wrigley *et al.*, 2006). L'une des avancées les plus importantes dans la science du blé été l'établissement dès les années 70, de la localisation chromosomique des gènes codant pour les protéines du gluten (Sears, 1966 ; Wrigley et Shepherd, 1973 ; Payne, 1987).

Les premières études génétiques des protéines de réserve ont été menées séparément Par Boyd et Lee, 1967 et Shepherd, 1968 en utilisant une électrophorèse sur gel d'amidon à pH acide. Ils ont étudié des lignées de blé aneuploïdes pour déterminer quels sont les chromosomes qui portent les gènes contrôlant ces protéines.

Un gène peut exister sous différentes formes et coder des protéines différentes : on parle d'allèles. L'emplacement d'un gène sur un chromosome est un locus. Il arrive que plusieurs gènes soient très proches les uns des autres et soient, de ce fait, transmis ensemble de

génération en génération : ils forment un bloc de gène au sein desquels des recombinaisons de gènes sont très rare : on parle de blocs, ou de groupes, alléliques (feillet, 2000). Il existe un multi allélisme important au niveau des loci des SG-HPM mais surtout au niveau des gliadines et des SG-FPM, d'où un polymorphisme important en analyse électrophorétique, (fig. 5).

L'analyse génétique de ces protéines est aujourd'hui bien avancée. Ainsi, sur les vingt et une paires de chromosomes du génome du blé tendre, six d'entre elles sont responsables de la synthèse des gliadines et trois de celle des gluténines. Chez le blé tendre (*T. aestivum*), ces protéines sont codées par des gènes situés sur douze principaux locus complexes (car pouvant être formés de plusieurs gènes très liés) (Branlard, 1993).

Les locus Glu-1, Glu-3 codant respectivement pour les SG-HPM et SG-FPM, et Gli-1 pour les  $\omega$ -gliadines, sont situés sur les chromosomes 1A, 1B et 1D, tandis que les locus Gli-A2, Gli-B2 et Gli-D2 codant pour les  $\alpha$ -  $\beta$ - et  $\gamma$ -gliadines sont sur les bras courts des chromosomes 6A, 6B et 6D.

Chacun de ces douze locus est complexe puisque la traduction de ses acides ribonucléiques (ARN) transcrits peut donner jusqu'à une douzaine de protéines différentes par leur séquence primaire (Branlard, 2009).

Chacun des loci Gli-1 contient un ensemble de gènes étroitement liés qui peuvent être identiques ou différent allant de 3 à 5 et parfois plus (on a dénombré jusqu'à 12 gènes) codant pour autant de protéines ( $\omega$ - et  $\gamma$  gliadines) transmises en bloc alléliques observés, à ce jour, par électrophorèse monodimensionnelle en milieu acide (acide-page) des gliadines est au total pour les 6 loci (Gli-1 et Gli-2) voisin de 130 (Metakovsky, communication personnelle). Les polypeptides des gliadines codés par chacun des loci sont hérités en bloc considérés comme un allèle des gliadines.

Dans les années 1980, ces gènes n'étaient pas séquencés, mais l'analyse de leurs produits d'expression a été à la base des progrès en génétique de la qualité des blés, les études ont démontrées que les  $\omega$ -gliadines mineurs étaient codés par des gènes plus ou moins éloignés du locus Gli-A, on retrouve sur le chromosome A1 les loci Gli-A3 (Payne et *al.*,

1988), Gli-A4 (Redaelli et al., 1992). Concernant le chromosome B1, deux nouveaux loci ont été localisés, Gli-B3 (Galili et Feldman, 1984 ; Jackson et al., 1985 ; Metakovsky et al., 1986 ; Dachkevitch et al., 1993) et Gli-B5 (Pogna et al., 1993) qui coderaient soit des  $\omega$ -gliadines soit des SG-FPM du groupe D. Quant au chromosome D1, un locus équivalent des loci Gli-A1 et Gli-B5 aurait été localisé (Metakovsky et al., 1990).

Sur les deux dernières décennies, l'analyse de la diversité des gliadines et des gluténines a été conduite dans la plupart des pays où le blé est cultivé. L'analyse des gliadines de 939 blés tendres provenant de 28 pays (Metakovsky et al., 2006) permet de dénombrer au total 174 variants alléliques aux locus *Gli-1* et *Gli-2*. L'origine de cette imposante diversité génétique réside d'une part dans le fait que ces protéines correspondent à des familles multigéniques (Branlard 2009).

Selon Payne et al., (1980) ; Lawrence et Shepherd (1981) ; le contrôle génétique des sous-unités de gluténines est assuré par les gènes situés sur les chromosomes du groupe 1. Les SG-HPM sont contrôlées par des gènes localisés sur les bras longs (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*).

Au niveau de chaque locus se trouve associé deux gènes dénommés x et y fortement liés qui codent chacun pour un type de sous-unités ayant une mobilité électrophorétique différente. Forde et al., en 1985 ont démontrés que les SG-HPM de type x étant les plus lentes, suivant les chromosomes (1A, 1B), un des deux gènes peut ne pas être exprimé et ils parlent alors d'allèle nul. Le peptide y du *Glu-A1* ne s'exprime jamais chez le blé hexaploïde malgré que le gène de structure est présent.

Selon Lawrence et Shephred, 1981 de rares recombinaisons ont été détectées entre les gènes codant les sous-unités x et y sur le *Glu-A1*, sur le *Glu-B1* (Payne et al., 1984) et sur le *Glu-D1* (Singh et Shephred, 1988). L'ensemble des trois chromosomes du groupe 1 permet l'expression de 3 à 5 SG-HPM. Certains allèles sont plus exprimés que d'autres.

La diversité des SG-HPM est beaucoup moins importante que celle des gliadines (environ 40 allèles), on a pu dénombrer respectivement 22, 56 et 66 allèles aux locus *Glu-A1*, *Glu-B1* et *Glu-D1* (McIntosh et al., 2003 in Branlard, 2009).



La diversité des SG-FPM révélée par électrophorèse monodimensionnelle est moins importante : 16, 25 et 5 allèles respectivement codés aux locus *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-D3* (McIntosh et al., 2003 in Branlard, 2009). Bien évidemment, dans la population des blés français, ces allèles sont moins nombreux (Branlard et al., 2003), mais leur diversité demeure relativement élevée par comparaison à une collection mondiale de blés tendres.



**Figure 5 : Localisation chromosomique des principaux gènes codant pour les gluténines et les gliadines chez le blé.**

#### 2.4. Effet des protéines de réserve sur la qualité technologique des blés :

Les différences variétales en terme de qualité sont essentiellement dues au gluten et à ses nombreuses protéines constitutives. Les chercheurs ont pu montrer les relations entre la présence (ou l'absence) d'une protéine de réserve de l'albumen et des caractéristiques technologiques telles que la ténacité, l'extensibilité, la force boulangère.

La force boulangère repose en grande partie sur les caractéristiques rhéologiques de la pâte qui sont fortement influencées par les protéines de réserve de l'albumen, gliadines et gluténines. Les propriétés viscoélastiques du gluten expliquent les propriétés rhéologiques d'une pâte et de sont aptitude plus ou moins grande selon le type de fabrication envisagé : ainsi la fabrication de biscuits secs demande une pâte très extensible, tandis que celle de pain de mie exige au contraire une pâte très tenace. **Histoire et amélioration**

Les travaux de Finney (1971) ainsi que nombreux autres travaux ont montrés le rôle direct des fractions d'Osborne dans le processus de panification en constatant que les gliadines contribuent à l'extensibilité de la pâte, tandis que les gluténines comprenant les résidus de haut poids moléculaire contribuent à l'élasticité et la stabilité de la pâte au cours du pétrissage.

Selon les travaux de Preston et *al.*, (1975) les gliadines sont indispensables pour le maintien de la viscoélasticité de la pâte (par substitution des protéines des différents groupes dans une farine synthétique). En 1990, McRitchie et al confirment ces résultats à l'aide d'une expérience qui montre que la fraction des gliadines isolée donnait une masse visqueuse tandis que la fraction des gluténines donnait elle une masse élastique. Une extraction progressive des protéines de réserve permet l'obtention des fractions successives : les premières (contenant essentiellement des gliadines) provoquant une diminution de la force alors que les dernières (essentiellement des gluténines) l'augmentent.

Malgré cette imposante diversité et l'impossibilité de tester toutes les interactions entre les variants alléliques, l'analyse des relations entre les protéines de réserve et la valeur d'utilisation des blés a révélé plusieurs points majeurs (Branlard et *al.*, 2001, Luo et *al.*, 2001, Shewry et *al.*, 2003, Gobaa et *al.*, 2008) :

1. les locus Glu-1 des SG-HPM ont un effet additif majeur par rapport aux autres locus sur les caractéristiques technologiques de la pâte. Des indices de qualité calculés sur les effets additifs des principaux allèles des SG-HPM ont été proposés et largement utilisés en sélection;

2. de nombreux allèles des SG-FPM ont aussi un effet significatif sur la variation des caractères rhéologiques de la pâte. En plus des effets additifs, certaines interactions avec des allèles des locus Glu-1 peuvent être exploités (Rousset et *al.*, 1990) ;

3. les effets des variants alléliques des gliadines ont aussi été mis en évidence et sont, pour certains, associés à une meilleure extensibilité de la pâte (Branlard et Metakovsky, 2006 *in* Branlard, 2009) ;

4. les SG-HPM et SG-FPM, de par les liaisons disulfures qui sont engagées entre ces sous unités, ont une forte influence sur la taille des polymères et, par conséquent, sur la force et la ténacité de la pâte.

Les gliadines, qui sont des protéines monomériques, agissent comme agent de viscosité et leur proportion influence l'extensibilité (Popineau et *al.*, 1994, Gupta et *al.*, 1995, Aussenac et *al.*, 2001). Les connaissances génétiques et biochimiques sur ces marqueurs furent transmises aux sélectionneurs qui peuvent les utiliser dans :

- Les choix des parents avant croisement ;
- La réalisation de rétrocroisements ;
- La création de populations;
- L'analyse des descendances ;
- La création de blés synthétiques.

La diversité des protéines de réserve des espèces proches du blé tendre telles que le triticale, le blé dur et les espèces diploïdes a aussi été analysée. L'utilisation de ces protéines dans des applications industrielles, notamment comme agent émulsifiant ou plastifiant, est possible et d'importants développements sont envisageables.

### **3. Les protéines du seigle et du triticale :**

#### **3.1. Les protéines de réserve du seigle et leur localisation chromosomique :**

D'un point de vue génétique, le génome du seigle et les génomes des *Triticum* sont assez fortement apparentés. Les analyses biochimiques, puis moléculaires, ont montré

l'existence de grandes similitudes quant au "fond génétique" et leur ADN (Appels, 1982 in Gallais and Bannerot, 1992). De ce fait on peut ranger les 7 chromosomes de seigle dans les 7 groupes d'homéologie définis pour le blé malgré les différences d'organisation (Devos et *al.*, 1993).

La teneur en protéines chez le seigle est de 14.4% de la masse sèche. Quatre groupes ont été purifiés et caractérisés (Shewry et *al.*, 1982 ; Field et *al.*, 1982 Shewry et *al.*, 1983 ; Kasarda et *al.*, 1983). Ces quatre groupes sont : les sous unités-sécalines de haut poids moléculaire (SS-HPM), les 75 K  $\gamma$ -sécalines, les  $\omega$ -sécalines et les 40 K  $\gamma$ -sécalines.

Le gène de structure pour le groupe des sécalines HPM est localisé sur le bras long du chromosome 1R (Lawrence et Shepherd, 1981 ; Shewry et *al.*, 1984), à proximité du centromère ( Shing et Shephred, 1984). Les  $\omega$ -sécalines et les 40 K  $\gamma$ -sécalines sont codées par des gènes situés sur le bras court du même chromosome (Shephred, 1968 ; Bernard et *al.*, 1977 ; Lawrence et Shepherd, 1981).

Le locus sur le bras long, initialement désigné Sec3, est nommé *Glu-R1* (par homéologie au blé) et le locus sur brascourt, *Gli-R1* avait été désigné Sec 1 par Shewry et *al.*, (1984). Le gène de structure des 75K  $\gamma$ -sécalines a été localisé sur le chromosome 2R chez *Secale cereale* (Lawrence et Shephred, 1981) et son locus *Gli-R2*, avait été initialement nommé Sec 2 (Shewry et *al.*, 1984).

Dans une espèce ancienne *Secale montanum* ce gène a été localisé sur le chromosome 6R (Shewry et *al.*, 1985). L'équivalent des gluténines FPM n'a pas été détecté chez *S.cereale*. Une seule sécaline FPM a été détecté chez *S. montanum* Mais la localisation chromosomique de son gène n'a pas été déterminée (Gupta et Shephred, 1990). EN plus de ces gènes, Carillo et *al.*, (1992) ont déterminé au autre locus Gli-R3 ou Sec 4 qui code pour deux sécalines de type  $\omega$ , ce locus est situé entre Gli-R1 et Glu-R1.

### 3.2. Les protéines de réserve du triticale et leur effet sur la panification :

Malgré un bon profil en acides aminés, la teneur en protéines d'un triticale est plus faible que celle d'un blé (11% sur sec en moyenne). Le rôle des protéines de réserve du triticale dans la qualité technologique est encore mal connu.

Le triticale comme le seigle, a une faible valeur de panification due sans doute à la présence du génome R du seigle. Dhaliwal et Mcritchie (1990) et Graybosch et *al.*, (1990) ont montré que la translocation du chromosome 1R chez le blé a un effet négatif sur sa qualité technologique. Cet effet négatif qui est du soit à l'absence des gluténines soit à la présence des sécalines est traduite par un gluten faible.

Pena et *al.*, (1998) ont étudié la diversité des SG-HPM du triticale et l'ont comparé avec celle du blé, tandis que Brzeneinski et Lukaszewski (1998) ont étudié une collection de triticales d'hiver et de printemps et on observé, chez les triticales d'hiver des proportions relativement élevées des allèles Glu-1 favorables à une bonne valeur boulangère chez le blé. Cependant la présence de ces allèles chez le triticale ne se traduit pas par une bonne valeur en panification du triticale.

Afin d'essayer d'améliorer cette qualité technologique, ils ont entrepris le transfert du chromosome 1D dans des différents fonds de triticale, mais les tests indirecte évaluant la qualité technologique ont montré l'effet négatif de ce transfert (Hohmann et *al.*, 1998). Les chercheurs s'aperçoivent que la qualité technologique et la valeur de panification du triticale ne peuvent pas être améliorées uniquement en ajoutant les allèles connus chez le blé, mais que le génome R du seigle est largement responsable de cet effet négatif.

Amiour et *al.*, (2002) dans une étude de substitution du chromosome 1R chez le blé tendre, ont montré que dans les trois cas 1R (1A), 1R (1B), 1R(1D) étudiés il y a augmentation de la concentration des protéines, ces résultats sont concordant avec ceux de Carver et Rayburn (1995) et divergeant avec ceux de Fenn et *al.*, (1994) ou la translocation 1BL/1RS a conduit à une diminution de la concentration des protéines.

Dans la même étude menée par Amiour (2000), la première substitution 1R (1A) semble être avantageuse pour quelques paramètres technologiques : la force et la ténacité fortement

liées au SG-HPM n'ont pas changé et ont significativement chuté dans les deux autres (1R (1B), 1R (1D)).

La seule sous unité de sécaline de haut poids moléculaire apportée par ce chromosome est la sous-unité (6.5). En l'a comparant aux SG-HPM codées aux loci *Glu-1*, elle semble être inférieure à toutes les sous-unités codées aux *Glu-B1* et *GluD1* à l'exception de la sous unité 7 codée au *Glu-B1* (a) à laquelle elle est équivalente.

La translocation 1AL/1RS, négative à la qualité technologique, montre l'intérêt du chromosome 1R réside dans son bras court où sont portés des gènes de résistance aux pathogène et qui améliorent les performances agronomiques (Amiour et *al.*, 2002)

Les résultats des travaux de Graybosch et *al.*, (1993) portant sur la texture du grain, relie la diminution de la dureté du grain dans les lignées de substitution 1R(1B) en comparaison aux lignées 1BL/1RS à facteur de dureté porté sur le 1BL et un facteur de tendreté porté sur le 1RL.

# **MATERIEL ET METHODES**

## **1. Matériel végétal :**

L'étude a porté sur une collection de **88** variétés de triticales hexaploïdes, qui nous ont été fournies par l'UMR Amélioration et santé des Plantes INRA de Clermont-Ferrand. Cette collection fait partie des nombreux travaux sur la diversité génétique des protéines de réserve des triticales hexaploïdes cultivés en France. Les 88 variétés de triticales sont représentées dans le tableau 6.

## **2. Méthodes d'étude :**

### **2.1. L'électrophorèse :**

#### **2.1.1. Définition :**

L'électrophorèse c'est la principale technique utilisée en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie, mais elle est essentiellement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou celle des acides nucléiques. Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait selon leur charge électrique et pour des charges semblables, selon leur taille. Cette technique a été mise au point par Laemmli (1970) où la séparation des molécules se fait en milieu basique à pH=8.8.

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: les anions (chargés négativement) migrent vers l'anode (potentiel positif) et les cations (chargés positivement) migrent vers la cathode (potentiel négatif). En ce qui concerne les molécules non chargées, il n'existe pas de migration.

Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions différents. Cela permet ainsi de les séparer. L'électrophorèse permet de traiter simultanément plusieurs échantillons en même temps. La séparation est fine.



**Tableau 6 : Liste des 88 variétés de triticales étudiées**

<b>N°</b>	<b>Noms des variétés</b>	<b>N°</b>	<b>Noms des variétés</b>
<b>1</b>	Raboliot	<b>45</b>	Grandual
<b>2</b>	Tridoc	<b>46</b>	Maximal
<b>3</b>	Kansas	<b>47</b>	Pivot
<b>4</b>	Lamberto	<b>48</b>	Puerto
<b>5</b>	Lupus	<b>49</b>	Trimour
<b>6</b>	Partout	<b>50</b>	Triskell
<b>7</b>	Rhino	<b>51</b>	Ticalo
<b>8</b>	Bellac	<b>52</b>	APRIM
<b>9</b>	Kortego	<b>53</b>	Beneficio
<b>10</b>	Magnat	<b>54</b>	Benetto
<b>11</b>	Osorno	<b>55</b>	Collegial
<b>12</b>	Auriac	<b>56</b>	Delgado
<b>13</b>	Bienvenu	<b>57</b>	Gwendal
<b>14</b>	Cedro	<b>58</b>	Portignac
<b>15</b>	Passo	<b>59</b>	Trignac
<b>16</b>	Triade	<b>60</b>	Triveder
<b>17</b>	Trouvere	<b>61</b>	Fleurus
<b>18</b>	Beauval	<b>62</b>	Trigone
<b>19</b>	Dedretto	<b>63</b>	Vivero
<b>20</b>	Bilbao	<b>64</b>	Amarillo
<b>21</b>	Blenio	<b>65</b>	Ragtac
<b>22</b>	Matinal	<b>66</b>	Seconzac
<b>23</b>	Precocius	<b>67</b>	Innoval
<b>24</b>	Stimulus	<b>68</b>	Tritikon
<b>25</b>	Tanguy	<b>69</b>	Constant
<b>26</b>	Tremplin	<b>70</b>	Triticor
<b>27</b>	Triologie	<b>71</b>	Dagro
<b>28</b>	Wilfried	<b>72</b>	Domital
<b>29</b>	California	<b>73</b>	Spacial
<b>30</b>	Automnal	<b>74</b>	Aubrac
<b>31</b>	Bellac	<b>75</b>	Colossal
<b>32</b>	S.W Flamoro	<b>76</b>	Olympus
<b>33</b>	Floriac	<b>77</b>	Calao
<b>34</b>	Grenado	<b>78</b>	Orbital
<b>35</b>	S.W Midelo	<b>79</b>	Cornac
<b>36</b>	S.W.Morado	<b>80</b>	Capital
<b>37</b>	S.W Talontro	<b>81</b>	Rotego
<b>38</b>	Triplus	<b>82</b>	Trinidad
<b>39</b>	Triptic	<b>83</b>	Clercal
<b>40</b>	Trivial	<b>84</b>	Lasko
<b>41</b>	Alimac	<b>85</b>	Torpedo
<b>42</b>	Agrilac	<b>86</b>	Magsistral
<b>43</b>	Diwann	<b>87</b>	Newton
<b>44</b>	Espoir	<b>88</b>	Trimaran

### 2.1.2. Principe de la SDS-PAGE :

Cette technique permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire. La matrice est créée par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont les agents de polymérisation. La grosseur des pores formés est fonction de la concentration d'acrylamide. Plus la concentration est élevée, plus les pores seront petits et les molécules les mieux séparées seront celles de petits poids moléculaires.

Cette méthode de séparation, par rapport à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (ou PAGE pour *Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) classique, est une méthode dénaturante en raison de l'ajout de laurylsulfate de sodium (ou SDS pour *Sodium dodécyl sulfate*).

Dans ce gel dénaturant, on retrouve ce SDS qui se lie aux protéines selon un ratio constant (1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Le SDS est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative.

Cela signifie que seul le poids moléculaire apparent (et non réel) des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaires (les protéines ayant un petit poids moléculaire migreront plus loin que les grosses).

Par ailleurs, la migration dans le gel est aussi fonction de modifications post-traductionnelles des protéines: glycosylations ou phosphorylations par exemple. Les protéines sont tout d'abord condensées dans un gel de concentration puis séparées dans un gel de séparation. Lorsque les protéines ont été séparées, leur visualisation peut être effectuée en les colorant directement (Bleu de Coomassie ou nitrate d'argent).

Cette coloration permet de visualiser toutes les protéines dans l'échantillon dont la concentration dépasse la limite de détection de la coloration. Le gel coloré au bleu de Coomassie peut être ensuite décoloré par un mélange méthanol/acide acétique glacial/eau.

### 2.1.3. Préparation des gels :

Dans la méthode de séparation par SDS-PAGE nous devons préparer deux types de gels : Un gel de séparation qui permet de fractionner les différentes protéines et les sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires et un gel de concentration permettant de retenir les impuretés et de tasser les protéines.

Avant de préparer les gels on doit procéder au montage des plaques, après les avoir nettoyées à l'éthanol, puis on les place l'une contre l'autre en les séparant avec deux espaceurs dont on choisit l'épaisseur (annexe).

#### a. Le gel de séparation (running gel) :

Le gel de séparation est à **T=12.8%** et **C=0.97%**. Ces dimensions sont de **180x160x1.5mm**. Il est constitué d'acrylamide à 35% (p/v), de N-N'-Méthylène-Bisacrylamide à 2% (p/v), de Tris HCL à pH=8.8, de SDS à 10% (p/v) et d'eau distillée. La réaction de polyacrylamide est catalysée par l'ammonium persulfate (APS) à 1% (p/v) et le TEMED.

Une fois tous les constituants mélangés (les catalyseurs sont ajoutés en dernier lieu), le gel est coulé doucement entre les plaques (montées auparavant) pour ne pas faire de bulles jusqu'à un niveau délimité sur l'une des plaques pour laisser la place au gel de concentration (environ 4 cm de l'encoche).

Ensuite, on coule une fine couche de butanol pour égaliser la surface du gel et éviter son contact avec l'air afin de faciliter la polymérisation. Au bout de 30 à 45 minutes le gel prend, on se débarrasse du butanol et on rince à l'eau distillée.

#### b. Le gel de concentration (stacking gel) :

Le gel est à **T=2.8%** et **C=1.4%**. Il a les dimensions de **180 x40 x 1.5 mm**. Il est constitué de la même façon que le gel de séparation avec une seule différence au niveau du Tris HCL qui a un **pH de 6.8**. Le gel de concentration est coulé sur le gel de séparation, les peignes sont posés bien centrés entre les plaques en évitant de faire de bulles. Le gel prend après une durée de 45 à 60 minutes ; les peignes sont retirés soigneusement pour ne pas casser les puits. Enfin, on verse le tampon dans les puits est on fait les dépôts.

### **c. Le tampon d'électrophorèse :**

Le tampon de migration est constitué de glycine à 1.41% (p/v), de Tris à 0.3% (p/v) et de SDS à 0.1% (p/v), (annexe).

### **d. La migration :**

Après le dépôt des différents échantillons, la cuve d'électrophorèse (bac inférieur) est remplie à un niveau suffisant avec le tampon d'électrophorèse.

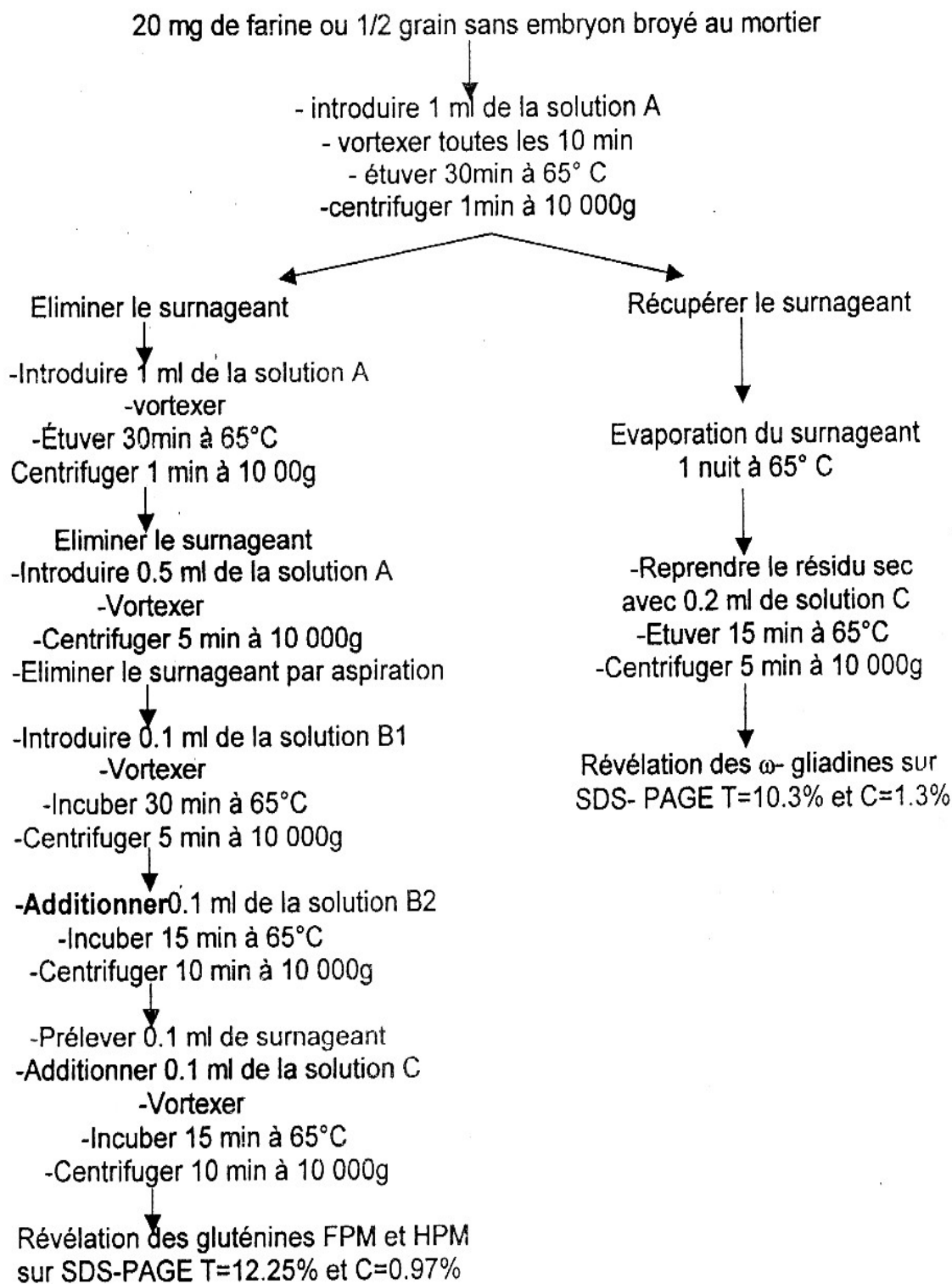
Le bac supérieur situé entre les deux plaques (qui doivent être bien serrées contre les joints pour éviter les fuites) est rempli lui aussi avec le même tampon jusqu'à ce que les faces supérieures des gels soient immergées ; ce dernier est placé dans la cuve d'électrophorèse pour que les faces inférieures des gels plongent dans le tampon.

Enfin, on ferme la cuve puis on la relie à un générateur qui va assurer le passage du courant électrique. La migration est menée avec une intensité constante de **40mA/gel**.

## **3. Méthodes d'extraction des sécalines et des gluténines du triticale :**

L'extraction des protéines du triticale est réalisée à partir de la farine d'un grain de triticale obtenue après broyage au mortier et recueillie dans un Ependorff de 1.5 ml.

La méthode d'extraction utilisée est la technique d'extraction séquentielle décrite par Singh *et al.*, (1991) et modifiée par Amiour *et al.*, (2002) et qui consiste à extraire les protéines de réserve séquentiellement selon leur solubilité dans les trois solutions d'extraction de base (fig. 6).



**Figure 6 : Extraction des gluténines HPM, FPM et  $\omega$ -gliadines  
D'après SINGH and CORNISH 1991**

- i. On rajoute dans l'Ependorff qui contient la farine du grain de triticales 1 ml d'une solution de 1-propanol à 50% (solution A) pour extraire les gliadines avec étuvage à 65°C pendant 30 minutes entrecoupé de deux vortex intermédiaires toutes les 10 minutes.
- ii. Ensuite, le surnageant est éliminé du tube puis récupéré dans un autre Ependorff après centrifugation à 10000g pendant une minute. On rajoute à la farine la **solution "A" (annexe)** une seconde fois, on étuve à 65°C pendant 30 minutes, cette fois sans vortex intermédiaire, puis on centrifuge à **10000 g** pendant 1 minute et on élimine le surnageant. On réintroduit par la suite 0.5 ml de la solution « **A** » une troisième et dernière fois, on vortex, on centrifuge à **10000g** pendant 5 minutes sans étuver puis on élimine le surnageant par aspiration. Ces trois étapes d'extraction à la solution A ont pour but d'extraire et d'éliminer la quasi totalité des gliadines pour ne laisser dans la farine que les gluténines et les sécalsines.
- iii. On rajoute **100µl** de la solution **B1 (annexe)** qui est à base de 1-propanol à 50% (v/v) de tris HCl pH=8 à 0.08 M et d'un réducteur le Dithiothreitol (DDT) à 1% (p/v) préparé extemporainement pour extraire et réduire les gluténines et les sécalsines, ensuite on vortex, on étuve à 65°C pendant 30 minutes puis on centrifuge à 10000 g durant 5 minutes.
- iv. On additionne 100 µl de la solution **B2 (annexe)** (sans éliminer la solution B1) qui contient un alkylant de 4-vinylpyridine à 1.4% (v/v) à la place du DTT. Ensuite on incube sans vortexer à 65°C pendant 15 minutes et on centrifuge à 10000g pendant 2 minutes.
- v. Enfin on récupère **100 µl** du surnageant obtenu et on additionne **100µl** de la solution **C (annexe)** constituée de SDS à 2% (p/v). de glycérol à 40% (v/v), de bleu de bromophénol à 0.02% (p/v) et de 0.08 de tris HCl pH=8. On vortex puis on incube à 65°C pendant 15 minutes avant de centrifuger à 10000g pendant 2 minutes.
- vi. Les gliadines qui ont été récupérées dans la première étape peuvent être séparées par SDS-PAGE dans un gel à T=10.3% et C= 1.3% après évaporation du surnageant durant une nuit à l'intérieur de l'étuve à 65°C puis addition de 200 µl de la solution C aux échantillons, étuvage à 65°C pendant 15 minutes et centrifugation pendant 5 minutes à 10000g.

#### **4. Fixation et coloration :**

Après la sortie du front de migration (coloré en bleu), la migration est arrêtée. Les gels sont démoulés et récupérés dans des bacs en plastique puis recouverts avec une solution de coloration constituée d'un fixateur des protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 60% et d'un colorant, le bleu de Coomassie R250. Les gels doivent être maintenus en agitation pendant 24 heures pour éviter le dépôt du colorant. Après, ils sont décolorés dans de l'eau.

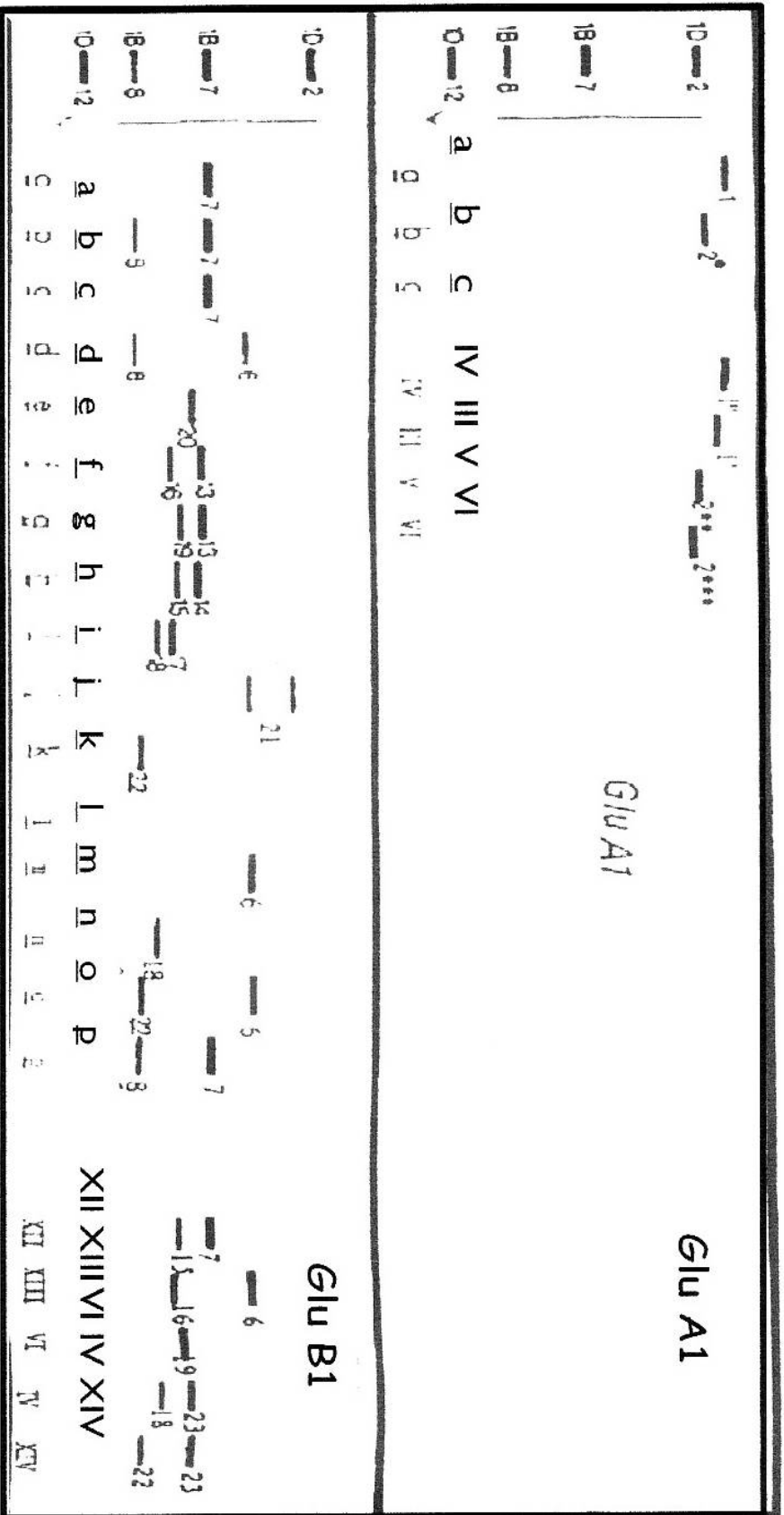


Figure 7 : Schéma des mobilité des sous-unités gluténine HPM  
 Nomenclatur des bandes et des allèles correspondants

(Brandlard *et al.*, 1990)



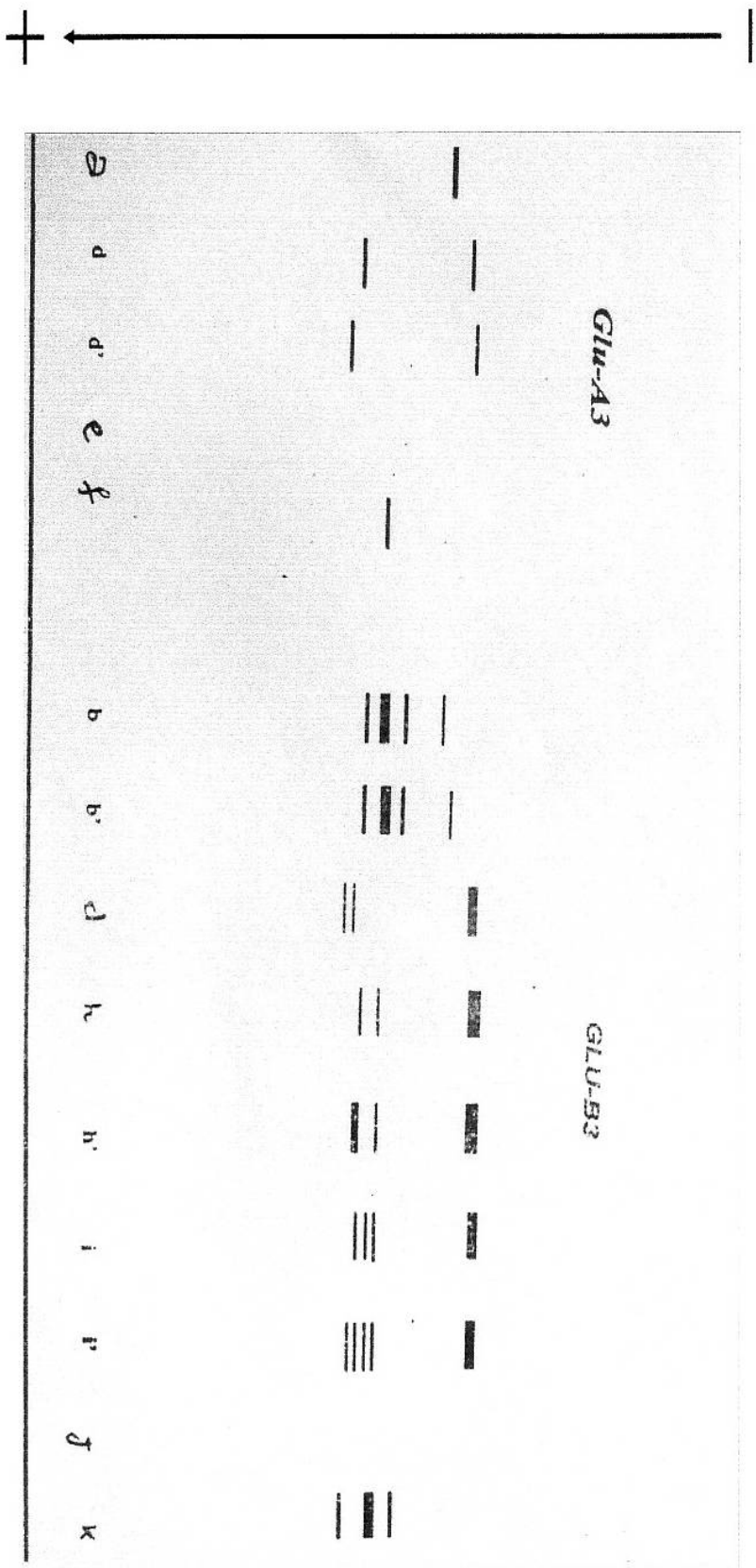


Figure 8: Schéma des mobilité des sous-unités gluténine FPM qui codent pour les loci *Glu-A3* et *Glu-B3* (Amiour *et al.*, 2002)

## 5. Lecture des gels :

La lecture des gels est faite sur la base des nomenclatures établies par Payne et Lawrence (1983) et Vallega et Waines (1987), modifiée par Branlard et *al.*, (1990) adoptées pour les gluténines de haut et de faible poids moléculaire cette nomenclature est représentée dans la figure 7 et 8 (ci-dessus).

Pour les sécalines de haut poids moléculaire et les 7S- $\gamma$ -sécalines la nomenclature adoptée est celle proposée par Amour et *al.*, (2002) (figure 9).

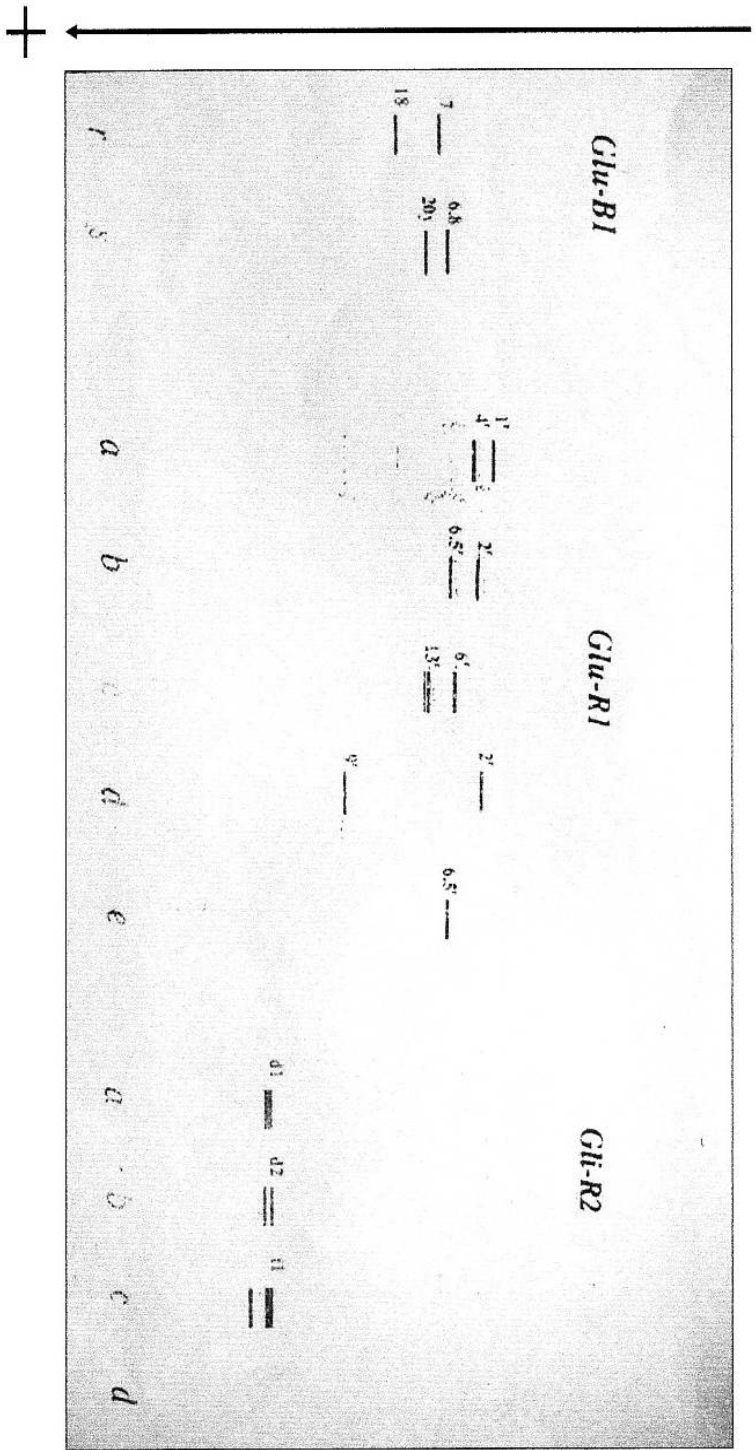


Figure 9 : Schéma des mobilité des sous-unités sésalines HPM et des 75K gamma sésalines

Nomenclatur des bandes et des allèles correspondants

(Amiour *et al.*, 2002a)

## **6. Analyses statistiques :**

Le traitement des données a fait appel à des méthodes statistiques. Toutes ces analyses de fréquences, d'indices de ressemblance et de distances génétiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Excel 2003 et Statistica Version 6.0.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **1. Analyse électrophorétique du polymorphisme des SG-HPM, des sécalines HPM, des 75k gamma-sécalines, et SG-FPM :**

Pour estimer la diversité des sous-unités gluténines-HPM, des sécalines-HPM, des 75k gamma-sécalines et des sous-unités gluténines à faible poids moléculaire nous avons utilisé la technique décrite par Singh *et al.*, (1991). Cette technique nous permet d'obtenir l'ensemble des gluténines et des sécalines, on distingue alors trois groupes de bandes avec des mobilités différentes :

- Lente : correspond aux sous-unités gluténine et aux sous-unités sécalines à haut poids moléculaire HPM,
- Intermédiaire : correspond aux 75k gamma-sécalines,
- Rapide : correspond aux sous-unités gluténines à faible poids moléculaires FPM (zone B et C) décrites par Amiour *et al.*, (2002).

Pour l'ensemble des 88 variétés étudiées nous avons effectué sept gels d'électrophorèse. Pour la lecture de ces gels nous avons procédé par zone : rapide, intermédiaire puis lente.

Les nomenclatures de Payne et Lawrence (1983) et Vallega et Waines (1987) sont utilisées pour la lecture des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire. Pour les loci Glu-R1, Gli-R2 et les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire, la nomenclature proposée par Amiour *et al.*, 2002 a été utilisée.

## **2. Diversité allélique des sous-unités gluténines et des sécalines**

La majorité des cultivars de triticales analysés sont homogènes. Une large variabilité est observée pour les sous-unités HPM et les sous-unités sécalines HPM. Un total de 20 sous-unités gluténines HPM et trois de 75K gamma-sécalines sont révélés à partir de l'analyse des différents triticales. La majorité de 88 cultivars possède quatre à cinq bandes et 49 types de diagrammes sont déterminés (tab.7). Chaque diagramme est représenté par un à huit cultivars. Concernant les sous-unités FPM une large variabilité des échantillons est détectée et 30 diagrammes sont établis (tab.8). Le nombre des cultivars pour chaque diagramme des sous-unités B-FPM varie de 1 à 13.

Les diagrammes des sous-unités gluténines et sécalines HPM et des 75K gamma-sécalines des triticales sont composés de 2 à 8 bandes. Une bande (sous-unité) ou aucune est codée par le chromosome 1A, une ou deux par le chromosome 1B, une, deux ou aucune par le chromosome 1R et deux, trois ou aucune par le chromosome 2R.

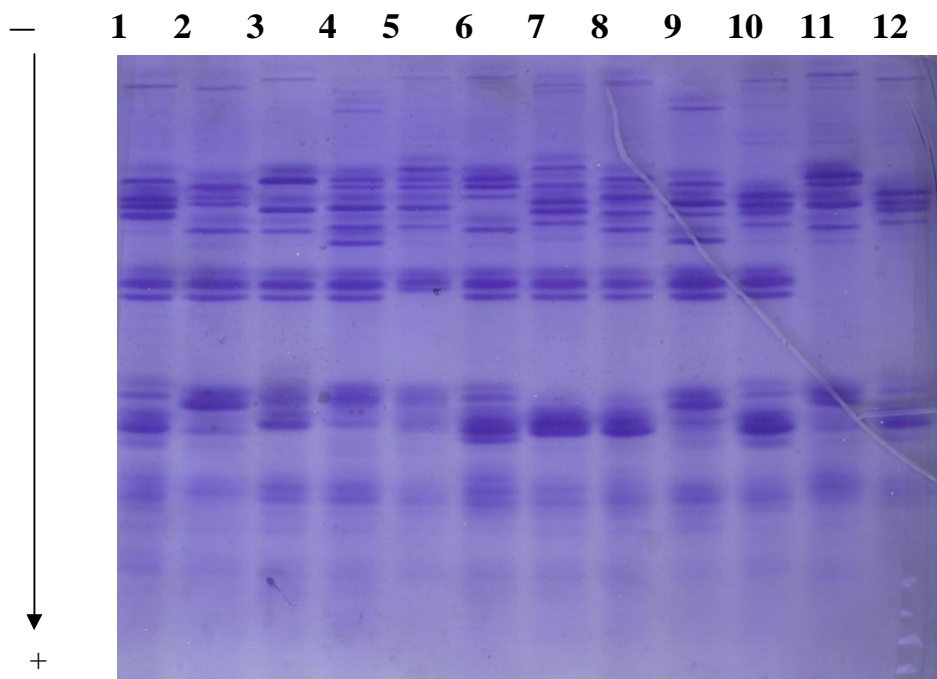
**Tableau 7 : Composition allélique des sous-unités gluténines et sécalsines HPM et 75y-sécalsines des triticales Hexaploïdes**

Cultivar	Loci			
	Glu A1	Glu B1	Glu R1	Gli R2
1) Tridoc	1	22	2r-6.5r	nul
2) Lupus	1	7-18	2r-6.5r	t1
3) Partout	1	7-8	1r-4r	d1
4) Auriac, SW Morado	1	7-8	6r-13r	t1
5) Espoir	1	6.8-20y	6r-13r	t1
6) Grandual	1	6-8	2r-9r	d1
7) Olympus	1	6-8	2r-6.5r	t1
8) Newton	1	13-16	6r-13r	t1
9) Fleurus	1	7	1r-4r	t1
10) Lamberto	2*	22	6r-13r	t1
11) Rhino, California	2*	7-8	2r-9r	t1
12) Bellac	2*	7-8	2r-6.5r	t1
13) Kortego, Cedro, Passo, SW Midelo, Triplus	2*	7a	6r-13r	t1
14) Bienvenu, Bilbao, Blenio, SW Talontro	2*	7-18	6r-13r	t1
15) Triad, Wilfried, SW Flamoro, Grenado, Agrillac, Protigniac, Triveder, Trimaran	2*	7-8	6r-13r	t1
16) Trouvere	2*	6-8	6r-13r	d1
17) Stimulus	2*	6-8	2r-9r	t1
18) Tremplin, Floriac, Alimac	2*	7-8	6r-13r	d1
19) Triologie, Triptic	2*	7	6r-13r	d1
20) Balzac	2*	6-8	2r-6.5r	t1
21) Trivial	2*	7	6r-13r	nul
22) Puerto, Triskell	2*	7-8	1r-4r	t1
23) Trimour, Carnac	2*	6.8-20y	6r-13r	d1
24) Ticalo, Benetto, Rotego, Trinidad	2*	6.8-20y	6r-13r	t1
25) Aprim, Trigniac, Orbital, Torpedo	2*	6-8	6r-13r	t1
26) Beneficio, Lasko	2*	6.8-20y	1r-4r	t1
27) Delgado	2*	7-8-9	2r-6.5r	t1
28) Trigone, Clercal	2*	7-8	6.5r	t1
29) Constant	2*	13-16	6r-13r	t1
30) Aubrac	2*	7-18	6r-13r	d1
31) Raboliot, Triticor	nul	7-18	6r-13r	nul
32) Kansas	nul	7-9	2r-6.5r	t1
33) Magnat, Collegial, Gwendal, Seconzac, Innoval, Calao, Capital	nul	7-8	6r-13r	t1
34) Osorno	nul	7	2r-6.5r	t1
35) Beauval, Colssal	nul	7	6r-13r	t1
36) Bedretto	nul	7-8-9	2r-9r	t1
37) Matinal	nul	6-8	6r-13r	d2
38) Precocius	nul	7-8	6r-13r	d1
39) Tanguy	nul	6-8	6r-13r	t1
40) Automnal	nul	7-8	2r-6.5r	t1
41) Diwann	nul	6-8	2r-9r	t1
42) Maximal	nul	7	6.5r	t1
43) Pivot	nul	7-8	6.5r	t1
44) Vivero, Amarillo, Ragtag	nul	7	1r-4r	t1
45) Tritikon	nul	22	6.5r	t1
46) Dagro	nul	7-18	6r-13r	t1
47) Domital	nul	6-8	1r-4r	t1
48) Spacial	nul	7-18-	2r-6.5r	t1
49) Magistral	nul	7-8	1r-4r	d1

**Tableau 8 :Composition allélique des sous-unités gluténines FPM des triticales hexaploïdes**

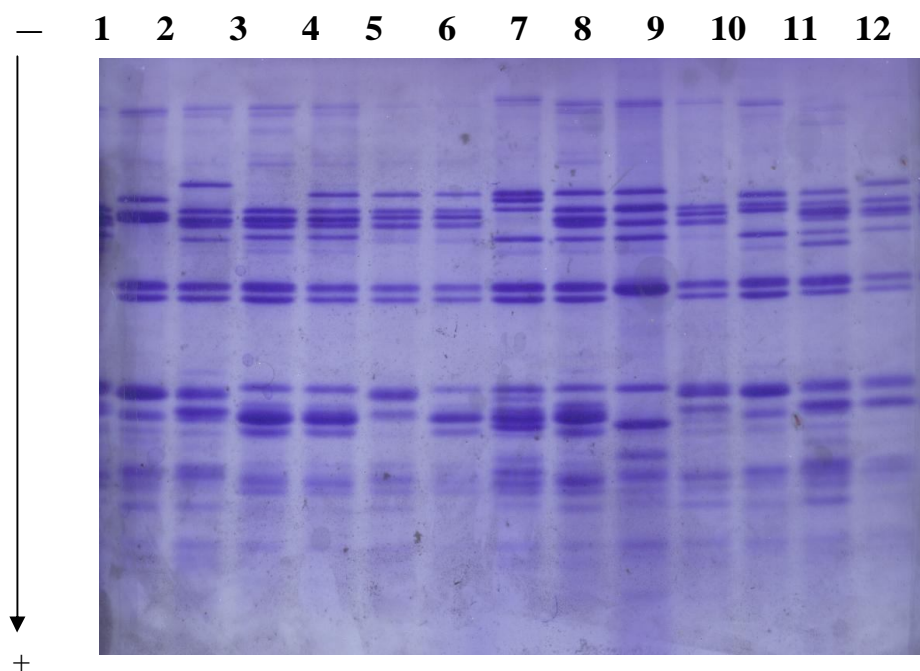
Variétés	Loci	
	Glu A3	Glu B3
1) Lamberto, Lupus, California, Rotego	e	K
2) Matinal	e	i
3) Puerto, alimac, Vivero	e	b
4) Benetto, cornac	e	b'
5) Ragtac	e	d
6) Kansas, Rhino, Bellac, Auriac, Blenio, Balzac, Triplus , Collegial, Floriac	a	h'
7) Partout, Osorno, Bedretto, SW Flamoro, SW Morado, Grandual, Delgado	a	i
8) Cedro, Triologie, SW Midelo, SW Talontro, Triptic, Trivial, Diwann, Maximal, Pivot, gwendal, Spacial, Orbital, automnal	a	d
9) Bilbao, Precocius, Tanguy, Colossal,	a	h
10) Stimulus, Grenado	a	b
11) Ticalo, Olympus	a	i'
12) Triveder	a	k
13) Aubrac, Calao, Clercal	a	b'
14) Raboliot, kortego, Magnat, Bienvenu, Passo, Triskell, Beneficio, Dagro	d	k
	d	h
15) Tridoc, Triticor, Fleurus		
16) Triade, Aprim, Protignac	d	b
17) Trouvere,	d	f
18) Beauval, Agrilac, Espoir, Trigone, Trinidad	d	d
19) Trimour	d	h'
20) Trignac	d	i'
21) Domital	d	b'
22) Capital, Newton	d	i
23) Torpedo	d	j
24) Wilfried	d'	j
25) Ragtac	d'	k
26) Seconza	d'	h'
27) Tritikon, Constant, Magistral	d'	d
28) Tremplin	f	j
29) Innoval, Trimaran	f	d
30) Lasko	f	i





**Figure 10 : Electrophoregrammes de quelques variétés de triticale**

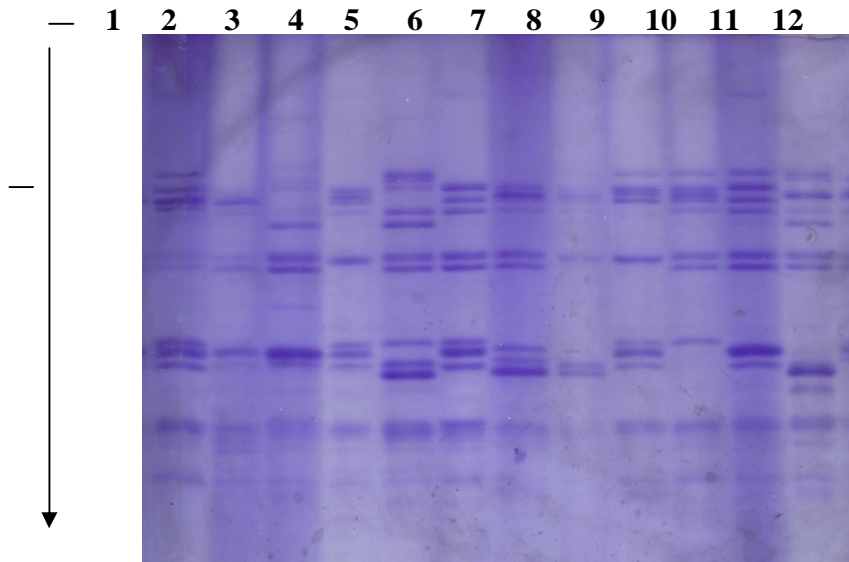
1. Magnat, 2. Raboliot, 3. Dagro, 4. Tridoc, 5. Kansas, 6.Lamberto,  
7. Domital, 8. Lupus, 9. Partout, 10. Rhino, 11. Spacial, 12. Bellac



**Figure 11 : Electrophoregrammes de quelques variétés de triticale**

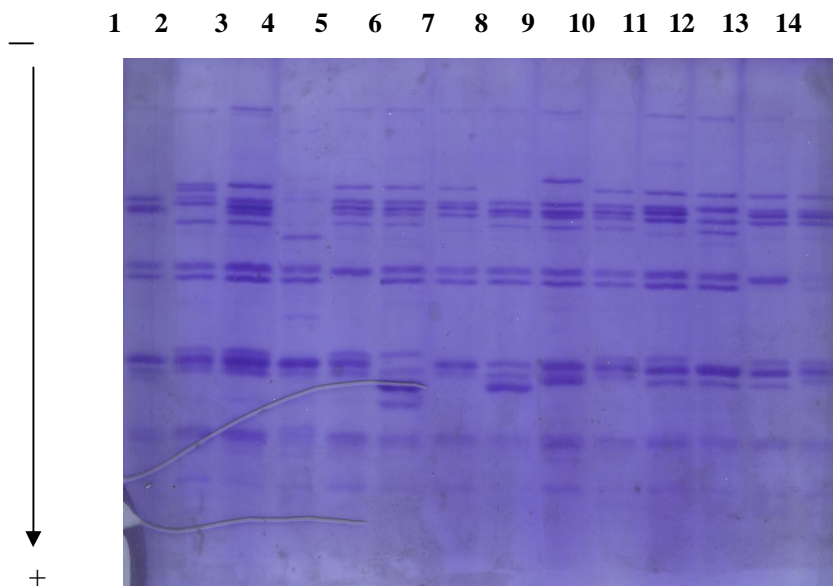
1.Osorno, 2.Auriac, 3.Dagro, 4.Bienvenu, 5.Cedro, 6.Passo,7.Domital,  
8.Triade, 9.Trouvere, 10.Beauval, 11.Spacial, 12.Dedretto, 13.Bilbao

L'analyse des gluténines nous a montré qu'il y a une très grande diversité des 4 loci : Glu A1 porté sur le bras long du chromosome 1A, Glu-B1 porté sur le bras long du chromosome 1B, Glu-R1 porté sur le bras long du chromosome 1R et Gli-R2 porté le chromosome 2R.



**Figure 12: Electrophoregrammes de quelques variétés de triticale**

1. Automnal, 2. Blenio, 3. Olympus, 4. Matinal, 5. Precocius, 6. Stimulus, 7. Calao, 8. Tanguy, 9. Tremplin, 10. Triologie, 11. Orbital, 12. Wilfried

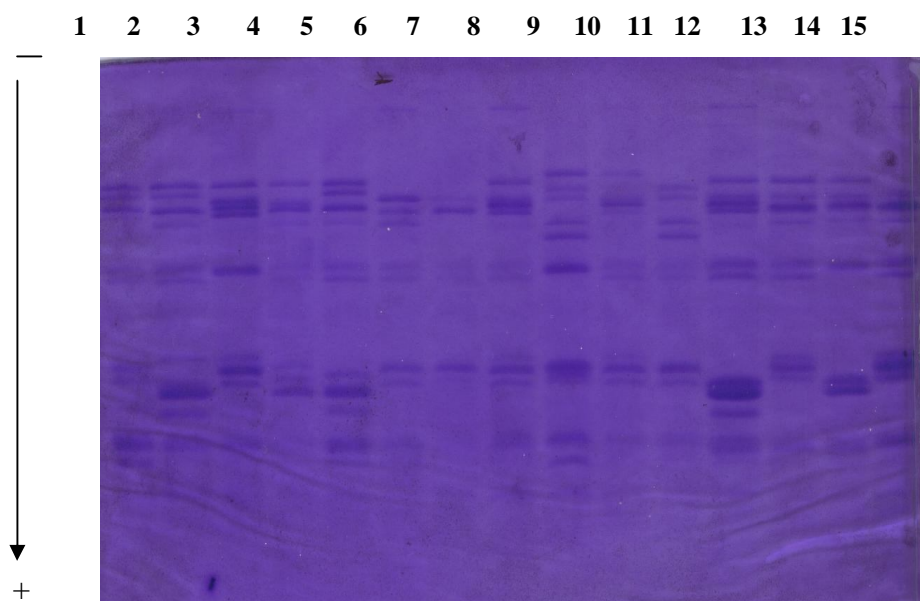


**Figure 13 : Electrophoregrammes de quelques variétés de triticale**

1. Colossal, 2. Bellac, 3. S.W Flamoro, 4. Olympus, 5. Floriac, 6. Grenado, 7. S.W Midelo, 8. Calao, 9. S.W. Morado, 10. S.W Talontro, 11. Triplus, 12. Orbital, 13. Triptic, 14. Trivial

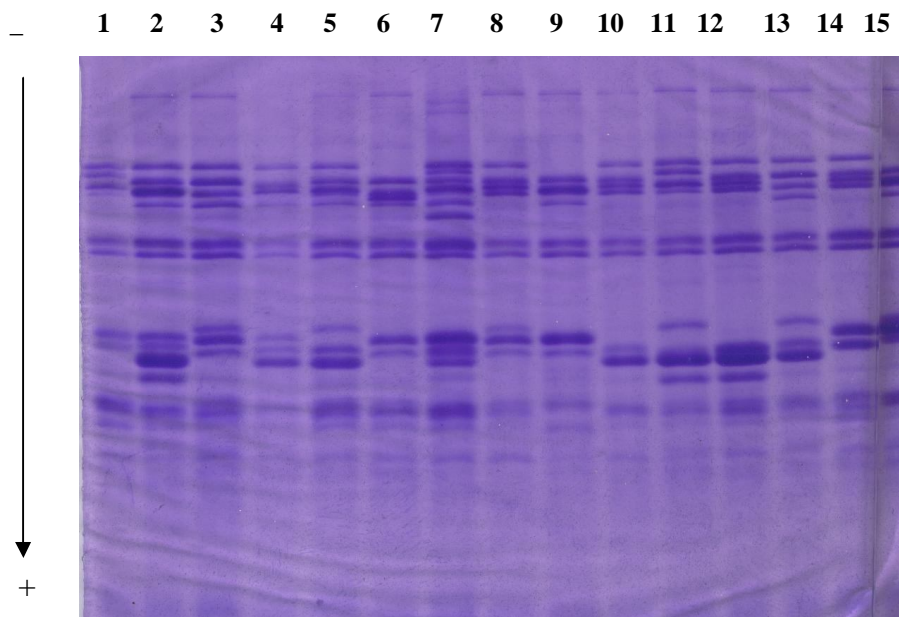
Les figures 10, 11, 12, 13, 14 et 15 présentent quelques électrophoregrammes de certaines variétés de triticales étudiées.

Sur le locus Glu-A1, il y a moins de variation allélique par rapport aux autres loci, car seulement trois allèles ont été observés, l'allèle (a) qui correspond à la sous-unité (1), l'allèle (b) correspondant à la sous-unité (2\*) et l'allèle (c) pour la forme (nul). Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Payne et Lawrence (1983).



**Figure 14 : Electrophoregrammes de quelques variétés de triticales**

1.Capital, 2.Alimac, 3.Agrilac, 4.Rotego, 5.Diwann, 6.Espoir, 7.Grandual, 8.Trinidad, 9.Maximal, 10.Pivot, 11.Puerto, 12.Claircal, 13.Trimour, 14.Triskell, 15.Lasko



**Figure 15: électrophoregrammes de quelques variétés de triticale**

1.Capital, 2.Triveder, 3.Ticalo, 4.Rotego, 5.Aprim, 6.Beneficio, 7.Benetto, 8.Trinidad, 9.Collegial, 10.Delgado, 11.Gwendal, 12.Clercal, 13.Portignac, 14.Trignac, 15.Lasko

Pour le Glu-B1, huit formes alléliques différentes ont été observées, six allèles a(7), b(7-8), d(6-8), f(13-16), k(22) et p (7-8-9) décrit précédemment par Payne et Lawrence (1983), et deux allèles r (7-18) et s (6.8-20y) identifiés par Amiour *et al.*, (2002b).

Concernant les 75 K gamma-sécalines du locus Gli-R2, les quatre formes alléliques décrites par Amiour *et al.*, (2002a) ont été observées : l'allèle a (2 sous-unités dites d1), l'allèle b (2 sous-unités dites d2), l'allèle c (sous-unités dites t1) et l'allèle d (nul).

Pour les sous-unités gluténines à faible poids moléculaire, notre étude s'est limitée aux gluténines codées au niveau du Glu-A3 et Glu B3. Cinq formes alléliques sont observées sur le locus Glu-A3, a, d, d', e, et f. Dix autres sont localisées au niveau du locus Glu-B3 : b, b, d, f, h, i, i, j et k (Jackson *et al.*, 1996) et Glu-B3k identifié par Amiour *et al.*, (2002).

Quelques sous-unités additionnelles, faibles taches, sont observées dans la zone B-FPM. De plus ces bandes sont différentes à celles du Glu-A3 et du Glu-B3 codant les sous-unités gluténines FPM. Par conséquent elles sont supposées d'être du type sécalines-FPM.

Les fréquences des diagrammes des sous-unités gluténines HPM et des 75 K gamma-sécalines sont données au niveau du (tableau 9).

**Tableau 9 : Fréquences des diagrammes électrophorétiques des sous-unités gluténines et sécalines de haut poids moléculaire et des 75 y-sécalines de 88 variétés de triticales hexaploïdes**

<b>Glu A1</b>	<b>Glu B1</b>	<b>Glu R1</b>	<b>Gli R2</b>	<b>nombre</b>	<b>Fréquence</b>
1	22	2r-6.5r	Nul	1	1.13
1	7-18	2r-6.5r	t1	1	1.13
1	7-8	1r-4r	d1	1	1.13
1	7-8	6r-13r	t1	2	2.27
1	6.8-20y	6r-13r	t1	1	1.13
1	6-8	2r-9r	d1	1	1.13
1	6-8	2r-6.5r	t1	1	1.13
1	13-16	6r-13r	t1	1	1.13
1	7	1r-4r	t1	1	1.13
2*	22	6r-13r	t1	1	1.13
2*	7-8	2r-9r	t1	2	2.27
2*	7-8	2r-6.5r	t1	1	1.13
2*	7a	6r-13r	t1	5	5.68
2*	7-18	6r-13r	t1	4	4.55
2*	7-8	6r-13r	t1	8	9.09
2*	6-8	6r-13r	d1	1	1.13
2*	6-8	2r-9r	t1	1	1.13
2*	7-8	6r-13r	d1	3	3.40
2*	7	6r-13r	d1	2	2.27
2*	6-8	2r-6.5r	t1	1	1.13
2*	7	6r-13r	nul	1	1.13
2*	7-8	1r-4r	t1	2	2.27
2*	6.8-20y	6r-13r	d1	2	2.27
2*	6.8-20y	6r-13r	t1	4	4.55
2*	6-8	6r-13r	t1	4	4.55
2*	6.8-20y	1r-4r	t1	2	2.27
2*	7-8-9	2r-6.5r	t1	1	1.13
2*	7-8	6.5r	t1	2	2.27
2*	13-16	6r-13r	t1	1	1.13
2*	7-18	6r-13r	d1	1	1.13
nul	7-18	6r-13r	nul	2	2.27
nul	7-9	2r-6.5r	t1	1	1.13
nul	7-8	6r-13r	t1	7	7.99
nul	7	2r-6.5r	t1	1	1.13
nul	7	6r-13r	t1	2	2.27
nul	7-8-9	2r-9r	t1	1	1.13
nul	6-8	6r-13r	d2	1	1.13
nul	7-8	6r-13r	d1	1	1.13
nul	6-8	6r-13r	t1	1	1.13
nul	7-8	2r-6.5r	t1	1	1.13
nul	6-8	2r-9r	t1	1	1.13
nul	7	6.5r	t1	1	1.13
nul	7-8	6.5r	t1	1	1.13
nul	7	1r-4r	t1	3	3.40
nul	22	6.5r	t1	1	1.13
nul	7-18	6r-13r	t1	1	1.13
nul	6-8	1r-4r	t1	1	1.13
nul	7-18	2r-6.5r	t1	1	1.13
nul	7-8	1r-4r	d1	1	1.13

Les fréquences des diagrammes des sous-unités gluténines-FPM sont données au niveau du (tableau 10).

**Tableau 10 : Fréquences des diagrammes électrophorétiques des sous-unités gluténines de faible poids moléculaire des 88 variétés de triticales hexaploïdes**

Glu A3	Glu B3	Nombre	Fréquence
e	K	4	4.54
e	i	1	1.13
e	b	3	3.40
e	b'	2	2.27
e	d	1	1.13
a	h'	9	10.22
a	i	7	7.95
a	d	13	14.77
a	h	4	4.54
a	b	2	2.27
a	i'	2	2.27
a	k	1	1.13
a	b'	3	3.40
d	k	8	9.09
d	h	3	3.40
d	b	3	3.40
d	f	1	1.13
d	d	5	5.68
d	h'	1	1.13
d	i'	1	1.13
d	b'	1	1.13
d	i	2	2.27
d	j	1	1.13
d'	j	1	1.13
d'	k	1	1.13
d'	h'	1	1.13
d'	d	3	3.40
f	j	1	1.13
f	d	2	2.27
f	i	1	1.13

Sur la base de la diversité génétique observée au niveau des 7 loci étudiés, 84 types de diagrammes ont été établis pour les 88 variétés de triticales (tableau 11).

**Tableau 11: Composition allélique des sept loci Glu-A1, Glu B1, Glu R1, Gli R2, Glu A3 Glu B3 et GluB2 (diagrammes types)**

Nom des variétés	Composition allélique	Nom des variétés	Composition allélique	Nom des variétés	Composition allélique
1) Fleurus	a,a,a,c,d,h,b	29) Rhino	b,b,d,c,a,h',b	57) Amarillo	c,a,a,c,d',k,b
2) Partout	a,b,a,a,a,i, b	30) Trigone	b,b,e,c,d,d,b	58) Ragtag	c,a,a,c,e,d,b
3) Auriac	A,b,c,c,a,h',b	31) Cedro	b,b,e,c,a,b',b	59) Osorno	c,a,b,c,e,b',b
4) S.W Morado	A,b,c,c,a,i,b	32) Trmaran	b,b,c,c,f,d,b	60) Beauval	c,a,c,c,d,d,b
5) Grandual	a,d,d,a,a,i,b	33) Orbital	b,d,c,c,a,d,b	61) Colossal	c,a,c,c,a,h,b
6) Olympus	A,d,d,c,a,i',b	34) Torpedo	b,d,c,c,d,j,b	62) Maximal	c,a,e,c,a,d,b
7) Newton	A,f,c,c,d,I,b	35) Trouvere	b,d,c,a,d,f,b	63) Magnat	c,b,c,c,a,d,b
8) Tridoc	A,k,b,d,d,h,b	36) Stimulus	b,d,d,c,a,b,b	64) Collegial	c,b,c,c,a,h',b
9) Lupus	a,r,b,c,e,k,b	37) Balzac	b,d,b,c,a,h',b	65) Precocius	c,,b,c,a,a,h,b
10) Espoir	a,s,c,c,d,d,b	38) Aprim	b,d,c,c,d,b,b	66) Automnal,	c,b,b,c,a,d b
11) Kortego, Passo	B,a,c,c,d,k,b	39) Trignac	b,d,c,c,d,i,b	67) Seconzac	c,b,c,c,d',h',b
12) Cedro, S.W Midelo	b,a,c,c,a,d,b	40) Constant	b,f,c,c,d',d,b	68) Innoval	c,b,c,c,f,d,b
13) Triologie, Triptic	b,a,c,a,a,d,b	41) Lamberto	b,k,c,c,e,k,b	69) Calao	c,b,c,c,a,b',b
14) Triplus	B,a,c,c,a,h',b	42) Delgado	b,p,b,c,a,i,b	70) Capital	c,b,c,c,d,i,b
15) Trivial	B,a,c,b,a,d,b	43) Bienvenu	b,r,c,c,d,k,b	71) Magistral	c,b,a,a,d',d,b
16) Puerto	B,b,a,c,e,b,b	44) Bilbao	b,r,c,c,a,h,b	72) Pivot	c,b,e,c,a,d,b
17) Triskell	B,b,a,c,d,k,b	45) Blenio	b,r,c,c,a,h',b	73) Gwendal	c,b,c,c,a,d,b
18) Bellac	B,b,a,c,a,h',b	46) S.W Talontro	b,r,c,c,a,d,b	74) Kansas	c,d,b,c,a,h',b
19) Triade, Protignac	B,b,c,c,a,d,b	47) Aubrac	b,r,c,a,a,b',b	75) Matinal	c,d,c,b,e,i,b
20) Tremplin	B,b,c,a,f,j,b	48) Trimour	b,s,c,a,d,h',b	76) Tanguy	c,d,c,c,a,h,b
21) Wilfried	B,b,c,c,d',j,b	49) Ticalo	b,s,c,c,a,i,b	77) Diwann	c,d,d,c,a,d,b
22) S.W Flamoro	b,b,c,c,a,i,b	50) Beneficio	b,s,ac,a,i',b	78) Domital	c,d,a,c,d,b',b
23) Floriac	B,b,c,a,a,h',b	51) Benetto	b,s,c,c,e,b',b	79) Spacial	c,d,b,c,a,d,b
24) Grenado	B,b,c,c,a,b,b	52) Cornac	b,s,c,a,e,b',b	80) Tritikon	c,k,e,c,d',d,b
25) Alimac	B,b,c,a,e,b,b	53) Rotego	b,s,c,c,e,k,b	81) Bedretto	c,p,d,c,a,i,b
26) Agrilac	B,b,c,c,d,d,b	54) Trinidad	b,s,c,c,d,d,b	82) Raboliot	c,r,c,d,d,k,b
27) Triveder	B,b,c,c,a,k,b	55) Lasko	b,s,a,c,f,ib	83) Triticor	c,r,c,d,d,h,b
28) California	B,b,d,c,e,k,b	56) Vivero	c,a,a,c,e,b,b	84) Dagro	c,r,c,c,d,k,b

Un total de 49 diagrammes sont observé pour les locus Glu-A1, Glu-B1, Glu R1 et Gli R2, dont le plus fréquent est (2\* 7-8 6<sup>r</sup>-13<sup>r</sup> t1) rencontré chez huit variétés, suivit par (nul 7-8 6<sup>r</sup>-13<sup>r</sup> t1) présent chez sept variétés.

Pour les gluténines à faible poids moléculaire, nous avons répertoriés 30 diagrammes différents, la fréquence la plus élevée est celle du (Glu-A3 a Glu-B3 d) présent chez 13 variétés, suivit du (Glu-A3 a GluB3 h') présent chez 9 variétés.



### 3. Calcul des fréquences alléliques

Les fréquences ont été calculées pour les différentes formes alléliques portées par les 7 loci cités précédemment. Ces fréquences et leurs allèles codant pour les sous-unités gluténines-HPM, sécalines-HPM et les 75K gamma-sécalines sont répertoriés sur le tableau 12 et ceux codant pour les sous-unités gluténines-FPM sont répertoriés sur le tableau 13.

**Tableau 12 : Fréquences alléliques au niveau des 4 loci GluA1, Glu B1, Glu R1, et Gli R2 trouvés chez les 88 variétés de triticales hexaploïdes étudiées**

Locus	Allèles	Bande protéique	Nombre	Fréquences
<b>Glu A1</b>	A	1	10	11.36
	b	2*	49	55.68
	c	nul	29	32.95
<b>Glu B1</b>	a	7	16	18.18
	b	7-8	33	37.5
	d	6-8	13	14.77
	f	13-16	2	2.27
	k	22	3	3.40
	p	7-8-9	2	2.27
	r	7-18	10	11.36
	s	6.8-20y	9	10.22
<b>Glu R1</b>	a	1r-4r	11	12.5
	b	2r-6.5r	8	9.09
	c	6r-13r	57	64.77
	d	2r-9r	7	7.95
	e	6.5r	5	5.68
<b>Gli R2</b>	a	d1	15	17.04
	b	d2	1	1.13
	c	t1	68	77.27
	d	nul	4	4.54

**Tableau 13 : Fréquences alléliques des sous-unités gluténines à faible poids moléculaire chez les 88 variétés de triticales hexaploïdes**

<b>Locus</b>	<b>Allèles</b>	<b>Nombre</b>	<b>Fréquences</b>
<b>Glu A3</b>	A	41	46.59
	d	26	29.54
	d'	6	6.81
	e	11	12.5
	f	4	4.54
<b>Glu B3</b>	b	8	9.09
	b'	6	6.81
	d	25	28.81
	f	1	1.13
	h	7	7.95
	h'	11	12.5
	i	11	12.5
	i'	3	3.40
	j	3	3.40
	k	13	14.77

Les résultats obtenus montrent que les protéines de réserve du triticales représentent un grand polymorphisme sur le chromosome 1B avec 8 formes sur le locus Glu-B1 et 10 sur le Glu-B3. L'allèle le plus fréquent au niveau du Glu-B1 c'est l'allèle (b) codé par la sous-unité 7-8 avec 37.5% suivit par l'allèle a (7) avec 18.1%.

Pour le locus Glu-B3 l'allèle le plus dominant est l'allèle (d) avec 28.8% suivit par l'allèle (k) identifié par Aimour (2002) avec 14.7%, puis viennent les deux allèles h' et i avec une fréquence de 12.5 pour chacun.

La variabilité est aussi importante au niveau du Gli-R1 avec cinq formes alléliques. L'allèle le plus dominant pour le Glu-R1 c'est l'allèle c (64.7%) puis vient l'allèle a (12.5%). Les autres allèles sont presque fréquents équitablement sur le chromosome, mais avec de faibles fréquences.

Enfin, le Glu-A1 reste un locus à forme polymorphe avec trois allèles, le b (2\*) est le plus fréquent avec 55.6%.

L'analyse de la zone B-FPM est basée sur la nomenclature de Gupta et Shephred (1990) et Jackson et *al.*, (1996) qui ont identifiés plusieurs groupes alléliques des gluténines B-FPM des blés

hexaploïdes. Cependant, la correspondance doit être faite entre la sous-unité Glu-B3d suivant Gupta et *al.*, (1990) et la sous-unité Glu-B3a suivant 2-4-15-19 identifiées par Nieto Taladriz et *al.*, (1997) dans le blé dur.

Des études portées sur quelques triticales portugais ont révélé que les B-FPM des gluténines peuvent être du type *T.durum* (Igrejas et *al.*, 1999).

#### **4. Comparaison des fréquences alléliques des triticales étudiés avec ceux cultivés en Europe :**

Malgré leurs origines complexes, les cultivars de triticales ont été développés à partir de blés tendres ou durs croisés avec le seigle. Pour une meilleure compréhension des origines des triticales, les fréquences des formes alléliques au niveau des 7 loci Glu-A1, Glu-B1, Glu-R1, Gli-R2, Glu-A1, Glu-B3 et Glu-B2 ont été comparées pour la collection des triticales hexaploïde étudié et une collection de triticales hexaploïdes cultivé en Europe étudiée par Amiour et *al.*, 2002.

La comparaison des fréquences alléliques est donnée sur le tableau 14. Pour le locus Glu-A1, la distribution allélique au niveau des 88 cultivars étudiés est prédominée par l'allèle (b) avec 55.6% qui est absent chez les cultivars portugais et mexicains. Cependant les cultivars suédois sont distingués par l'absence du Glu-A1a codé par la sous-unité (1).

**Tableau 14 : Comparaison des fréquences alléliques**

Locus	Nombre et origine des cultivars										
	Tot 88	FR 30	POL 24	GE 15	CH 15	SW 07	IT 08	PT 05	UK 03	SP 21	MX 04
<b>Glu-A1</b>											
a (1)	11.3	10.0	20.8	06.7	30.3	-	25.0	40.0	66.7	47.6	75.0
b(2*)	55.6	43.3	58.3	60.0	30.3	71.4	25.0	-	33.3	09.5	-
c(nul)	32.9	46.7	20.8	33.3	40.0	28.6	50.0	60.0	-	42.9	25.0
<b>Glu-B1</b>											
a(7)	18.1	10.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b(7-8)	37.5	40.0	16.7	06.7	10.0	-	-	-	33.3	04.8	-
c(7-9)	-	-	04.2	-	-	-	-	-	-	04.8	-
d(6-8)	14.7	23.3	20.8	33.3	20.0	14.3	12.5	20.0	33.3	-	-
e(20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04.8	-
f(13-16)	2.2	06.7	-	20.0	10.0	-	25.0	-	33.3	19.1	50.0
i(7-18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
k(22)	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV(23-18)	-	-	-	-	-	12.5	-	-	14.3	-	-
P(7-8-9)	2.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
r(7-18)	11.3	13.3	50.0	06.7	30.0	42.8	37.5	-	-	19.1	25.0
s(6.8-20y)	-	06.7	08.3	33.3	30.0	42.8	12.5	80.0	-	33.3	25.0
t(16)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Glu-R1</b>											
a(1r-4r)	12.5	20.0	12.5	06.7	10.0	28.6	-	-	-	-	-
b(2r-6.5r)	9.0	06.7	16.7	33.3	-	-	12.5	20.0	-	-	-
c(6r-13r)	64.7	60.0	66.7	40.0	80.0	71.4	75.0	80.0	66.7	76.2	50.0
d(1r-9r)	7.9	10.0	04.2	20.0	-	-	-	-	33.3	-	-
e(6.5r)	5.6	03.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
f(0.8r-6r)	-	-	-	-	10.0	-	12.5	-	-	19.1	50.0
g(5.8r)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	04.8	-
h(6r)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i(13r)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
j(nul)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gli-R2</b>											
a (d1)	17.0	16.7	-	-	60.0	14.3	50.0	100.0	-	52.4	25.0
b (d2)	1.1	03.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c (t1)	77.2	80.0	95.8	93.3	40.0	85.7	-	-	100.0	04.8	-
d (nul)	4.5	-	-	06.7	-	-	50.0	-	-	42.9	75.0
e (t2)	-	-	04.2	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>GLUA3</b>											
a	46.5	46.7	12.5	33.3	40.0	14.3	25.0	60.0	33.3	42.8	25.0
d	29.5	40.0	62.5	40	50.0	42.8	50	40.0	33.3	42.8	25.0
d'	6.8	03.3	-	-	10.0	-	25.0	-	-	14.4	-
e	12.5	03.3	20.8	26.7	-	28.6	-	-	-	-	50.0
f	4.5	06.7	04.2	-	-	14.3	-	-	33.3	-	-
<b>GLU B<sup>2</sup></b>											
b	9.0	03.3	04.2	-	-	-	25.0	20.0	-	-	25.0
b'	6.8	26.7	16.7	20	-	14.3	12.5	20.0	-	28.6	-
d	28.8	43.3	08.3	33.3	80.0	-	25.0	60.0	-	47.6	75.0
f	1.1	-	-	-	-	-	-	-	33.3	-	-
h	7.9	03.3	04.2	-	-	-	25.0	-	33.3	14.3	-
h'	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-	04.8	-
i	12.5	16.7	37.5	46.7	-	28.6	-	-	-	04.8	-
i'	3.4	-	-	-	-	-	-	-	33.3	-	-
j	3.4	03.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
k	14.7	03.3	29.1	-	20.0	57.1	12.5	-	-	-	-
<b>Glu B2</b>											
a	-	-	-	-	10.0	-	-	-	-	-	-
B	100	100	100	100	90.0	100	100	100.0	100	100	100

Pour le locus Glu-B1, l'allèle le plus fréquent dans notre collection est le b (7-8) avec 37.5%, nos résultats sont proches des résultats des cultivars français (40%) et Britanniques (33.3%). L'allèle prédominant des cultivars mexicains c'est le f (13-16) avec 50%, cet allèle est le moins exprimé dans notre collection avec 2.2%. Le Glu-B1p (7-8-9) présent avec 2.2% dans notre collection est absent dans tous les cultivars de l'Europe.

L'allèle a (7) est observé seulement au niveau de nos cultivars et ceux français avec des fréquences respectives de 18.1% et 10%.

Les allèles r (7-18) et s (6.8-20y) sont présents presque dans tous les cultivars d'Europe sauf les cultivars Britanniques, ils sont présents dans nos cultivars avec des fréquences presque égales de 11.3% et 10.2%.

Pour le locus Glu-R1, la sous-unité 6<sup>r</sup>-13<sup>r</sup> codée par le Glu-R1c est prédominante avec 64.7%, nos résultats concordent avec ceux des cultivars français. Les plus faibles fréquences alléliques sont Glu-R1g (5.8%) observées uniquement dans cultivars de triticales espagnoles (4.8%) et Glu-R1e (6.5) observées seulement dans les lignées françaises (3.3%) et notre collection avec 5.6%.

Pour le locus Gli-R2, nous observons deux allèles avec de faibles fréquences Gli-R2 e enregistré seulement dans les cultivars polonais (4.2%) et Gli-R2b (3.3%) dans ceux français ; dans nos résultats cet allèle est moins fréquent que la France avec 1.1%.

L'allèle le plus fréquent observé dans notre collection est l'allèle Gli-R2c (t1) avec 77.2%. Gli-R2 a (d1) est observé dans la totalité des cultivars portugais et le Gli-R2c (t1) est caractéristique pour ceux britanniques. Concernant le locus Glu-A3, 76% de la collection analysée peut être caractérisée par seulement deux allèles : Glu-A3a observé dans 46.5% et Glu-A3d avec 29.5%. Les autres allèles (d), (e) et (f) sont peu communs.

Le locus Glu-B2 représente un faible polymorphisme avec deux allèles différents : le Glu-B2a codé par la sous-unité 12, très fréquent dans le blé dur, et l'allèle Glu-B2b qui est absent.

## 5. Indice de similarité des diagrammes variétaux

L'indice de similarité (ou indice de ressemblance) des diagrammes a été calculé selon la méthode de Dedio et *al.*, (1969), en rapportant l'indice de similarité absolu (**IAS**) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un, au moins, des diagrammes des variétés comparées. **L'IAS** présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes entre les deux diagrammes.

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

On considère qu'une bande n'est pas significativement différente d'une autre lorsqu'elles sont de même mobilité et/ou qu'elles ne se distinguent pas par au moins deux classes de concentration.

### 5.1. Calcul des indices de similarité des triticales :

Les indices de similarité ont été calculés entre les 84 diagrammes de triticales hexaploïdes.

On remarque que les valeurs des indices de similarité varient entre 0% et 75%. Les valeurs de l'IRS sont rassemblées sur le tableau 15.

Les valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de nombreuses dissemblances. On estime qu'une valeur est faible lorsqu'elle varie entre 0% et 16%. Inversement lorsque les valeurs des indices de similarité sont élevées, les diagrammes apparaissent voisins voire apparentés. On estime qu'une valeur est élevée lorsqu'elle est comprise entre 75% et 100%.

On a dénombré 204 IRS de 0%, 776 IRS de 16%, 58 IRS de 75% (tableau 15). Aucun IRS supérieur à 75% n'a été observé entre les différentes classes de diagrammes établies. Cependant il faut mentionner que les différentes variétés appartenant à une même classe et donc qui ont le même diagramme électrophorétique présentent obligatoirement des IRS de 100%, comme les variétés Kortego et Passo appartenant à la classe 11, Cedro et SW Midelo appartenent à la classes 12, Triologie et Triptic appartenant à la classe 13, et les deux variétés Triade et Protignac qui appartiennent à la classe 19.



On a retrouvé 100% des IRS inférieurs à 75% ce qui signifie une grande diversité dans notre collection au niveau des loci étudiés.

Le calcul des moyennes de similarité de chaque variété de triticales avec les autres (tab. 16) montre que les variétés 1, 4, 7 et 8 ont des origines génétiques éloignées de l'ensemble des autres variétés. Par contre les cultivars appartenant aux classes 11, 18 et 46 présentent des parentés génétiques voisines des autres variétés.

En conclusion, on peut dire que l'hétérogénéité électrophorétique des sous-unités gluténines et sécilines de haut poids moléculaire et des 75K gamma-sécilines et des sous-unités gluténines de faible poids moléculaire constituent des marqueurs génétiques, et les indices de similarité des diagrammes sembleraient aussi exprimer indirectement une certaine forme de parenté entre les variétés.

**Tableau 16 : Moyennes des indices de similarité des différentes variétés de triticales**

N° de diagrammes	Moyenne	N° de diagrammes	moyenne	N° de diagrammes	Moyenne
1	18.3	29	31.85	57	23.2
2	34.74	30	30.13	58	23.59
3	34.8	31	33.34	59	25.19
4	17.56	32	38.95	60	32.91
5	24.9	33	34.53	61	31.42
6	28.33	34	25.5	62	30.42
7	12.2	35	25.67	63	25.75
8	20.92	36	29.3	64	33.72
9	31.59	37	30.73	65	26.43
10	37.13	38	32.15	66	23.55
11	42.63	39	31.98	67	30.48
12	35.04	40	30.24	68	33.07
13	36.13	41	28.5	69	35.06
14	28.39	42	29.39	70	30.28
15	31.98	43	32.46	71	21.06
16	29.14	44	34.68	72	31.9
17	32.07	45	37.06	73	38.62
18	40.6	46	44.51	74	28
19	25.96	47	24.87	75	34.19
20	30.15	48	28.77	76	33.37
21	37.09	49	32.78	77	29.1
22	32.39	50	29.16	78	22.81
23	36.22	51	25.2	79	29.79
24	27.79	52	25.31	80	22.06
25	34.74	53	31.8	81	26.32
26	38.03	54	30.57	82	26.32
27	30.61	55	28.5	83	18.95
28	29.97	56	22.39	84	30.03



## 5.2. Distances génétiques :

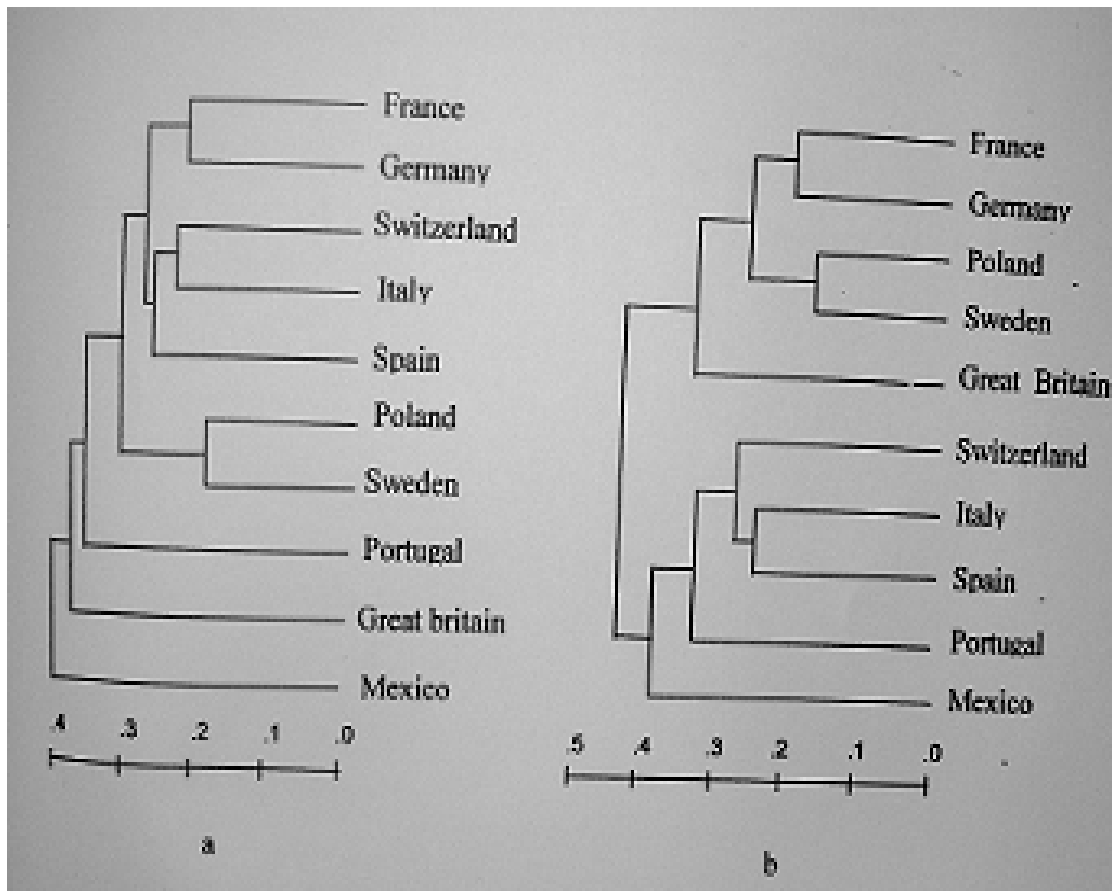
Les fréquences des allèles codés au niveau des sept loci étudiés ont été calculés et comparés auparavant avec ceux des pays européens (tableau 17). Ces fréquences nous ont permis de calculer les distances entre les groupes de cultivars selon leur pays d'origine.

**Tableau 17 : Matrice des distances génétiques**

	TOT	FR	POL	GE	SW	IT	PT	UK	SP	MX
TOT	0,0									
FR	11,5	0,0								
POL	47,4	41,5	0,0							
GE	29,9	24,1	40,6	0,0						
SW	35,5	34,5	20,3	36,8	0,0					
IT	31,4	28,2	19,5	37,3	13,4	0,0				
PT	22,9	24,0	54,2	48,1	46,6	36,7	0,0			
UK	13,9	16,4	35,9	27,5	21,8	20,4	30,6	0,0		
SP	18,0	16,9	37,4	37,5	28,9	19,2	17,8	16,5	0,0	
MX	26,4	28,2	42,9	19,8	29,8	35,4	48,5	20,4	36,3	0,0

Une étude menée par Amiour et *al.*, (2002b) sur une collection de triticales européens montre que les parentés des triticales surtout influencée par 2 loci : le *Gli-R2* et le *Glu B3* (ce dernier code pour les SG-FPM). La diversité allélique au niveau du *Gli-R2* a permis de distinguer 2 groupes ; le groupe 1, caractérisé par l'allèle *Gli-R2c* qui code pour les triplets t1 et qui est surtout présent chez les cultivars britanniques, polonais, allemands, suédois et Français (entre 80% et 100%) et le groupe 2 où deux formes alléliques prédominent : le *Gli-R2a* qui correspond aux sous-unités d1 très fréquentes chez les variétés du Portugal, de la suisse, de l'Italie et de l'Espagne (de 50% à 100%) et la forme nul (absence des sécalines due à la substitution 2D/2R) nommée *Gli-R2d* et qui est présent chez les cultivars d'Italie, d'Espagne et du Mexique avec des fréquences élevées (entre 42,9% et 75%).

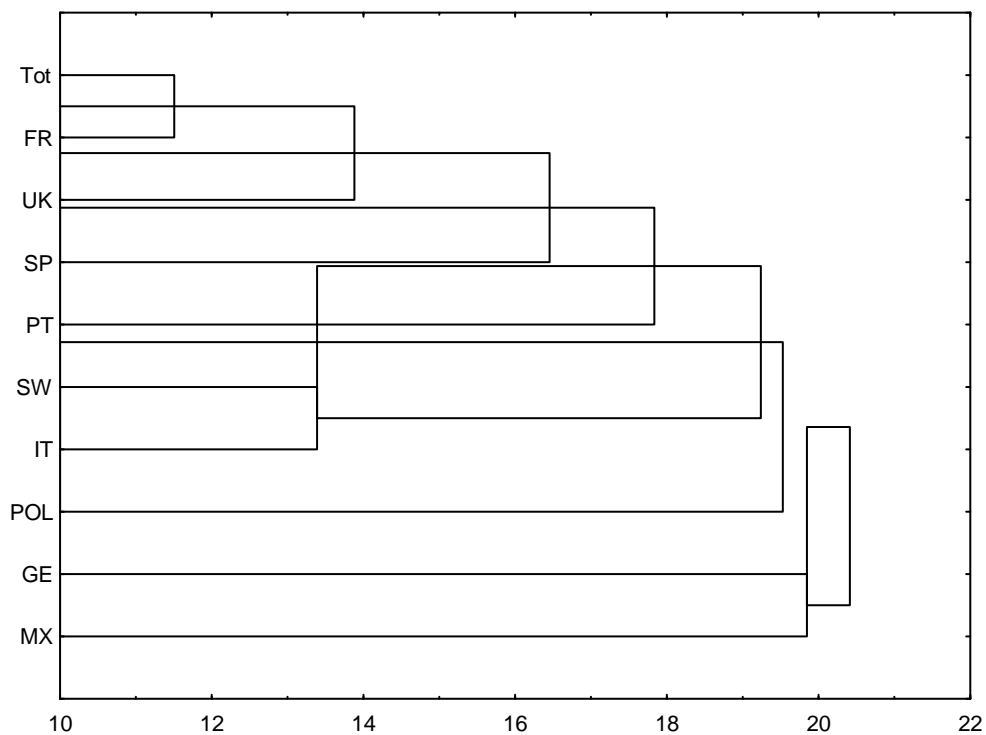
L'effet du *Gli-R2* est évident dans la comparaison des deux dendrogrammes présentés dans la figure 16. Concernant le *Glu-B3*, l'effet est moins évident : nous observons que l'allèle "d" (qui est prédominant chez le blé dur espagnol) et plus fréquent chez les cultivars Suisses, Mexicains, Portugais et Espagnols.



**Figure 16 : Dendrogrammes basés sur les modifications de Roger (Wright, 1978)**  
**Distances génétiques entre des groupes de cultivars originaires de différents pays :**  
 a) les six loci suivants : *Glu-A1*, *Glu-B*, *Glu-R1*, *Glu-A1*, *Glu-B3*, et *Glu-B2*  
 b) les mêmes loci plus le locus *Glu-R2*.

Ces résultats concorde avec la classification basée sur les critères morphologiques et agronomiques faite sur les triticales par Royo et *al.*, (1995) où il distingue le groupe 1 (Grande Bretagne, Portugal, Allemagne, Suède et France) qui a été développé à partir d'un germoplasme européen et qui est généralement du type d'hiver et le groupe 2 caractéristique des pays de l'Europe de sud et où on distingue deux origines ; cultivars espagnols dérivées du matériel ibérique en utilisant les blés tétraploïdes (Sanchez- Monge, 1996) et le germoplasme du CIMMYT contenant essentiellement les types d'été avec 2 pools distincts : triticales complets avec le génome complet du seigle et les triticales substitués 2D/2R.

Les distances génétiques calculées à partir des fréquences alléliques aux sept loci montrent que la collection de notre étude est classée avec les cultivars de France, de Grande Bretagne et d'Espagne (Fig.17).



**Figure 17 : Dendrogramme des distances génétiques entre les cultivars originaire de différents pays.**

## CONCLUSION GENERALE

Dans cette étude, nous avons analysé des protéines de réserve de 88 variétés de triticales hexaploïdes, et elle nous a permis d'apprécier la diversité génétique des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire, des sous-unités sécalines de haut poids moléculaire, des 75K gamma-sécalines et des sous-unités gluténine de faible poids moléculaire et de déterminer les allèles impliqués.

En amant de ce travail, notre première préoccupation a été d'obtenir une meilleure expression de ces protéines. L'application de la technique de Singh *et al.*, (1991) nous a permis d'établir des diagrammes satisfaisants concernant l'efficacité et la reproductibilité.

La technique appliquée dans ce travail nous a permis :

- ✓ D'apprécier l'homogénéité des échantillons analysés,
- ✓ D'apprécier la diversité des sous-gluténines HPM et des sous-unités sécalines qui présentent un polymorphisme assez important. 16 allèles ont été décelé pour les trois loci ( 3 allèles au locus Glu-A1, 8 au locus Glu-B1 et 5 allèles pour le locus Glu-R1).
- ✓ D'apprécier la diversité des 75K gamma-sécaline qui présentent un faible polymorphisme avec seulement 4 allèles du locus Gli-R2.
- ✓ D'apprécier la diversité des sous-unités guténines FPM qui eux aussi présentent un polymorphisme important avec la présence de 15 allèles partagés comme suit : 5 au GluA3, 9 au GluB3 et un seul allèle au niveau du GluB2.

La connaissance de ces allèles nous a permis aussi d'établir des diagrammes types variétaux. Pour les sous-unités gluténines et sécalines HPM et des 75K gamma sécalines nous avons établis 49 diagrammes et pour les sous-unités gluténines FPM 30 diagrammes ont été recensés. Mais pour le diagramme complet des 88 cultivars étudiés nous avons recensé 84 diagrammes de type variétaux ce qui signifie que notre collection présente une diversité et un polymorphisme important.

Le calcul des indices de similarité montre que la plus part des variétés sont éloignées. Les distances génétiques calculées à partir des fréquences alléliques aux 7 loci étudiés montre que notre confirme que notre collection vient de France car elle est très proche des cultivars Français, ainsi que ceux Britanniques et Espagnols.

## Références bibliographiques

- **Amiour N., Benbelkacem A., Khelifi D. and Branlard G.** 2002. Storage protein diversity in hexaploïd triticales grown in Algeria. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Triticale Symposium, Volume : II, Radzikow, Poland, pp 427-432.
- **Amiour N., Jahier J. , Tanguy A.M., Chiron H., and Branlard G.,** 2002. Effect of 1R (1A), 1R (1B) and 1R (1D) substitution on technological value of bread wheat. *Journal of Cereal Science* **35** (2) : 149-160.
- **Amiour N., Dardevet M., Khelifi D., Bouguennec A., and Branlard G.,** 2002a. Allelic variation of HMW and LMW glutenin subunits, HMW secalin subunits and 75 gamma-secalins hexaploïd triticales. *Euphitica* **123** (2) : 179-186.
- **Amiour N., Bouguennec A., Marcoz C., Sourdille P., Bourgoïn M., Khelifi D., and Branlard G.,** 2002b. Diversity of seven glutenin and secalin within triticales cultivars grown in Europe. *Euphitica* **123** (3) : 295-305.
- **Anderson O.D., Litts J.C., and Greene F.C.,** 1997. The a-gliadin gene family. 1Characterization of ten new wheat a-gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and Southern analysis of the gene family. *Theor. Appl. Genet.* **95**:50-58.
- **Aussenac T., Carceller J.L., Kleiber D.** 2001.Changes in SDS solubility of glutenin polymers during dough mixing and resting. *Cereal Chem* ; 78 : 39-45.
- **Autran, J C.** 1973. L'identification des variétés de blé. *Bulletin des anciens élèves de l'école française de meunerie* 259 :163
- **Bean S., and Lookhart G.** 1997. Separation of wheat proteins by two-dimentional reversed-phase high-performance liquid chromatography plus free zone capillary electrophoresis. *Cereal chemistry* **74** : 758-765
- **Benmebarek H .** 2004. Diversité des gluténines HPM, sécalines HPM et 75  $\gamma$ -sécalines d'une collection du CIMMYT de triticales hexaploïdes. Mémoire de Magistère, Université Mentouri, Constantine, 69p.
- **Benmoussa M.** 1999. Production d'une glutenine à faible poids moléculaire dans les feuilles de la luzerne et les tubercules de la pomme de terre. Thèse de de Philosophiae Doçtor (PhD-), la faculté des études supérieures de l'université Lavai, 91p.

- **Bernard M., Autran J.C., and Joudrier P.** 1977. Possibilité d'identification de certains chromosomes de seigle à l'aide de marqueurs biochimiques. *Annales Amélioration des Plantes* **27** : 355-362.
- **Bernard M.** 1989. Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. A. Gallais et H. Bannerot, ed INRA. Edition. 39-54.
- **Bietz J.A., Huebner F.R., and Rothfus J.A.** 1970. Chromatographic comparison of peptic digests of individual gliadin proteins. *Cereal Chem.* **47** : 393-404.
- **Bietz J.A., and Wall J.S.** 1973. Isolation and characterization of gliadin-like subunits fromm glutenin . *Cereal Chem.* **50** : 537-547
- **Bietz J.A., Huebner F.R., Sanderson J.E., and Wall J.S.** 1977. Wheat gliadin homology reveled trough N-Terminal amino acid sequence analysis. *Cereal Chem* **54** : 1070-1083
- **Bietz J.A.** 1979, Recent advances in isolation and characterization of cereal proteins. *Cereal Foods World* **24** : 199.
- **Bietz J.A. and Huebner F.R.** 1980. Structure of glutenin : achievements at the Northern regional research center. *Ann Technol. Agric.* **29** (2) : 249-277.
- **Bietz J.A.** 1986. High-performance liquid chromatography of cereal proteins, p. 105-169. In *Advances in Cereal Science and Technology*. Y. Pomeranz, American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, Minnesota, USA.
- **Boyd W.J.R. and Lee J.W.**, 1967. The control of wheat glutenin synthesis at the genome and the chromosome levels. *Experiencia* **23** : 332-333.
- **Branlard, G. and Dardevet M.** 1985a. Diversity of grain proteins and bread wheat quality. I. Correlation between Gliadin bands and Flour Quality Characteristics. *Journal of Cereal Science* **3** : 329-343.
- **Branlard G. and Dardevet M.** 1985b. Diversity of grain proteins and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and Flour Quality Characteristics. *Journal of Cereal Science* **3** : 345-354.
- **Branlard G., Autran J.C., Rousset M., Dardevet M., and Koenig J.** 1990b. Catalogue des sous-unités de haut poids moléculaires des gluténines des blés. INRA, 56p.
- **Branlard G., Khelifi D., Lookhart G.** 1992a. Identifivation of some wheat proteins separated by two-step acid polyacrylamide gel electrophoresis and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis technique. *Cereal Chemistry* **69** : 677-678.

- **Branlard G., Dardevet M., Saccomano R., Lagoutte F., Gourdon J.** 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* ; 119 : 57-9.
- **Branlard G., Dardevet M., Amiour N., and Igrejas G.** 2002a. Allelic diversity of the LMW glutenin subunits of the French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetic Crop Evolution*, Soumis.
- **Branlard G.** 2009. Les bases génétiques et l'utilisation des marqueurs associés à l'amélioration de la qualité des blés. *Cahiers Agricultures*. Volume 18, Numéro 6, 506-11, *Biotechnologies végétales et gestion durable des résistances chez les végétaux, Synthèse*
- **Brzeneinski W. and Lukaszewski A.J.** 1998. Allelic variation at the Glu-1, Sec-2 and Sec-3 in winter triticale. p 6-12, Vol. II. In 4<sup>th</sup> International Triticale Symposium. P. Juskiw (ed.), Alberta, Canada.
- **Bushuk W. and Zillman R.R.** 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Canadian Journal of Plant Science* **58** : 505-515.
- **Carillo J.M., Vasques J.F., and Orellana J.** 1992. Identification and mapping of the Gli-3 locus on chromosome 1R of rye (*Secale cereale* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **84** : 237-241.
- **Carver B.F., and et Rayburn A.L.** 1995. Composition of related wheat stocks possessing 1B or T 1BL.1RS chromosomes : grain and floor quality. *Crop Science*. **35** :1316-1321.
- **Dachkevitch T., Redaelli R., Biancardi A.M., Metakovsky E.V., and Pogna N.E.** 1993. *Theor Appl Genet.* **86** : 389-399.
- **Cheftel J.-C., Cuq J.L., et Lorient D.** 1985. *Protéines alimentaires, Technique et documentation*-Lavoisier, France, 309 p.
- **Coulson C.B., and Sim A.K.** 1964. Protein of various species of wheat and closely related genera and their relationship to genetical characteristics. *Nature* 202 : 1305-1308.
- **Dedio W., Kaletsikes P.J., and Larter E.N.** 1969. Numerical chemotaxonomy in the genus *Secale*. *Can. J. Bot.* 1175-1180.
- **Devos K.M., Atkinson M.D, Chinoy C.N., Francis H.A., Harcourt R.L, Koebner R.M.D., Liu C.J., Masojc P., Xie D.X., and Gale M.D.** 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **85** : 673-680.
- **Dhaliwal A.S., and McRitchie F.** . 1990. Contributions of protein fractions to dough handling properties of wheat rye translocation cultivars. *Journal of Cereal Science* **12** : 113-122.

- **Evans L.E., Shebeski L.H., McGinnis R.C., Briggs K.G., and Zuzens D.** 1972. Glenlea red spring wheat. *Can. J. Plant Sci.* **52**:1081-1082.
- **Ewart J.A.D.** 1983. Slow triplet  $\beta$ -gliadin from Cappelle-Desprez. *J Sci Food Agric* **34** : 653-656.
- **Feillet P.** 2000. Le grain de blé: Composition et utilisation, (Ed) : INRA, 312 p.
- **Fenn D., Lukow O.M., Bushuk W., and Depauw R.M.** 1994. Milling and baking quality of 1BL/1RS translocation wheat. 1. Effect of genotype and environment. *Cereal chemistry.* **71** : 189-195.
- **Field J.M., Shewry P.R., March J.A., and Mifflin B.J.** 1982. The purification and characterization of homologous high molecular weight storage proteins from grain of wheat, rye and barley. *Theoretical and Applied Genetics* **62** : 329-336.
- **Finney K.F.** 1971. Fractionating and reconstituting techniques to relate functional (bread making) to biochemical properties of wheat-flour components. *Cereal Science Today.* **16** : 342-356.
- **Forde J., Malpica J.M., Hlford N.G., Shewry P.R., Anderson O.D., Greene F.C., and Mifflin B.G.** 1985. The nucleotide sequence of HMW glutenin subunit gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Nucleic Acids Res* **13** : 6817-6832.
- **Galil G., and Feldman M.** 1984. Mapping of glutenin and gliadin genes located on chromosome 1B of common wheat. *Mol Gen Genet.* **193** : 293-298.
- **Galili G., Altschuler Y. and Leavanony H.** 1993. Assembly and transport of seed storage proteins. *Trend Cell Biol.* **3**: 437-443.
- **Gallais A. and Bannerot H.** 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées : Objectifs et critères de sélection. (Ed) : INRA : 768 p.
- **Gobaa S., Bancel E., Branlard G., Kleijer G, Stamp S.** 2008. Proteomic analysis of wheat recombinant inbred lines: variations in prolamin and dough rheology. *J Cereal Sci* ; **47** : 610-9.
- **Graybosh R.A., Peterson C.J., Hansen L.E., and P.J. Mattern.** 1990. Relationships between protein solubility characteristics, 1BL/1BS, HMW glutenin composition, end-use quality in winter wheat germoplasm. *Cereal Chemistry* **67** : 342-349.
- **Graybosh R.A., Peterson C.J., Hansen L.E., Worrall D., Shelton D.R., and Lukazewski A.** 1993. Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines. *Journal of Cereal Science* **17** : 95-106.



- **Gupta R.B., and Shepherd K.W.** 1990. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **80** : 65-74
- **Gupta RB., and Shepherd K.W.** 1990. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin 2. Genetic control of subunits in species related to wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **80** : 183-189.
- **Hamauzu Z., Arakawa T., and Yonezawa D.** 1972. Molecular weights of glutenin and gliadin-polypeptides estimated by SDS- polyacrylamide gel electrophoresis. *Agric Biol Chem* **36** : 1829-1830.
- **Hohmann U., Zoller J., Robbelen G., Herrmann R.G., and Kasman M.E.** 1998. Characterization of hexaploid triticale with improved baking quality, p. 208-217, Vol. I. In 4<sup>th</sup> International Triticale Symposium. P. Jsliew (ed.), Red Deer, Alberta, Canada.
- **Huebner F.R. and Wall J.S.** 1974. Wheat glutenin subunits. I. Preparative separation by gel filtration and ion exchange chromatography. *Cereal Chem.* **51** : 228-268.
- **Igrejas G., Guedes-Pinto H., Carnide V. and Branlard G..** 1999a. The high and low glutenin molecular subunits and  $\omega$ -gliadin composition of bread and durum wheats commonly grown in Portugal. *Plant Breeding.* **118** : 297-303.
- **Igrejas G., Guedes-Pinto H., Carnide V., and Branlard G.** 1999b. Seed storage protein diversity in triticale varieties commonly grown in Portugal. *Plant Breeding.* **118** : 303-306.
- **Jackson E.A., Holot L.M., and Payne P.I.** 1983. Characterization of high molecular weight gliadin and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localization of their controlling genes. *Theor Appl Genet* **66** : 29-37.
- **Jackson E.A., Holot L.M., and Payne P.I.** 1985. Glu-B2, a storage protein locus controlling the D group of LMW glutenin subunits in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Genet Res* **46** : 11-17.
- **Jackson E.A., Morel M.H., Sontage-strohm T., Branlard G., Metakovsky E.V., and Redaelli R.** 1996. Proposal for combining classification systems of alleles of GLI-1 and Glu-3 loci in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J genet and breed* **50** :321-336.
- **Khan K., and Bushuk W.** 1979. Studies of glutenin –XIII- Gel filtration, isoelectric focusing, and amino acid composition studies. *Cereal Chem.* **56** (6) : 505-512.
- **Kasarda D.D., DaRosa D.A., and Ohms J.I.** 1974. N-terminal sequence of alpha2-gliadin. *Biochem Biophys Acta* **351** : 290-294.

- **Kasarda D.D., Bernardin J.E., and Nimmo C.C.** 1976. Wheat proteins. In : Pomeranz, Y., Advances in Cereal Science and Technology, AACC, St-Paul, Minnesota, 158-236.
- **Kasarda D.D, Autran J.C., Lew E.J.L., Nimmo C.C., and Shewry P.R.** 1983. N-terminal amino acid sequences of gliadin and secalins : implication for the evolution of prolamin genes. *Biochimica et biophysica Acta* **747** : 138-150.
- **Kasarda D.D., Lafiandra D., Morris R., and Shewry P.R.** 1984. Genetic relationships of wheat gliadin proteins. *Kultrapflanze* **32** : 33-52.
- **Kasarda D.D.** 1989. Glutenin structure in relation to wheat quality, pages 277-302, in: *Wheat is unique*. Pomeranz, Y, eds., Am. Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN.
- **Kloster P., Krechting C.F., and Van Gelder W.M.J.** 1991. Quantitative variation in individual high-molecular-weight glutenin subunits of wheat in relation to variation in environmental conditions. *J. Sci. Food. Agric.* **57** : 405-415.
- **Kreis M., Shewry P.R., Ford B. G., Ford J., and Mifflin B.J.** 1985 Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular reference to those of wheat, barley and rye. *Oxford Surveys of Plant Molecular Biology* **2** : 259-317.
- **Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.
- **Lagudah E., MacRitchie F., and Halloran G.M.** 1987. Influence of high-molecular-weight subunit of glutenin derived from *Aegilops squarrosa* on flour quality. *J. Cereal Sci.* **5** : 129-138.
- **Lasztity R.** 1984. *The chemistry of cereal proteins* CRC Press, boca Raton, Fla.
- **Lawrence G.J., and Shephred K. W.** 1981. Chromosomal location of genes controlling seed proteins in species related to wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **59** : 25-31.
- **Luo C., Griffin WB., Branlard G., McNeil DL.** 2001. Comparison of low- and high molecular-weight glutenin allele effects on flour quality. *Theor Appl Genet* : 1021088-98.
- **MacRitchie F.** 1985. Studies of methodology for fractionation and reconstitution of wheat flours. *J. Cereal Sci.* **3** : 221-230.
- **MacRitchie F., DuCros D.L., and Wrigley C.W.** 1990. Flour polypeptides related to wheat quality. In : Pomeranz ed, *Avances in cereal science and technology*, Am. Assoc. Cereal Chem., St Paul, MN, **10** :19-145.
- **MacRitchie F.,** 1999. Wheat proteins : Characterization and role in flour functionality. *Cereal Food World.* **44** : 188-193.

- **Metakovsky E.V., Akhmedov M.G., and Sozinov A.A.** 1986. Genetic analysis of gliadin-encoding genes reveals gene clusters as well as single remote genes. *Theor Appl Genet* **73** : 278-285.
- **Metakovsky E.V., Weigley C.W., Bekers F., and Gupta R.B.** 1990. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheat *Austral. J. Agric Res.*, **41** : 289-306.
- Metakovsky E.V., Chernakov V.M., Upelnik V.P., Redaelli A., Dardevet M., Branlard G., Pogna N.E.** (1996). Recombination mapping of storage protein genes in common wheat. 1 - Minor gliadin coding loci on the chromosome 1A : a revision. *J Genet Breed*, 50: 227-86.
- **Mifflin B.J., Byears M., Field J.M., and Faulks J.A.** 1980. The isolation and characterization of protein extracted from whole milled seed, gluten and developing protein bodies of wheat. *Ann Tech Agric* **29** :133-147.
- **Mifflin B.J., Byears M., Field J.M., and Shewry P.R.** 1983. Cereal-storage proteins and their effects on rheological properties. In: Daussant, J.J. Mosse, and J.Vaughan Seed proteins, Phytochemical society of Europe Symposia, n° 20 Academic Press, London, 255-319.
- **Nieto-Taladriz M.T., Ruiz M., Martinez M.C., Vázquez J.F., Carillo J.M.** 1997. Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theor Appl Genet* **95** : 1155-1160.
- **Osborne T.B.** 1907. The proteins of wheat kernel. Publ.84. Carnegie Institute. Washington DC.
- **Payne P.I., and Corfield K.G.** 1979. Subunits composition of glutenin wheatey proteins isolated by filtration in a dissociating medium. *Planta* **145** : 83-88.
- **Payne P.I., and Corfield K.G., and Blackman J.A.** 1979. Identification of a high molecular-weight subunits of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* **55** : 153-159.
- **Payne P.I., Law C.N., and Mudd E.E.** 1980. Control by homologous group 1 chromosome of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm ; *Theor Appl Genet* **58** : 113-120.
- **Payne P.I., and Corfield K.G., Holt L.M., and Blackman J.A.** 1981. Correlation between the inheritance of certain high molecular weight subunit of glutnin and breadmaking quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.* **32** : 51-60.
- **Payne P.I., and Lawrence G.J.** 1983. Catalogues of alleles of the complex gene loci, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high molecular subunits of glutenin in hexaploids wheat. *Cereal Res Commun* **11** : 29-35.

- **Payne P.I., Holt L.M., and Jackson E.A.** 1984b. Genetical analysis of wheat endosperm storage proteins. In : Proc 2<sup>nd</sup> Int Workshop Gluten Proteins (Graveland A and Moomen JHE ? eds) Wageningen, The Netherlands : 11-119.
- **Payne P.I.** 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. Annual Revue Of Plant Phisiology **38** : 141- 153.
- **Payne P.I., Nighting M.A., Krattinger A.F., and Holt L.** **1987.** The relationship between HMW glutenin composition and the bread-making- quality of British grown varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture **40** :51-65.
- **Payne P.I., Holt L.M., and Lister P.** 1988. Gli-A3 and Gli-B3, two newly designated loci coding for some omega-type gliadins and D subunits of glutenins. These proceeding.
- **Pena R., Mergoum J.M., and Pfeiffer W.H.** 1998. Glutenin subunits composition and bread-making quality characteristics of recently developed triticale germoplasm of CIMMYT, p. 117-123, Vol. 1 In 4<sup>th</sup> International Triticale Symposium. Juskiew, P. (ed.), Alberta, Canada.
- **Pogna N.E., Metakovsky E.V., Reddaelli R., Raineri F., and Dachkevitch T.** 1993. Recombinaison mapping of Gli-5, a new gliadin coding locus on chromosomes 1A and 1B in common wheat. Applied Genetic, **87** : 113-121.
- **Popineau Y., and Pineau F.** 1988. Changes of conformation and surface hydrophobicity of gliadins. Wiss. Technol. 21 : 113.
- **Popineau Y., Cornec M., Lefebvre J., Marchylo B.** 1994. Influence of high Mr glutenin subunits on the glutenin polymers and the rheological properties of gluten subfractions on near-isogenic lines of wheat Sicco. J Cereal Sci ; 19 : 231.
- **Preston K.R., Woodbury W., and Bendelow V.** 1975. The effect of gliadin fractions of varying molecular weight on the mixing properties of a synthetic dough system. Cereal Chem. **52** : 427-430.
- **Redaelli R., Pogna N.E., Dachkevitch T., Cacciatori P., Biancardi A.M., and Metakovsky E.V.** 1992. Inheritance studies of 1AS/ADS cheomosome translocation in the bread wheat variety Persivan-1. J Genet Bread **46** : 353-360.
- **Royo C., Sler C., and Romagosa I.** 1995. Agronomical and morphological differenciation among winter and spring triticales. Plant Breeding **114** : 413-144.
- **Sanchez- Monge E.A.** 1996. A retrospection on triticale. In : H. Guedespinto, N. darvey and V.P. Carnide (Eds), Triticales Today and tomorrow, pp 73-81. Kluwer Academic Plub, Netherlands.
- **Sears E.R.** 1966. Nullisomic6tetrasomic cominaison in hexaploïde wheat R. Riley and K.R. Lewis (eds), Chromosome manipulation and plant genetics. Oliver and Boyd, Eidenberg.

- **Shepherd K.W.** 1968. Chromosomal control of endosperm proteins in wheat and rye ; p. 86-96. In 3<sup>rd</sup> International wheat Genetics Symposium. Finaly, Shepherd, K.W., Canerra. Varughese, T.Barker et E.Saari (1971).
- **Shewry P.R., Field J.M., Lew J.L., and Kasarda D.D.** 1982. The purification and characterization of two groups of storage proteins (secalins) from rye (*Secale cereale* L.) ; Journal of Experimental Botany **33** : 261-268.
- **Shewry P.R., Parmar S., and Mifflin B.S.** 1983. Extraction, separation and polymorphisme of the prolamin storage proteins (secalins of rye). Cereal Chemistry **60** : 1-6.
- **Shewry P.R., Bradberry D., Franclin J., and White P.R.** 1984. The chromosomal localization and linkage relationships of the structural genes for the prolamin storage proteins (secalins) of rye. Theoretical and Applied Genetics **69** : 63-69.
- **Shewry P.R., Parmar S., and Miller T.E.** 1985. Chromosomal location of the structural genes for the Mr 75,000  $\gamma$ - secalins in *Secale monatum* Guss : evidence for a translocation involving chromosomes 2R and 6R in cultivated rye (*Secale cereale* L.). Heredity **54** : 381-383.
- **Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M., and Mifflin B.J.** 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins : a reassessment. Journal of Cereal Science **4** : 97-106.
- **Shewry PR., Halford N.G., Field J.M., and Tatham, A.S.** 1989. The structure and functionality of wheat gluten proteins. Pages 113-1 16. In: Proc. Aust. Cereal Chem. Conf., 38th. L. Murray, ed.. R. Aust. Chem. Inst., Melbourne.
- **Shewry P.R., and Tatham A.S.** 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Biochem. J. 267:1-12.
- **Shewry P.R., Halford N.G., and Tatham A.S.** 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. Journal of Cereal Science **15** : 105-120.
- **Shewry P.R., Napier J.A., and Tatham, A.S.** 1995. Seed storage proteins: Structure and Biosyhtesis. Plant Cell **7:945-956**.
- **Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S, Popineau Y., Lafiandra D., Belton P.S.** 2003. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. Adv Food Nutr res : 45219-302.
- **Singh N.K. and Shepherd K.W.** 1984. Mapping of genes controlling the high\_molecular-weight glutenin subunits of rye on thee long arm of chromosome 1R. Genetical Research Cambridge **44** : 117-123.

- **Singh N.K. and Shepherd K.W.** 1988b. Linkage mapping of the genes controlling endosperm proteins in wheat. Genes on the long arms of group 1 chromosomes. *Theor Appl Genet.* **75** : 642-650.
- **Singh N.K., and Shepherd K.W., and Cornish G.B.** 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits for glutenin. *J Cereal Sci.* **14** : 203-208.
- **Tatham A.S., Mifflin B.J., and Shewry P.R.** 1985. The Beta turn conformation in wheat gluten protein : relation ship to gluten elasticity. *Cereal Chemistry* **65** : 405-412.
- **Tatham A.S., and Shewry P.R.** 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary and thermal stabilities of a, b, g-gliadins. *Journal of Cereal Science* **3** : 103.
- **Vallega V., and. et Waines J.G.** 1987. High-molecular\_weight glutenin subunit variation in *Triticum turgidum* var. *dicoccum*. *Theor Appl Genet* **74** : 706-710.
- **Varughese G., Barker T., and Saari E.** 1971. *Triticale*. CIMMYT, Mexico. D.F. 32pp.
- **Weiser H., Mödl A., Seilmeier W., and Belitz H. D.** 1987. High-performance liquid chromatography of gliadins from different wheat varieties : amino-acid composition and N-terminal amino-acid sequence of components. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung* **185** : 371.
- **Wright S.** 1978. *Evolution and the genetics Population*, vol .4. Variability within and among Natural population. University of Chicago Press, Chicago.
- **Wrigley G.W., and Bietz J.A.** 1988. *Proteins and amino-acids*, Y. Pomeranz (ed). *Wheat chemistry and technology*, 3<sup>rd</sup> ed, St Paul, MN, American Association of Cereal Chemists. P159.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Evolution de la production du blé, su seigle et du triticale dans les dernières décennies, (source F.A.O).....	5
<b>Tableau 2 :</b> Répartition des espèces blé, seigle et triticale en fonction des niveaux de ploïdie.....	8
<b>Tableau 3 :</b> Teneur en acides aminés chez le blé, le seigle et le triticale.....	11
<b>Tableau 4 :</b> Classification des protéines des céréales.....	13
<b>Tableau 5 :</b> Composition en acides aminés des principales fractions protéiques du grain du blé (mol %). .....	18
<b>Tableau 6 :</b> Liste des 88 variétés de triticales étudiées.....	34
<b>Tableau 7 :</b> Composition allélique des sous-unités gluténines et sécalines HPM et 75y-sécalines des triticales Hexaploïdes.....	47
<b>Tableau 8 :</b> Composition allélique des sous-unités gluténines FPM des triticales hexaploïdes.....	48
<b>Tableau 9 :</b> Fréquences des diagrammes électrophorétiques des sous-unités gluténines et sécalines de haut poids moléculaire et des 75 y-sécalines de 88 variétés de triticales hexaploïdes.....	53
<b>Tableau 10 :</b> Fréquences des diagrammes électrophorétiques des sous-unités gluténines de faible poids moléculaire des 88 variétés de triticales hexaploïdes.....	54
<b>Tableau 11 :</b> Composition allélique des sept loci Glu-A1, Glu B1, Glu R1, Gli R2, Glu A3 Glu B3 et GluB2 (diagrammes types).....	55
<b>Tableau 12 :</b> Fréquences alléliques au niveau des 4 loci GluA1, Glu B1, Glu R1, et Gli R2 trouvés chez les 88 variétés de triticales hexaploïdes étudiées.....	57
<b>Tableau 13 :</b> Fréquences alléliques des sous-unités gluténines à faible poids moléculaire chez les 88 variétés de triticales hexaploïdes.....	58
<b>Tableau 14 :</b> Comparaison des fréquences alléliques.....	60
<b>Tableau 15 :</b> Indices de similarité des classes de triticales groupées selon les différents diagrammes types.....	62 Bis
<b>Tableau 16 :</b> Moyenne des indices de similarité des différentes variétés de triticale.....	63
<b>Tableau 17 :</b> Matrice des distances génétiques.....	64

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Les grains de (a) : seigle, (b) : blé, (c) : triticales.....	6
<b>Figure 2:</b> Origine des triticales hexaploïdes cultivés.....	8
<b>Figure 3:</b> Granules d'amidon entourés de la matrice protéique.....	14
<b>Figure 4 :</b> Séparation des sous unités de gluténines et Sécelines par SDS-PAGE.....	16
<b>Figure 5 :</b> Localisation chromosomique des principaux gènes codant pour les gluténines et les gliadines chez le blé.....	27
<b>Figure 6 :</b> Extraction des gluténines HPM, FPM et $\omega$ -gliadines.....	38
<b>Figure 7 :</b> Schéma des mobilités des sous unités-gluténines de haut poids moléculaire, nomenclature des bandes et des allèles correspondants.....	41
<b>Figure 8 :</b> Schéma des mobilités des sous-unités gluténines de faible poids moléculaire codés par les loci Glu-A3 et Glu-B3.....	42
<b>Figure 9 :</b> Schéma des mobilités des sous unités-sécelines de haut poids moléculaire et des 75K $\gamma$ -sécelines, nomenclature des bandes et des allèles correspondants.....	44
<b>Figure 10 :</b> Eélectrophoregrammes de quelques variétés de triticales.....	49
<b>Figure 11 :</b> Eélectrophoregrammes de quelques variétés de triticales.....	49
<b>Figure 12 :</b> Eélectrophoregrammes de quelques variétés de triticales.....	50
<b>Figure 13 :</b> Eélectrophoregrammes de quelques variétés de triticales.....	50
<b>Figure 14 :</b> Eélectrophoregrammes de quelques variétés de triticales.....	51
<b>Figure 15 :</b> Electrophoregrammes de quelques variétés de triticales.....	52
<b>Figure 16 :</b> Dendrogrammes basés sur les modifications de Roger (Wright, 1978) distances génétiques entre des groupes de cultivars originaires de différents pays.....	65
<b>Figure 17 :</b> Dendrogramme des distances génétiques entre les cultivars originaire de différents pays.....	66



# **ANNEXES**

# Annexe 1

## Solutions utilisées dans l'extraction des gluténines et des sécalines

### Solution A

Propanol-1	50 ml
Eau distillée	qsp 100 ml

### Solution B (conservation environ 2 semaines, à 4°C)

Propanol-1	10 ml
Tris HCl 1M pH 8	1.6 ml
Eau distillée	qsp 20ml

### Solution B1 (à préparer ex temporairement)

Solution B	7ml
Dithiotreitol	70 mg

### Solution B2 (à préparer ex temporairement)

Solution B	7ml
4-vinyl-pyridine	98 $\mu$ l

### Solution C (conservation environ 2 semaines, à 4°C)

SDS	0.2 g
Glycérol	4ml
Bleu de bromophénol	2ml
Tris HCl 1M pH 8	0.8ml
Eau distillée	qsp 10 ml

## Annexe 2

### Solutions utilisées pour la SDS-PAGE

#### **Solution mère d'acrylamide à 35%** (à préparer avec gants et masque)

Bis acrylamide	35 g
Eau distillée	100 ml

#### **Solution mère de bis acrylamide à 2%** (à préparer avec gants et masque)

Bis acrylamide	2 g
Eau distillée	100 ml

#### **Solution stock de SDS à 10%**

Sodium Dodécyl Sulfate	10 g
Eau distillée	100 ml

#### **Solution d'APS (Ammonium Persulfate) à 1%**

A préparer ex tempore

APS	0.1 g
Eau distillée	10 ml

#### **Tampon Tris HCL pH 8.8** (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	60.57 g
Eau distillée	qsp 400 ml
Ajuster à pH 8.8 avec du HCL fumant	8 à 10 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

#### **Tampon Tris HCL pH 6.8** (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30.285 g
Eau distillée	qsp 200 ml
Ajuster à pH 8.8 avec du HCL fumant	19.5 ml
Eau distillée	qsp 250 ml

**Tampon d'électrophorèse**

Glycine	70.55 g
Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	15 g
SDS	5 g
Eau distillée	qsp 5000 ml

**Solution de coloration (pour deux gels)**

Acide trichloracétique (TCA)	60 % 100 ml
Solution mère de Bleu de Coomassie R250	25 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

**Solution mère de Bleu de Coomassie R250:**

Bleu de Coomassie R250	10 g
Ethanol 95°	qsp 1000 ml

L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté.

Le bleu de Coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant).

Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

## Annexe 3

### Préparation des gels

(Quantités pour une cuve de deux gels)

#### **Gel de séparation (running gel)**

Acrylamide à 35%	35 ml
Bis acrylamide à 2 %	6 ml
Eau distillée	16.6 ml
Tris-HCL pH 8.8	37.6 ml
SDS à 10 %	1 ml
APS à 1%	2.5 ml
TEMED	50 µl

#### **Gel de concentration (stacking-gel):**

Acrylamide à 35 %	3.42 ml
Bis acrylamide à 2 %	0.86 ml
Eau distillée	30.4 ml
Tris-HCL pH 6.8	5 ml
SDS à 10 %	0.4 ml
APS à 1 %	2 ml
TEMED	40 µl

## Résumé

Le triticales (*x triticosecal Wittmack*) est une céréale synthétique dérivant de l'hybridation entre le blé cultivé (*Triticum aestivum* ou *Triticum durum*) et le seigle (*Secale cereale*). Depuis les premières formes fertiles réussies par Rimpau en 1891, plusieurs types ont été obtenus. L'intérêt de cette découverte botanique réside dans ces qualités de rendement stable et élevé, sa résistance aux maladies et ainsi que sont aptitude à s'adapter aux conditions pédo-climatiques du milieu.

Malgré les tentatives d'amélioration de cette céréale hybride par translocation et substitution sa qualité technologique reste beaucoup moins élevée que celle du blé, est pour cette raison sa production est destinée beaucoup plus pour l'alimentation animale. Le polymorphisme des protéines de réserves du triticales est grand, cette variabilité génétique est le résultat du travail des sélectionneurs qui l'ont introduite principalement pour améliorer les performances agronomiques du triticales.

Dans notre travail, nous avons procédé à l'étude de la diversité des sous-unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire (SG-HPM et SG-FPM), des sous-unités sécalines des haut poids moléculaire (SS-HPM) de 88 variétés de triticales hexaploïdes fournies par l'UMR Amélioration et santé des Plantes INRA de Clermont-Ferrand.

Pour un premier temps déterminer les loci et les allèles impliqués dans l'expression de ces protéines puis dans un second temps pour comparer nos résultats avec ceux obtenus sur une collection de triticales cultivés en Europe et enfin pour calculer les indices de similarité entre nos variétés.

**Mots clés** : diversité, triticales hexaploïde, gluténines, sécalines, HPM, FPM, SDS-PAGE.

## **Abstract :**

Triticale (*x Triticosecale Wittmack*) is a synthetic cereal derived from hybridization between cultivated wheat (*Triticum aestivum* or *Triticum durum*) and rye (*Secale cereale*). Several types have been obtained since success of the first fertile forms made by Rimpau in 1891. The interest of this botanical discovery is the high and the stable yield of this cereal, resistance to diseases and also the ability to adapt to soil and climate conditions. In spite of attempts to improve this cereal by translocation and replacement, production is intended for animal feed because its technological quality is less than that of wheat. The polymorphism of triticale reserves proteins is great. This genetic variability is the result of selectors work who introduced her to improve agronomic performances of triticale.

In our case, we conducted to study diversity of glutenin subunits of high and low molecular weight (HMW-GS and GS-FPM) and secalins subunits of high molecular weight (HMW-SS) of 88 varieties of hexaploid triticale provided by UMR Improvement and Plant Health INRA Clermont-Ferrand. The objectives of this study are to identify alleles loci implied in protein expression, to compare our results with those obtained on a triticale collection cultivated in Europe and also to calculate similarity index between varieties.

**Keywords :** diversity, hexaploid triticale, glutenins, secalins, HPM, FPM, SDS-PAGE.

## ملخص :

التريتيكال (Wittmack Triticosecale) هي الحبوب الاصطناعية المستمدة من التهجين بين القمح اللين او الصلب (*Triticum aestivum* او *Triticum durum*) والجاودار (*Secale cereale*). لقد تم الحصول على عدة أنواع منذ نجاح الأشكال الخصبية الأولى من طرف Rimpau في 1891. أهمية هذا الاكتشاف تكمن في الصفات من عائد مرتفع ومستقر، مقاومة الأمراض، والقدرة على التكيف مع ظروف التربة والمناخ في الوسط.

على الرغم من محاولات تحسين هذه الحبوب المختلطة، تبقى نوعيتها التكنولوجية أقل بكثير من القمح ، وهذا هو السبب الذي يجعل إنتاجها مرتبط بتغذية الحيوانات. أشكال بروتينات التخزين عند نبات التريتيكال كثيرة، وهذا التنوع الجيني هو نتيجة عمل العلماء المربيين الذين اقتصر هدفهم في تحسين الأداء الزراعي لنبات التريتيكال .

في عملنا ، وقد أجرينا دراسة التنوع دا مفارز غلوتينين من الوزن الجزيئي المرتفع والمنخفض، مفارز السيكالين من الوزن الجزيئي العالي و جزيئات  $\gamma$  K 75 سيكالين لعمل على 88 نوعا من التريتيكال سداسي الصيغة الصبغية قدمها لنا UMR (تحسين صحة النبات والموارد الطبيعية ) INRA لكليرمون فيران (فرنسا).

لقد قمنا بتحديد المواضع وآليات المشاركة في التعبير عن هذه البروتينات ثم مقارنة نتائجنا مع تلك التي تم الحصول عليها بالنسبة لمجموعة من التريتيكال زرعت في أوروبا. لقد قمنا كذلك بحساب مؤشرات التشابه بين الأصناف.

**كلمات البحث :** التنوع، التريتيكال سداسي الصيغة الصبغية، السيكالين، الغلوتينين، هجرة كهربائية.