

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

N° d'ordre : 01/D3C/2012

N° de série : 01/MIB/2012

THESE

En vue de l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Spécialité : Biochimie et Biotechnologies

Présentée par :

BELLIL Ines

Sujet de recherche

**Diversité génétique des céréales, Recherche et caractérisation de
leurs allergènes par l'approche protéomique**

Soutenue le 26/11/2012, devant le jury ci-dessous

Président :	Z. MERAIHI	Prof. Université Mentouri Constantine
Directeur de thèse :	D.KHELIFI	Prof. Université Mentouri Constantine
Co-directeur :	S. DENERY	HDR. INRA de Nantes, France
Examineur :	A. BOUTABA	Prof. Université Annaba
Examineur :	N. BELATAR	Prof. Université Setif
Examineur :	L. ARAR	Prof. Université Setif
Invitée :	C. LARRE	Dr. INRA de Nantes, France

A Mes Parents, Saïd et Khalida

A Mes Sœurs, Imen et Amira

A Mes Frères, Amar et Abdeldjalil

A Khelefi Douadi,

Sans qui la génétique et la biochimie du blé ne serait peut-être jamais apparue en Algérie.



« Puisqu'on ne peut être universel en sachant tout ce qui se peut savoir sur tout, il faut savoir peu de tout, car il est bien plus beau de savoir quelque chose de tout que de savoir tout d'une chose. Cette universalité est la plus belle. Si on pouvait avoir les deux encore mieux, mais s'il faut choisir il faut choisir celle-là. Et le monde le sait et le fait, car le monde est un bon juge souvent. », Pensées, Blaise Pascal (1623-1662).

« En essayant continuellement, on finit par réussir, donc : plus on rate, plus a de chances que ça marche. », Les Shado

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales (GBBV) de l'Université Mentouri Constantine associée à l'Unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Nantes, France.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur. Khelifi Douadi, Directeur du Laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales, pour son encadrement scientifique, sa disponibilité, ses conseils pertinents, les discussions scientifiques très intéressantes que nous avons eues au cours de ce travail et l'intérêt qu'il a manifesté pour l'aboutissement de ce travail. Sa confiance ne m'a jamais fait défaut, et il a constamment porté un regard ouvert et constructif sur mes travaux. Merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Madame le Docteur Denery Sandra, Responsable de l'équipe Allergie à l'INRA de Nantes, pour son accueil au sein de son équipe, pour avoir accompagné ces travaux avec intérêt et pour la confiance dont elle a fait preuve à mon égard. Je tiens tout particulièrement à la remercier pour son co-encadrement, sa disponibilité, ses précieux conseils et les corrections apportées à ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Larré Colette, pour son accueil chaleureux au sein de son équipe et pour avoir permis la réalisation d'une partie de cette thèse. Je la remercie également pour son aide scientifique, sa disponibilité et les corrections apportées à ce manuscrit.

Je remercie par ailleurs les différents membres du jury, notamment Madame le Professeur Meraihi Zahia, qui me fait l'honneur de présider ce jury. Merci à Messieurs les Professeurs. Boutaba Aissa, Belatar Noredidine et Arar Lekhmissi, examinateurs de cette thèse. Je leur suis reconnaissante d'avoir accepté ce rôle, et de me faire l'honneur de juger mon travail.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur le Docteur Bachtarzi Mounir Zahary, Médecin Allergologue à Constantine, pour son aide, les longues discussions et ses conseils amicaux.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Madame Pineau Florence qui m'a accompagné et conseillé tout au long de mon stage à l'INRA de Nantes. Je la remercie pour sa gentillesse, sa sympathie, son soutien par la bonne humeur et toutes ses connaissances pratiques qu'elle a su partager avec joie. J'adresse toute ma reconnaissance à Gilbert et Roberta pour leur aide technique.

Je n'oublie pas les bons moments partagés avec les différents membres de l'équipe Allergie de l'INRA de Nantes. Je tiens également à les remercier pour leur gentillesse et leur sympathie.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

J'adresse mes derniers mots à mes parents, sans qui je n'aurais jamais réalisé tout ce parcours. J'espère que vous serez fiers de votre fille. Merci à mes sœurs et mes frères, tout simplement pour avoir été toujours là. Notre complicité a été un soutien indispensable.

ABREVIATIONS

1D	monodimensionnelle
2D	bidimensionnelle
aa	acides aminés
AAIE	Anaphylaxie Alimentaire Induite par l'Effort
AB	Asthme du Boulanger
Ac	Anticorps
CD4	Cluster Differentiation 4
CIMMYT	Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz Y Trigo
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CM-protéine	Chloroforme/Méthanol protéine
DTT	DiThioThreitol
EDTA	EthyleneDiamineTetraaceticAcid
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent
EST	Expressed Sequence Tag
HLA	Human Leucocyte Antigen
HMW	high molecular weight
IEF	IsoElectroFocalisation
IgE	Immunoglobuline de type E
IL	Interleukine
IPG	Gradient de pH Immobilisé
ISAC	Immuno Sorbent Allergen Chip
IUIS	Unité Internationale des Sociétés d'Immunologie
K_a	constante d'affinité
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LMW	Low molecular weight
LTB, C, D	LeukotrieneB, C, D
NK	Natural Killer
nsLTP	non specific Lipid Transfer Protein
PBS	Phosphate Buffer Salin
PGD2	Prostaglandin2
PGM	Plante Génétiquement Modifiée
PR-protein	Pathogen Related-protein
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamid Gel Electrophoresis
SG-FPM	Sous unité gluténines de faible poids moléculaire
SG-HPM	Sous unité gluténines de haut poids moléculaire
SIC	Specific Inhalation Challenge
SIT	Specific ImmunoTherapy
SS-HPM	Sous unités sécals
TCR	T Cell Receptor
Th	T helper (auxiliaire)
WHO	World Health Organization

CODE ACIDES AMINES

Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y

SOMMAIRE

Introduction générale	1
-----------------------	---

Revue bibliographique	3
-----------------------	---

I. Le blé.....3

1. Origine, phylogénie et classification des blés.....	3
1.1. Origine géographique.....	3
1.1.1. Cas particulier du triticale.....	3
1.2. Origine génomique et Phylogénie.....	3
1.2.1. Historique de l'évolution de la génétique des blés.....	3
1.2.1.1. Cas particulier du triticale.....	3
1.2.2. Evolution des blés polyploïdes.....	5
1.2.2.1. Cas particulier du triticale.....	6
2. Le grain de blé.....	7
2.1. La morphologie du grain de blé.....	7
2.2. Les protéines du grain de blé.....	8
2.2.1. Caractéristiques biochimiques et génétiques des prolamines.....	8
2.2.1.1. Les gliadines.....	9
2.2.1.2. Les gluténines.....	10
2.2.2. Caractéristiques structurales des prolamines.....	12
2.2.2.1. Les prolamines riches en soufre.....	12
a. Les α/β -gliadines.....	12
b. Les γ -gliadines.....	12
c. Les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire.....	13
2.2.2.2. Les prolamines pauvres en soufre.....	14
2.2.2.3. Les prolamines de haut poids moléculaire.....	15
2.2.3. Les albumines et les globulines.....	15
2.2.3.1. Les protéines à activité physiologique.....	16
a. Les protéines de transfert de lipides.....	16
b. Les puroindolines.....	17
c. Les inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs trypsiques.....	18
d. β -amylases.....	19
2.2.3.2. Les globulines.....	19
2.3. Homologies des séquences et de structures des protéines du blé.....	20
2.4. Les différentes formes d'utilisation des protéines de blé.....	22

II. L'allergie.....24

1. Les définitions : Petites histoires et Grandes dates.....	24
2. La classification des réactions allergiques.....	25
3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'allergie.....	25
3.1. Les IgE et les récepteurs aux IgE.....	26
3.2. La phase de sensibilisation et la production d'IgE.....	27
3.3. La phase de déclenchement.....	27

III. L'allergie alimentaire.....28

1. La pathophysiologie de l'allergie alimentaire.....	29
2. Une symptomatologie variée.....	30
2.1. Symptômes gastro-intestinaux.....	30
2.2. Symptômes cutanés.....	30
2.3. Symptômes respiratoires.....	31
2.4. Anaphylaxies généralisées.....	31
3. Les tests de diagnostics de l'allergie alimentaire.....	32
3.1. Les tests <i>in vivo</i>	32
3.1.1. Les tests cutanés.....	32
3.1.2. Les tests de provocation.....	33
3.1.2.1. Test de provocation par voie labiale.....	33
3.1.2.2. Test de provocation par voie orale.....	33
3.2. Les tests <i>in vitro</i> : le dosage des IgE spécifiques.....	33
4. Caractéristiques générales des allergènes alimentaires.....	34
4.1. Définitions et nomenclature.....	34
4.2. Structure.....	36
4.3. Classification des allergènes alimentaires.....	37
4.4. Réactions croisées	38
4.5. Les conditions de l'allergénicité alimentaire.....	39

IV. Les principales pathologies associées au blé.....40

1. La maladie cœliaque ou intolérance au gluten.....	40
1.1. Mécanismes cellulaires de la maladie cœliaque.....	40
1.2. Nature des antigènes impliqués.....	41
2. Réactions d'hypersensibilité au blé	42
2.1. L'asthme du boulanger	42
2.2. L'allergie de contact	42
2.3. L'allergie alimentaire au blé.....	43
3. Les différents allergènes du blé.....	44
3.1. Protéines de réserve	44
3.2. Protéines solubles.....	45

V. L'allergénomique.....46

VI. Modification génétique et allergie.....47

VII. Variétés Hypoallergéniques : un bénéfice apporté par les PGM ?49

Partie I : Diversité génétique des céréales

Chapitre 1 : Diversité des gluténines et sècalines dans une collection de variétés de triticale cultivées en France.....51

Chapitre 2 : Variabilité des sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire des blés durs botaniques.....60

Chapitre 3 : Etude de la diversité génétique des blés dur et tendre des oasis algériennes.....72

Partie II : Recherche et caractérisation des allergènes par l'approche protéomique
--

I. Préambule.....	83
II. Matériel et méthodes.....	83
1. Matériel.....	83
1.1. Sérums de patients.....	83
1.2. Variétés de céréale.....	83
1.3. Antigènes utilisés en ELISA.....	83
1.4. Anticorps dirigés contre différentes protéines de la farine de blé.....	84
2. Méthodes.....	84
2.1. Extraction séquentielle des protéines de blé.....	84
2.1.1. Extraction des Albumines/Globulines et des prolamines.....	85
2.1.2. Extraction des fractions Métaboliques et CM-Like.....	86
2.2. Caractérisation des fractions protéiques extraites	86
2.2.1. Dosage des protéines par la méthode BCA (Bicinchonic Acid Pierce) sur Microplaques.....	86
2.2.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	87
2.2.3. Electrophorèse bidimensionnelle	87
2.2.4. Analyse d'image	89
2.3. Détection des allergènes par immunoempreinte	89
2.3.1. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	89
2.3.2. Immunoblotting sur les membranes de nitrocellulose	89
2.4. Tests immunochimiques, ELISA indirect	90
2.4.1. Détection de certaines protéines dans les variétés par ELISA indirect avec des Ac polyclonaux de lapins ou monoclonaux de souris	91
2.4.2. Dosage des IgE spécifiques des patients par ELISA indirect	91
2.5. Identification des allergènes par spectrométrie de masse : Analyse protéomique...92	
2.5.1. Digestion trypsique « en gel »	92
2.5.2. Analyse de la carte peptidique massique par spectrométrie de masse LC MS- MS.....	92
III. Résultats et discussion.....	94
1. Caractérisation des sérums	94
1.1. Caractéristiques cliniques de patients allergiques	94
1.2. Dosage des IgE spécifiques des patients par ELISA indirect	95
2. Caractérisation des variétés.....	98
2.1. Caractérisation des fractions protéiques extraites.....	98
2.2. Cartographie des protéines solubles du blé, triticales et seigle	101
2.3. Comparaison de la composition des variétés de blé et de triticales en certaines protéines dans les fractions albumines/globulines, gliadines et gluténines	104
2.4. Caractérisation des protéines reconnues par les IgE de patients allergiques dans les différents génotypes.....	107
2.5. Comparaison entre le test ELISA et l'immunoblotting.....	113
3. Identification par spectrométrie de masse	114
IV. Conclusion.....	120

Conclusion générale et perspectives	121
Annexes	125
Annexe I : Extraction séquentielle des gliadines et des gluténines.....	125
Annexe II : Extraction séquentielle des fractions métabolique et CM-like.....	126
Annexe III : Electrophorèse bidimensionnelle des Albumines/Globulines.....	127
Annexe IV : Electrophorèse bidimensionnelle des fractions Métaboliques.....	128
Annexe V : Dosage des protéines des trois fractions après extraction séquentielle.....	129
Annexe VI : Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des peptides spécifiques.....	130
Annexe VI : Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction CM-like.....	131
Annexe VIII : Liste des protéines spécifiques identifiées par LC/MS-MS.....	132
Références bibliographiques	136
Résumés	159

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

TABLE DES FIGURES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Coupe longitudinale du grain de blé.....	7
Figure 2 : Séparation électrophorétique (pH acide) des gliadines de blé.....	9
Figure 3 : Séparation électrophorétique en condition réduite des gluténines de blé.....	10
Figure 4 : Représentation schématique de la structure primaire des différentes familles de prolamines de blé.....	11
Figure 5 : Modèle moléculaire de la structure hélicoïdale des coudes β du domaine répétitif des SG-IPM.....	15
Figure 6 : Distribution et liaison des cystéines dans la séquence primaire de nsLTP.....	16
Figure 7 : Modèle moléculaire de la cavité hydrophobe de la LTP1 de blé.....	16
Figure 8 : Alignement des séquences des protéines de transfert de lipides (LTP1) de céréales.....	21
Figure 9 : Représentation des squelettes cystéines de quelques protéines de la superfamille des prolamines de céréales.....	21
Figure 10 : Représentation des structures tridimensionnelles de trois familles de protéines appartenant à la superfamille des prolamines de céréales.....	22
Figure 11 : Structure de l'IgE humaine.....	26
Figure 12 : Induction et mécanismes effecteurs de l'hypersensibilité de type I.....	26
Figure 13 : Mécanismes immunologiques de la réaction allergique IgE-dépendante.....	27
Figure 14 : Interaction lymphocytes T et B, régulation de la synthèse des IgE.....	27
Figure 15 : A: Mastocytes au repos, fixation des IgE après 1ère sensibilisation par l'allergène. B: 2ème étape, pontage des IgE par l'allergène, activation des mastocytes.....	27
Figure 16 : Médiateurs libérés par les mastocytes et basophiles au cours de l'hypersensibilité immédiate suite aux signaux intracellulaires engendrés par les récepteurs aux IgE.....	27
Figure 17 : Représentation schématique de la barrière intestinale et de son système immunitaire associé lors de l'absorption d'aliments.....	29
Figure 18 : Classification of the different groups of allergenic proteins identified in wheat flour.....	45
Figure 19 : Représentation schématique de l'allergénomique.....	47

CHAPITRE 1

Figure 20 : Diversity of storage proteins of triticales grown in France revealed by SDS-PAGE.....	54
Figure 21 : Genetic distances between groups of cultivars originating from different countries.....	57

CHAPITRE 2

Figure 22 : SDS-PAGE patterns of high molecular weight and low molecular weight glutenin subunits of endosperm proteins of accessions from some populations of Botanic durum wheat collected in Algeria.....	64
Figure 23 : Cluster analysis based on allele frequency in each botanic durum wheat population.....	68
Figure 24 : Cluster analysis based on morphological characters in each botanic durum wheat population.....	69

CHAPITRE 3

Figure 25 : SDS-PAGE patterns of high molecular weight and low molecular weight glutenin subunits of Saharan durum wheat from Algerian oases.....78

PARTIE II

- Figure 26 :** Exemple de la réponse IgE spécifique dans le groupe de l'allergie respiratoire sur la fraction soluble.....96
- Figure 27 :** Exemple de la réponse IgE spécifique dans le groupe de l'allergie alimentaire sur les prolamines.....97
- Figure 28 :** Pourcentage des trois fractions albumines/globulines, gliadines et gluténines dans chaque variété de blé, triticale et seigle après extraction séquentielle.....99
- Figure 29 :** Profils électrophorétique des fractions issues de l'extraction séquentielle.....100
- Figure 30 :** Exemple d'électrophorèse bidimensionnelle de l'extrait albumines/globulines.102
- Figure 31 :** Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des peptides spécifiques des gliadines : γ et ω_5 gliadines.....104
- Figure 32 :** Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des peptides spécifiques des gluténines HPM et FPM.....105
- Figure 33 :** Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des protéines de la fraction soluble : LTP et serpine.....106
- Figure 34 :** Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction Métabolique.....107
- Figure 35 :** Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction Albumines/Globulines.....108
- Figure 36 :** Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens et français allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction des gliadines.....109
- Figure 37 :** Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens et français allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction des gluténines.....110
- Figure 38 :** électrophorèse monodimensionnelle de l'extrait métabolique d'une variété de blé saharien.....114
- Figure 39 :** Profil peptidique en spectrométrie de masse LC-MS/MS du digestat trypsique de la bande 11.....115
- Figure 40 :** alignement des séquences protéiques de la thaumatin-like protein (tr|Q8S4P7), la glutathione transferase (tr|Q8RW03|Q8RW03) et serpine Z1A(sp|Q41593|SPZ1A) avec le format FASTA.....116

INTRODUCTION

Admettre son ignorance, c'est montrer sa sagesse.

Ashley Montagu

En ce début de 21^{ème} siècle, l'agriculture mondiale fait face à de nouveaux enjeux. D'une part, la demande en céréales va doubler d'ici 2050, en lien avec l'accroissement des besoins de l'alimentation humaine, mais aussi de l'alimentation du bétail. D'autre part, les nouvelles exigences de la société imposent une production agricole garantissant la sécurité sanitaire, la qualité nutritionnelle et le respect de l'environnement. Pour atteindre ce double objectif, il convient de mettre en œuvre des pratiques agricoles qui garantissent la préservation des ressources naturelles tout en maintenant un haut niveau de performances. L'amélioration d'une espèce cultivée repose en grande partie sur la gestion et l'exploitation de la variabilité génétique qu'elle présente. Cependant cette variabilité peut être restreinte, voire absente pour certains caractères.

En plus, l'éventail de la variabilité génétique des blés cultivés, résultat de 10 000 ans de culture a considérablement diminué ces dernières années en raison de l'introduction des techniques scientifiques modernes pour les besoins de la sélection. La stratégie la plus utilisée pour résoudre ce problème d'insuffisance de la variabilité consiste à exploiter les ressources génétiques que constituent les variétés autochtones et les espèces sauvages apparentées. Ces espèces constituent un réservoir important de gènes et sont des géniteurs potentiels dans l'amélioration des espèces cultivées pour de nombreux caractères tels que la résistance au stress biotiques et abiotiques et la qualité technologique.

La mise en valeur de l'apport des ressources phytogénétiques dans l'amélioration des blés cultivés ne peut être réalisée qu'après une étude génétique, biochimique et moléculaire approfondie. Les évaluations qui ont pour objectif de décrire la diversité peuvent faire appel à des marqueurs biochimiques (protéines de réserve et certains systèmes enzymatiques) ou moléculaires (marqueurs RFLP, microsatellites, etc.) ou protéomiques (recherche de certains protéomes pour couvrir la diversité génétique).

La première partie de notre travail s'inscrit dans ce contexte. Il a pour objectifs la valorisation des ressources phytogénétiques et l'appréciation de la diversité génétique de céréales par l'analyse du polymorphisme des marqueurs biochimiques (sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire) sur différentes collections de blé et de triticale.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous nous intéressons à l'allergie aux céréales et notamment à l'allergie au blé. En effet, le blé est une des céréales les plus cultivées et les plus

consommées dans le monde. Il est couramment utilisé dans l'alimentation humaine sous forme de farine en panification ou en biscuiterie. Néanmoins, la consommation de blé peut provoquer parfois des réactions d'hypersensibilité comme la maladie cœliaque et différentes allergies respiratoires, alimentaires et cutanées. Des recherches en génétique du blé sont donc nécessaires en vue d'identifier et d'analyser la diversité des facteurs biochimiques impliqués dans les incompatibilités et les maladies professionnelles (asthme, rhinites, urticaires, allergies) occasionnées par les farines surtout que des immunoglobulines de type E (IgE) anti-protéines du blé sont exprimés chez les patients allergiques. Ces pathologies mettent en jeu certaines protéines du blé et des peptides issus de la digestion et leurs interactions avec le système immunitaire et la muqueuse intestinale. C'est donc dans ce contexte d'allergie au blé que s'inscrit la deuxième partie de ce travail consacrée à l'identification et à la caractérisation des allergènes du blé.

Les objectifs de ce travail sont d'analyser la diversité génétique des céréales de manière très approfondie au plan biochimique surtout que l'identification des protéines de céréales constitue le premier pas pour la compréhension de l'allergénicité de l'aliment, puis de mener une caractérisation la plus exhaustive possible des différents allergènes des céréales. Une telle démarche fait appel autant à des méthodologies biochimiques de purification et de caractérisation des protéines qu'à des techniques immunologiques analysant la liaison d'anticorps spécifiques et particulièrement d'immunoglobulines de type IgE humaines aux antigènes immobilisés.

La revue bibliographique décrit les résultats concernant les caractéristiques biochimiques et structurales des protéines du blé, les mécanismes de l'allergie et les pathologies associées au blé. La première partie de l'étude traite de la diversité génétique des céréales. La deuxième partie est consacrée à la recherche et la caractérisation des allergènes du blé. Une conclusion générale et des perspectives sont données dans la dernière partie.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

*Ne jamais recevoir pour vraie une chose que je ne la
connusse évidemment être telle.*

R. Descartes

I. LE BLE

1. Origine, phylogénie et classification des blés

1.1. Origine géographique

Le blé est l'une des premières espèces cueillies et cultivées par l'homme, depuis plus de 7000 à 10000 ans, dans le croissant fertile, zone couvrant la Palestine, la Syrie, l'Irak et une grande partie de l'Iran (Croston et Williams, 1981). Des restes de blés, diploïde et tétraploïde, remontant au VII^{ème} millénaire avant J.C. ont été découverts sur des sites archéologiques au Proche Orient (Harlan, 1975).

1.1.1. Cas particulier du triticales

De même que le blé s'est constitué par l'association naturelle de plusieurs espèces de graminées sauvages, à la fin du 19^{ème} siècle, les hommes ont tenté d'associer les qualités du blé et la rusticité du seigle en croisant ces deux espèces cultivées dont le résultat a donné le triticales. Il faut préciser que le blé tendre, l'un des parents du triticales est originaire du proche orient, le deuxième parent, le seigle est originaire de Transcaucasie. Ce dernier n'est pas cultivé en Algérie, seules de faibles surfaces ont été cultivées du temps de la colonisation. 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 issu de la souche Armadillo en provenance du CIMMYT était réceptionné. 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.

1.2. Origine génomique et Phylogénie

1.2.1. Historique de l'évolution de la génétique des blés

Une richesse de données sur la structure génomique des blés cultivés s'est accumulée après presque un siècle de recherche. Commençons par les expériences génétiques pilotes menées par NilssonEhle (1909) et les études cytologiques de Sakamura (1918) et de Sax (1918), les outils pour étudier la génétique ont beaucoup évolué au cours des années. Dans les années 20, la méthode d'analyse nucléaire de génome, basée sur l'observation, sur des plaques en verre,

des appariements des chromosomes dans les hybrides interspécifiques (Kihara, 1919 ; Sax, 1922) a donné des informations sur la constitution de génome, la phylogénie et l'évolution des espèces des genres *Triticum* et *Aegilops* (récapitulées en Lilienfield, 1951). Dans les années 30, le commencement de l'étude des aneuploïdes de blé a déclenché l'ère de traçage cytogénétique et d'analyse des gènes des différents chromosomes et bras de blé (Sears et Sears, 1978). Dans les années 70, des techniques de coloration modernes ont été employées pour analyser les structures chromosomiques des céréales, et un caryotype cytogénétique de blé a été développé (Cox, et al., 1991). Dans les débuts des années 80, des méthodes Non-isotopiques *in situ*, sur des plaques en verre sont utilisées pour tracer des ordres d'ADN des chromosomes (hybridation *in situ*), ce qui a permis de construire un caryotype du blé (Rayburn et Gill, 1985). Ces méthodes cytogénétiques et moléculaires ont considérablement facilité l'analyse cytogénétique du génome de blé et les espèces qui leur sont apparentés. Dans les années 80, Les techniques d'analyse moléculaire font leur apparition et des cartes génétiques du blé tendre (Van Deynze et al., 1995 ; Marino et al., 1996), blé dur (Blanco et al., 1998) et deux espèces ancêtres ont été développés (Dubcovsky *et al.*, 1996). Le siècle a fini par le développement des cartes physiques des 21 chromosomes du blé, en se basant sur des marqueurs moléculaires (Gill et al., 1993; Delaney et al., 1995). Ces cartes physiques préparent le terrain pour tracer et cloner certains gènes agronomiquement significatifs dans le blé polyploïde.

1.2.1.1. Cas particulier du triticales

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 Rimpu. 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 quelques importances qu'au cours des premières décennies du 20 ème siècle et ce n'est que ces dernières années que des chercheurs d'Union Soviétique et d'Europe, Muntzing en Suèdes 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 qualités de nouveaux hybrides fertiles. En 1937, des chercheurs français, grâce à de nouvelles techniques qui consistent en l'utilisation de la colchicine, 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. 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 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.

1.2.2. Evolution des blés polyploïdes

De nombreuses espèces diploïdes sauvages du genre *Triticum* et deux espèces du genre *Aegilops* étroitement liées sont impliquées dans la phylogénie des blés polyploïdes. Les données cytologiques présentées par Kihara (1919) et Sax (1922) sur l'appariement chromosomique des hybrides interspécifiques entre les blés diploïdes/tétraploïdes et tétraploïdes/hexaploïdes indiquent que *T. monococcum* et *T. turgidum* partagent un génome commun et *T. turgidum* et *T. aestivum* ont aussi un génome commun. Les données cytologiques n'ont pas distingué entre les génomes de *T. monococcum* et de *T. urartu* (Johnson et Dhaliwal, 1976), mais l'évidence moléculaire a prouvé que *T. urartu* est réellement le donateur du génome A aux deux blés polyploïdes (Dvorak et al., 1993), incorrectement proposé en tant que donateur du génome B par Johnson (1975). Concernant l'origine des génomes B et G des blés polyploïdes, Sarkar et Stebbins (1956) ont proposé *Ae. speltoïdes* comme le donateur du deuxième génome des blés tétraploïdes. Cette proposition a été soutenue par Riley et al. (1958). L'évidence moléculaire récente confirme que les génomes B et G des blés tétraploïdes ont été donnés par *Ae. speltoïdes* (Dvorak et Zhang, 1990).

Les deux blés hexaploïdes ont une origine récente. McFadden et Sears (1944, 1946) et Kihara (1944) ont démontré que *Ae. tauschii* était le donateur de génome D, résultat d'une hybridation entre *T. turgidum* et *Ae. tauschii*, il y a environ 7 000 ans. Le *Triticum zhukovskiyi* provient de l'hybridation entre *T. timopheevii* et *T. monococcum* (Upadhyaya et Swaminathan, 1963).

Deux espèces biologiques de genre *Triticum* existent pour chaque niveau de ploïdie (Tableau 1). Parmi les blés diploïdes, le *T. monococcum*, est encore cultivé mais dans une mesure limitée, et aussi sa forme sauvage (également connue sous le nom de *T. aegilopoides*) qui est largement distribuée dans le Moyen-Orient. Les hybrides entre ces deux espèces sont

Tableau 1 : Espèces de genre *Triticum* et leurs constitutions génomiques

Espèces	Constitution génomique	
	Nucléaire	organaire
<i>Triticum aestivum</i> L.	ABD	B (rel. à S)
Sous-espèce : <i>Triticum compactum</i> MacKey.; <i>T. macha</i> MacKey; <i>T. spelta</i> Thell.; <i>T. sphaerococcum</i> MacKey		
<i>Triticum Turgidum</i> L.	Ab	B (rel. à S)
Sous-espèce : <i>carthlicum</i> (Nevski) ; <i>T. dicoccum</i> (Schrank) Thell.; <i>blé dur</i> (Desf.) Husn.; <i>T. paleocolchicum</i> A. ; <i>T. polonicum</i> (L.) Thell.; <i>T. turanicum</i> (Jakubz.) A. et <i>T. diccoides</i> (Körn. Asch ex. Et Graebn.) Thell.		
<i>Triticum Zhukovskyi</i> (Zhuk.) Zhuk.	Un tA	A (rel. à S)
<i>Triticum Timopheevii</i> (Zhuk.) Zhuk. sous-espèce <i>armeniicum</i> (Jakubz.)	Un tG	G (rel. à S)
Sous-espèce <i>Triticum monococcum</i> L. (einkorn ou petit épeautre) de <i>T. aegilopoides</i> Thell. (forme sauvage)	A.M.	A.M.
<i>Triticum Urartu</i> Tumanian Gandilyan	A	A

entièrement fertiles. Le deuxième diploïde est le *T. urartu*. Johnson et Dhaliwal (1976) ont prouvé que les hybrides entre le *T. monococcum* et *T. urartu* sont entièrement stériles (bien que leurs chromosomes appariés indiquant une constitution génomique identique).

Les deux espèces tétraploïdes à savoir : *T. turgidum* et *T. timopheevii* sont très peu cultivées et sans importance économique, parfois considérées même comme des formes sauvages. Les hybrides entre ces deux espèces sont stériles. Cependant le *T. dicoccum* qui est une sous espèce de *T. turgidum* fut l'un des blés cultivés dans l'antiquité et le *T. durum* qui est largement cultivé dans nos jours. Les blés *T. aestivum* et *T. zhukovskyi* sont les deux formes hexaploïdes cultivées (Tableau 1). L'*Aegilops* est le genre le plus étroitement lié au *Triticum*. Deux des trois génomes actuels formant le blé panifiable ont été donnés par deux espèces différentes d'*Aegilops*. Le genre *Aegilops* est composé de 11 espèces diploïdes et de 12 espèces polyploïdes, y compris des tétraploïdes et des hexaploïdes. Sept génomes distincts sont présents en génomes des espèces diploïdes, et tous, excepté le génome de T d'*Ae. mutica* sont également présent dans des espèces polyploïdes d'*Aegilops* (Tableau 2)

1.2.2.1. Cas particulier du triticales

Le triticales cultivé est composé de trois génomes : A, B et R , le blé est donneur du génome A et B, le seigle est donneur du génome R. 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 al., 1987). D'un point de vue systématique, le triticales est un genre « artificiel » comportant plusieurs espèces amphidiploïdes, c'est-à-dire résultant de l'union 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) (Tableau 2) (Gallais and Bannerot, 1992).

2. Le grain de blé

2.1. La morphologie du grain de blé

Le grain de blé est un caryopse, c'est-à-dire un fruit sec qui ne s'ouvre pas spontanément, ses parois sont soudées à la graine.

Il faut donc le moudre pour détacher l'enveloppe (son) et récupérer le grain sous forme de farine. Le grain de blé est composé de trois grandes parties distinctes (Figure 1), le péricarpe qui recouvre l'embryon ou germe et l'albumen.

Le péricarpe

Le péricarpe est une couche de protection pour la graine. Il est composé de plusieurs couches tissulaires, l'épiderme recouvert de sa cuticule, l'hypoderme et les cellules croisées et en tube. Ces différentes parties possèdent des propriétés fonctionnelles particulières, notamment vis-à-vis de la pénétration de l'eau dans le grain. Le péricarpe ne contient que 6 à 7% de protéines.

Le germe

Le germe situé dans la partie dorsale du grain, est constitué de deux parties, l'axe embryonnaire et le *scutellum* (cotylédon). Le germe contient principalement des protéines (35 à 40%), des polysaccharides pariétaux (~22%), des composés glucidiques (~20%) et des lipides (~16%). Il est séparé de l'albumen, qui l'entoure, durant la mouture car il contient des corps gras qui affectent la qualité de la farine.

L'albumen.

L'albumen est le tissu de réserve du grain. Il est constitué d'une couche externe de cellules à aleurone (assise protéique) recouvrant l'albumen amylacé. La couche à aleurone contient peu d'amidon (~12%) mais est riche en protéines (30 à 35%) et en polysaccharides pariétaux (~38%). L'albumen amylacé représente la partie la plus importante du grain (~80%). Il est composé d'amidon (~85%) et de protéines (6 à 9%). Compte tenu de l'importance pondérale relative des différents tissus constituant le grain, 70 à 80% des protéines sont localisées dans l'albumen.

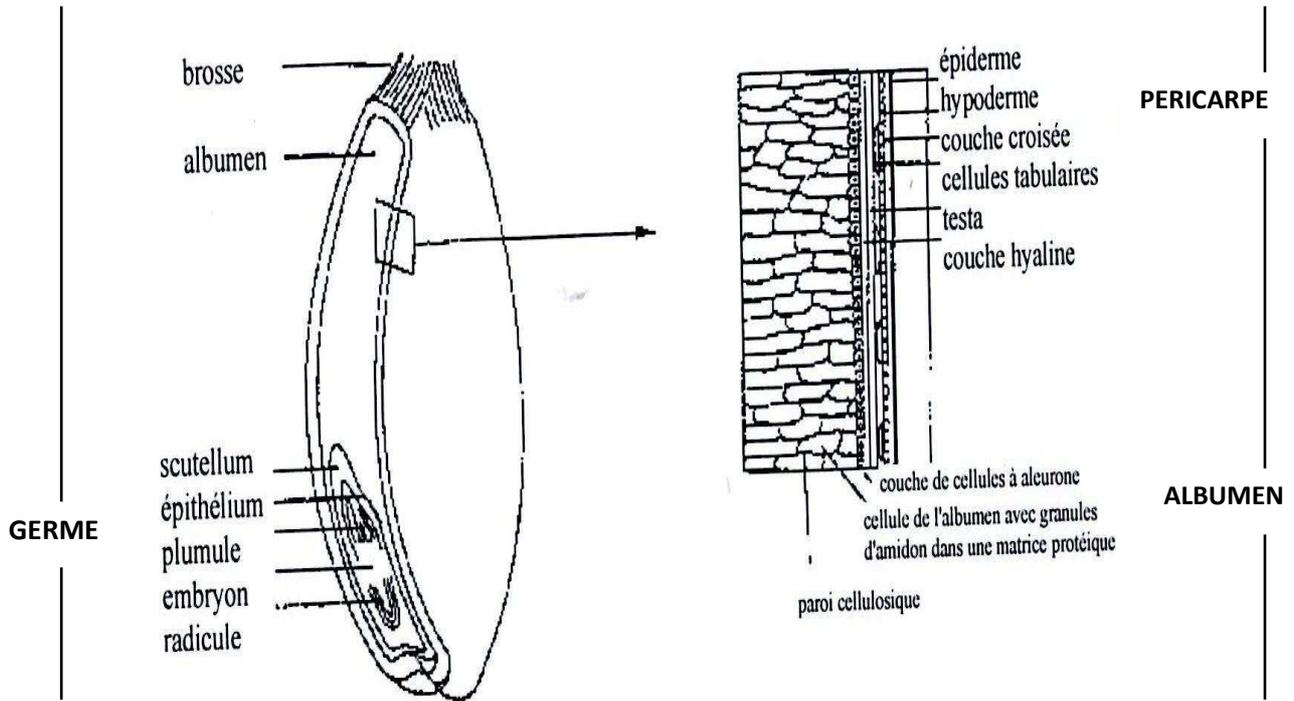


Figure 1. Coupe longitudinale du grain de blé (Cheftel, *et al.*, 1985).

2.2. Les protéines du grain de blé

La farine de blé obtenu par moutures des grains et tamisages, est composée principalement d'amidon (75 à 80%) et de protéines (7 à 14%) ; Depuis les travaux d'Osborne (Osborne, 1907), les protéines de la farine de blé sont souvent classées d'après leurs caractéristiques de solubilité dans différents tampons : les albumines solubles dans l'eau, les globulines solubles dans une solution saline, les gliadines solubles dans une solution eau/éthanol et les gluténines partiellement solubles dans les solutions diluées d'acide et dans certains agents détergents ou dissociants. Les albumines et les globulines sont généralement des protéines ayant des fonctions biologiques essentielles à la physiologie du grain (enzymes, transporteurs, inhibiteur d'enzymes...). Les gliadines (monomériques) et les gluténines (polymériques) constituent les protéines de réserve du grain. Elles sont couramment appelées prolamines en raison de leur composition en acides aminés particulière qui traduit la présence d'un domaine répétitif riche en proline et en glutamine qui est en partie responsable des propriétés rhéologiques originales de cette famille de protéines (Shewry et al., 1990). Ces différentes familles protéiques se répartissent dans différents compartiments du grain. Les prolamines sont localisées uniquement dans l'albumen amylicé. Le germe et la couche à aleurone sont les compartiments les plus riches en albumines et globulines (Tableau 3).

La détermination des structures primaires des prolamines a permis à Mifflin et al. (Mifflin et al., 1983) et Shewry et al. (Shewry et al., 1986) de proposer une classification plus précise des protéines du blé basée sur la composition en acides aminés soufrés, leur structure et leur fonction dans le grain. Selon cette classification, les prolamines correspondent aux protéines de réserve qui sont caractérisées par leur composition en acides aminés très riche en proline et en glutamine. Dans le grain, on ne leur connaît pas d'autres fonctions que celle du stockage d'azote sous forme d'acides aminés utilisables lors de la germination. Cette classification a été récemment détaillée par Shewry et Halford (Shewry et al., 2002a). Les prolamines sont séparées en trois groupes : les prolamines pauvres en soufre, les prolamines riches en soufre et les prolamines de haut poids moléculaire (Tableau 4). Cependant pour décrire totalement la complexité de la famille des prolamines, il faut prendre également en compte l'état d'agrégation à maturité du grain : les gliadines monomériques et les gluténines polymériques.

2.2.1. Caractéristiques biochimiques et génétiques des prolamines

Les prolamines sont les principales protéines de réserve des céréales exceptées pour l'avoine et le riz (Shewry, 1995). Elles peuvent porter des noms spécifiques dérivés du nom latin de

l'espèce : sécalines pour le seigle, hordéines pour l'orge, zéines pour le maïs. La proportion de glutamine et de proline varie entre 30 et 70% des acides aminés totaux selon les céréales caractérisées (Shewry *et al.*, 2002a).

2.2.1.1. Les gliadines

Les gliadines sont un mélange hétérogène de chaînes polypeptidiques qui sont à l'état natif solubles dans les solutions eau/alcool. Elles représentent environ 40% des protéines totales. Elles sont subdivisées en quatre groupes selon leur mobilité électrophorétique à pH acide (Figure 2) : les α - β -, γ - et ω -gliadines (Woychick *et al.*, 1961). Les gliadines sont des protéines monomériques, comprenant des liaisons disulfures intramoléculaires (α/β - et γ -gliadines) ou dépourvues de ponts disulfures (ω -gliadines), interagissant par des liaisons non covalentes entre elles ou avec les polymères de gluténines. La teneur en gliadines est, en effet, corrélée positivement avec l'extensibilité des pâtes (Cornec, 1994 ; Bérot *et al.*, 1996; Ciaffi *et al.*, 1996 ; Schropp *et al.*, 1996). Le rôle des gliadines dans l'élasticité des pâtes peut être attribué à l'effet plastifiant des gliadines et à leur interférence, probablement par des liaisons hydrogènes, avec les interactions gluténine-gluténine (Popineau *et al.*, 1994 ; Khatkar *et al.*, 1995).

Leur masse moléculaire estimée par électrophorèse en présence de SDS est comprise entre 30 et 45 kDa pour les α/β - et γ -gliadines et entre 45 et 75 kDa pour les gliadines (Masci *et al.*, 2002). Leur masse moléculaire calculée à partir des séquences connues des gliadines est comprise plutôt entre 29 et 35 kDa pour les α/β -gliadines, entre 31 et 35 kDa pour les gliadines. Elles sont peu chargées, 6 à 11 résidus basiques par molécule. Le point isoélectrique des α/β - et gliadines est compris entre 6.5 et 8 et celui des ω -gliadines entre 5.5 et 7 (Popineau *et al.*, 1996). Elles présentent un grand polymorphisme d'origine génétique et une variété de blé peut contenir de 20 à 50 gliadines différentes (Brown *et al.*, 1981 ; Pogna *et al.*, 1990). Les gliadines sont codées par des gènes situés sur les chromosomes 1 et 6 des trois génomes A,B et D, aux loci *Gli-1* et *Gli-2* (Tableau 5). Metakovsky (Metakovsky, 1991) a établi un catalogue des allèles (111 allèles recensés) présents à ces différents loci par l'analyse de 45 croisements et de 350 variétés de blé.

Des études récentes ont identifié et caractérisé une nouvelle classe de gliadines de faible poids moléculaire à partir de l'analyse des séquences EST (expressed sequence tags), qui spécifient les gènes transcrits et donc les protéines exprimées, dans l'albumen du blé (Clarke *et al.*, 2000, 2001 ; Anderson *et al.*, 2001). La structure primaire de ces protéines est composée d'une courte séquence N-terminale de 12 acides aminés, d'un domaine répétitif tronqué ne

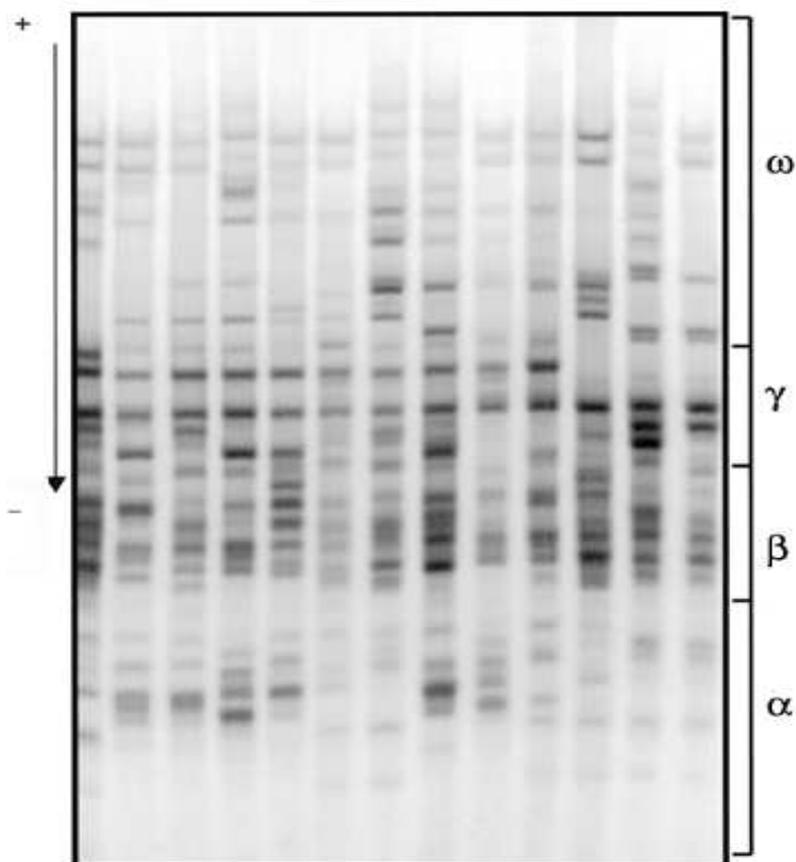


Figure 2. Séparation électrophorétique (pH acide) des gliadines de blé (Gianibelli, *et al.*, 2001)

Tableau 5 : Localisation des gènes codant pour les prolamines du blé (Jackson *et al* 1983 ; Payne *et al* 1984 ; Singh *et al* 1988).

Chromosome	Bras	Blocs alléliques	Protéines
1A, 1B, 1D	Long	Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1	SG-HPM
	Court	Glu-A3, Glu-B3, Glu-D3	SG-FPM
		Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1	ω-gliadines γ-gliadines (majorité) β-gliadines (quelques-unes)
6A, 6B, 6D	Court	Gli-A2, Gli-B2, Gli-D2	α-gliadines β-gliadines (majorité) γ-gliadines(quelques-unes)

SG-HPM : sous-unités gluténines de haut poids moléculaire

SG-FPM : sous-unités gluténines de faible poids moléculaire

contenant qu'un petit nombre d'acides aminés (7 à 15) et d'une région C-terminale non répétitive présentant des homologies avec celles de γ -gliadines (Clarke et al., 2003). Elles sont codées par les chromosomes 7A, 7B et 4B.

Elles sont riches en cystéines et pauvres en glutamine et proline en comparaison des gliadines. Les 8 résidus cystéines présents dans la région C-terminale des γ -gliadines sont conservés et 6 autres ont été observés, 2 dans la région N-terminale et 4 dans la région C-terminale. Ces résidus seraient tous impliqués dans des liaisons intramoléculaires formant une structure très compacte. Les propriétés de viscoélasticité du gluten sont dues principalement aux domaines répétitifs des prolamines. En effet, ces domaines contiennent un taux élevé de glutamine capables de former des liaisons hydrogènes qui contribue à l'élasticité de ces protéines (Shewry et al., 2002b). Les gliadines de faible poids moléculaire du fait de leur court domaine répétitif et donc du faible taux en glutamine jouent un rôle négligeable dans les propriétés viscoélastique du gluten. Néanmoins ces protéines semblent assez abondantes dans l'albumen, d'après les auteurs elles représentent environ 17% des gènes transcrits et des protéines exprimées dans l'albumen de blé. Elles doivent donc être prises en compte dans la détermination de la qualité d'une farine de blé.

2.2.1.2. Les gluténines

Les gluténines sont des mélanges hétérogènes de polymères de sous unités reliées par des ponts disulfures. Les structures polymériques des gluténines reposant sur des ponts disulfures intermoléculaires conduisent à des tailles moléculaires très élevées. Les gluténines représentent également 40% environ des protéines totales. Elles peuvent être divisées en quatre groupes selon leur mobilité électrophorétique en condition réduite (Figure 3), les groupes A, B, C et D. Le groupe A correspond aux sous unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) comprenant les SG-HPM de type-x et de type-y (Payne et al., 1979). Les groupes B et C codés principalement par des gènes localisés aux loci Glu-3 et quelques gènes localisés aux loci Gli-1, correspondent aux sous-unités gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM). Cette fraction gluténine peut contenir des α/β - et γ -gliadines mutées, contenant une cystéine supplémentaire, présentes principalement dans le groupe C (Payne et al., 1979, 1985 ; Thompson et al., 1994). Le groupe D correspond aux SG-FPM qui peuvent également contenir des ω -gliadines mutées (Jackson et al., 1983 ; Masci et al., 1993). Leur masse moléculaire, apparente en SDS-PAGE, varie entre 80 et 120 kDa pour la région A, entre 42 et 51 kDa pour la région B, entre 30 et 40 kDa pour la région C et entre 60 et 75 kDa pour la région D (Gianibelli et al., 2001). Leur masse moléculaire calculée à partir des

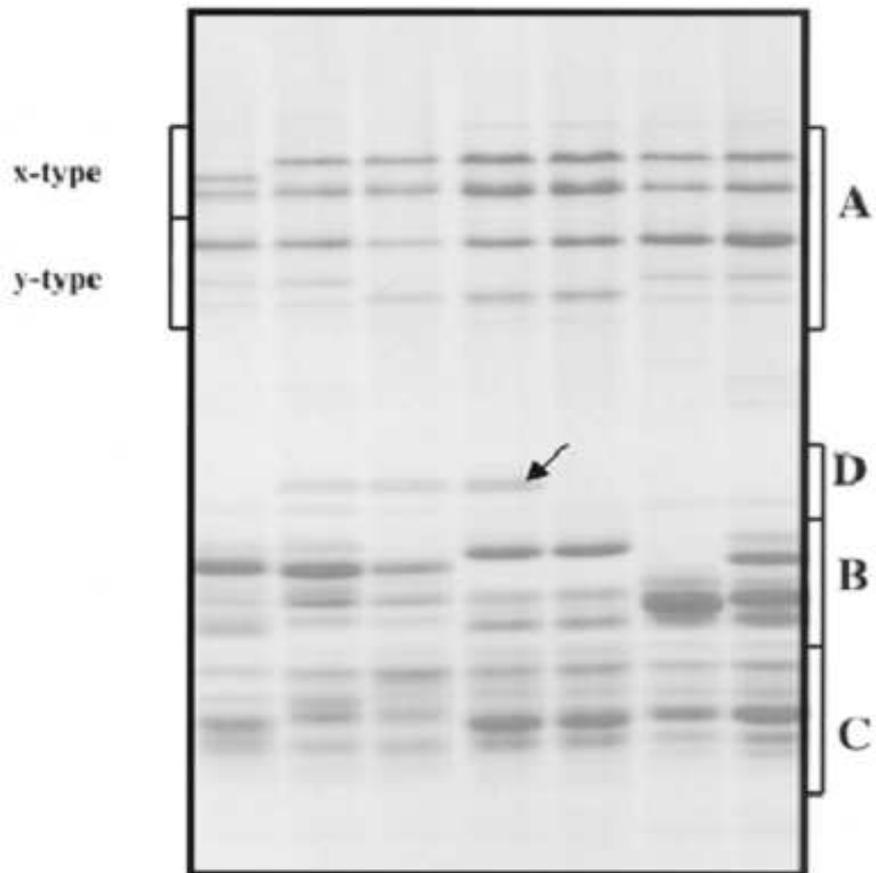


Figure 3. Séparation électrophorétique en condition réduite des gluténines de blé (Gianibelli, *et al.*, 2001).

séquences connues des gluténines est plutôt comprise entre 67 et 101 kDa pour les SG-HPM et entre 22 et 40kDa pour les SG-FPM.

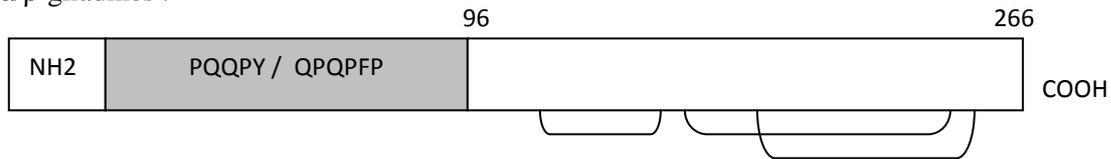
Les SG-FPM sont codées par des gènes localisés sur le bras court des chromosomes du groupe 1 aux loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-D3* (Tableau 5). Une variété de blé peut contenir entre 7 et 16 SG-FPM. Gupta et Shepherd (Gupta et al., 1990) ont dénombré 20 blocs alléliques et 40 sous-unités différentes. Aucune recombinaison n'a été observée entre les gènes codant pour les SG-FPM et les gliadines au niveau des chromosomes 1A et 1D et un très faible pourcentage de recombinaison a été observé entre les loci *Glu-B3* et *Gli-B1*. On peut donc supposer que les gènes codant pour les SG-FPM et les gliadines sont très fortement liés. Morel et al (Morel et al., 1994) ont utilisé ainsi le classement des allèles des gliadines établi par Metakovsky (Metakovsky, 1991) pour identifier les allèles des SG-FPM.

Les gènes codant pour les SG-HPM sont situés sur le bras long des chromosomes du groupe 1 aux loci *Glu-A1*, *Glu-B1* et *Glu-D1* (Tableau 5). A chaque locus de type *Glu-1* sont associés deux gènes, codant pour deux SG-HPM de types différents : x et y. les protéines de type x ont une masse moléculaire supérieure aux protéines de type y. La nomenclature des SG-HPM est donnée en fonction de leur mobilité électrophorétique en SDS-PAGE (Payne et al., 1983). Elles sont numérotées par ordre de mobilité croissante en électrophorèse SDS-PAGE. Si l'on considère un locus, par exemple *Glu-1D*, il code pour une protéine de type x et pour une protéine de type y. les SG-HPM correspondantes seront nommées 1Dx et 1Dy. Le numéro correspondant à l'espèce biochimique est rajouté à la nomenclature situant le locus, ainsi les SG-HPM 2+12 citées précédemment deviennent 1Dx2 et 1Dy12. Un couple de sous-unités, défini par un locus, est transmis de façon monogénique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de recombinaison, et le groupe est assimilable à un seul allèle. Les variétés de blé contiennent entre 3 et 6 SG-HPM. En effet, habituellement, le gène *Glu-A1y* est totalement réprimé, cependant récemment la présence de protéines codées par le gène 1Ay a été détectée (Margiotta et al., 1996 ; Doyen, 1997). Les gènes 1By et 1Ax ne sont exprimés que chez certaines variétés.

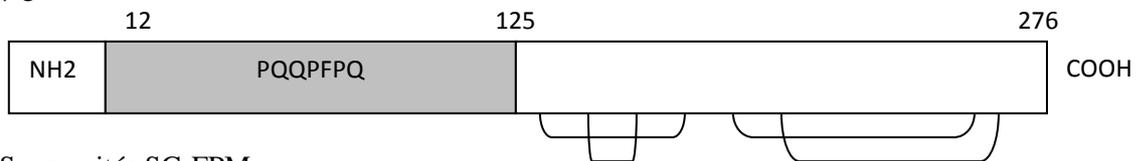
La meilleure connaissance de la structure primaire des prolamines résulte du clonage de leurs gènes et de la déduction de la séquence en acides aminés à partir de celle de l'ADN des gènes respectifs. Différentes techniques telles que le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge à transformation de Fourier et la diffraction des rayons x et des neutrons ont été utilisés pour déterminer les caractéristiques structurales majeures de ces protéines. Les prolamines sont constituées d'un domaine répétitif et d'un domaine non répétitif, mais la taille et la localisation de ces domaines varient selon les prolamines (Figure 4). L'analyse de la

Prolamines riches en soufre :

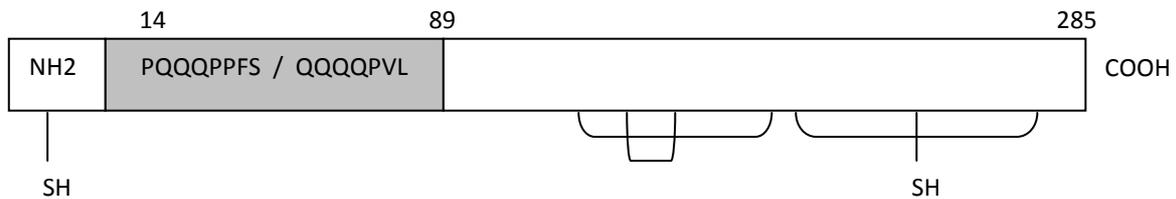
α/β -gliadines :



γ -gliadines:



Sous-unités SG-FPM:



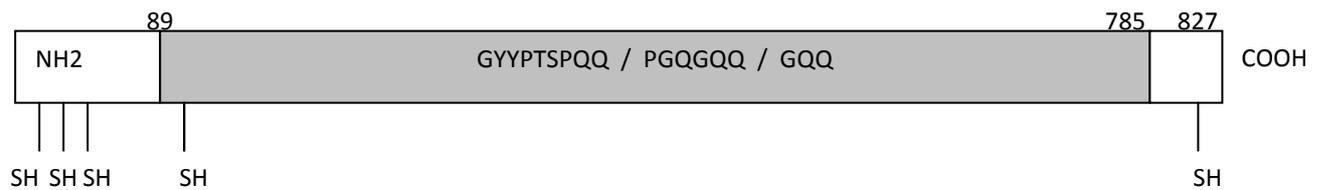
Prolamines pauvres en soufre :

ω -gliadines :



Prolamines de haut poids moléculaire :

Sous-unités SG-HPM de type-x :



Sous-unités SG-HPM de type-x :

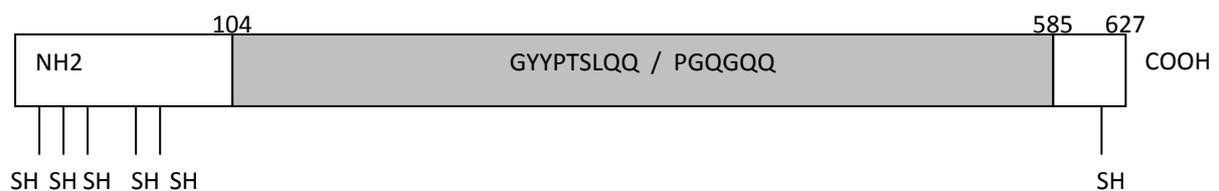


Figure 4: Représentation schématique de la structure primaire des différentes familles de prolamines de blé (Shewry et al., 1994, 2002a). Les cystéines conservées sont numérotées de 1 à 8, les cystéines pouvant former des liaisons intermoléculaires sont marquées par un SH libre.

structure secondaire des prolamines par dichroïsme circulaire montre que le domaine répétitif est riche en coude β alors que le domaine non répétitif est riche en hélice α (Tatham et al., 1990a, 1990b).

2.2.2. Caractéristiques structurales des prolamines

2.2.2.1. Les prolamines riches en soufre

Les α/β -, γ -gliadines et SG-FPM sont formées de deux domaines de grande taille après une région N-terminale courte (6 à 8 résidus). Le premier domaine contient des séquences répétitives spécifiques de chaque type de protéines, le second domaine est non répétitif et contient et contient la totalité des cystéines des α/β - et γ -gliadines et 7 des 8 cystéines des SG-FPM (Figure 4).

a. Les α/β -gliadines

Les α - et β -gliadines sont très souvent assimilées à une seule catégorie car elles sont assez proches d'un point de vue génétique mais aussi structural. Elles représentent 44 à 60% des gliadines totales (Wieser et al., 1994). Elles ont une teneur élevée en proline (15%) et en glutamine (35%) (Tableau 6). Elles possèdent 6 cystéines engagées dans des liaisons intramoléculaires. Müller et Wieser (Müller et al., 1995) ont mis en évidence trois liaisons intramoléculaires similaires à celles contenues dans des SG-FPM. Le domaine N-terminale répétitif contient une majorité de coudes β et formerait une structure en spirale alors que le domaine C-terminale est constitué par une majorité d'hélices α et serait plus compacte (Purcell et al., 1988). Deux motifs répétés ont été identifiés dans le domaine répétitif des α/β -gliadines (PQQPY, QPQFPF).

b. Les γ -gliadines

Les γ -gliadines ont une composition en acides aminés très proche de celle des α/β -gliadines avec une teneur légèrement plus élevée en proline et phénylalanine et plus faible en tyrosine (Figure 4). Elles représentent 30 à 45% des gliadines totales (Wieser et al., 1994). Les γ -gliadines contiennent 8 cystéines et quatre ponts disulfures intramoléculaires. Il a été montré que des protéines ayant des séquences de γ -gliadines pouvaient former des liaisons intermoléculaires avec les gluténines grâce à une cystéine supplémentaire (Köhler et al., 1993, 1994 ; Keck et al., 1995). La structure tridimensionnelle des γ -gliadines serait similaire à celle des α/β -gliadines. Ces protéines sont riches en hélices α (30-35%) situées principalement dans

la partie C-Terminale (Tatham et al., 1985, 1990b). A partir d'une séquence de γ -gliadine, une structure tridimensionnelle hypothétique a été modélisée laissant apparaître trois domaines (D'Ovidio et al., 1995). La partie N-terminale est étendue et flexible (60aa), la partie centrale est faite de boucles lâches (120 aa), et la partie C-terminale est plus compacte à cause de la présence des quatre ponts disulfures (100 aa). Un motif répété a été identifié dans le domaine répétitif (PQQPFPQ) (Shewry et al., 1990).

c. Les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM)

Les SG-FPM représentent 60 à 80% des gluténines totales. Elles ont une composition en acides aminés proche de celle des gliadines mais plus riche en serine et moins riche en acide aspartique et alanine (Tableau 6). Elles peuvent être classées suivant différents critères.

- Selon leur masse moléculaire (Payne et al., 1979 ; Jackson et al., 1983 ; Masci et al., 1993) : une séparation par électrophorèse SDS-PAGE en condition réduite permet de définir trois groupes de SG-FPM : le groupe B pour une masse de 42 à 51 kDa (les plus abondantes), le groupe C entre 30 et 40 kDa et le groupe D entre 60 et 75 kDa (Gianibelli et al., 2001).
- Selon leur séquence N-terminale (Lew et al., 1992) : une analyse des premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale permet de différencier trois familles de SG-FPM : les SG-FPM-s, les SG-FPM-m possédant respectivement une serine et une méthionine comme acide aminé N-terminal et les SG-FPM ayant une séquence N-terminale de type α/β - ou γ -gliadines (Tableau 7).

Quantitativement, les SG-FPM-s sont les plus abondantes, puis viennent les SG-FPM-m et enfin les SG-FPM de type α/β - et γ -gliadines. Les SG-FPM-s appartiennent toutes au groupe B défini par Payne et Corfield (Payne et al., 1979). Les SG-FPM-m appartiennent essentiellement au groupe B. Des séquences complètes ont été déterminées à partir de l'ADN complémentaire pour ces protéines (Okita et al., 1985, Colot et al., 1989 ; Cassidy et al., 1991) et une classification plus précise est faite sur la présence ou non d'une cystéine en position 5. Récemment, de nombreuses séquences ont été identifiées et un autre groupe de SG-FPM avec des séquences N-terminales commençant par une isoleucine a été observé (Ikeda et al., 2002). Ces séquences N-terminales pourraient aussi être des séquences N-terminales tronquées de SG-FPM de type s ou m.

Les motifs PQQQPPFS et QQQQPVL sont présents dans le domaine répétitif des SG-FPM. La structure secondaire des SG-FPM, du fait des homologies de séquence importantes, est

similaire à celle des α/β - et γ -gliadines. Cependant les liaisons disulfures ne sont pas uniquement de type intramoléculaire et certaines cystéines sont engagées dans des liaisons intermoléculaires (Köhler et al., 1994). Les SG-FPM de type α/β - et γ -gliadines se différencient des α/β - et γ -gliadines par une cystéine supplémentaire (Scheets et al., 1988 ; D'Ovidio et al., 1995). Ces protéines seraient en fait des gliadines possédant une mutation d'une arginine ou d'une histidine en cystéine (Lew et al., 1992). Elles pourraient alors agir comme agents de détermination dans la formation des polymères de gluténines (Masci et al., 1995). De même, des SG-FPM du groupe D ayant la séquence d' ω -gliadines avec une cystéine ont été mises en évidence par Masci et al (Masci et al., 1993).

2.2.2.2. Les prolamines pauvres en soufre

Les ω -gliadines représentent de 6 à 20% des gliadines (Wieser et al., 1994). Elles se différencient des autres gliadines par leur teneur très élevée en glutamine (40 à 53%), en proline (20 à 30%) et phénylalanine (9%) du fait de leur séquence presque entièrement constituée par le domaine répétitif, et par la très faible teneur en méthionine et l'absence de cystéine (Tableau 6). Ces protéines ne possèdent donc pas de ponts disulfures. Leur structure secondaire est composée de nombreux coudes β (Tatham et al., 1985) et leur structure tridimensionnelle aurait une forme de bâtonnet (Shewry et al., 1994). Les ω -gliadines peuvent être classées en trois types selon les séquences N-terminales observées pour le blé mais également pour les ω -sécalines (seigle) et C-hordéines (orge), protéines homologues des ω -gliadines. Ces séquences N-terminales sont de type ARE et KEL- et SRL-, selon leurs trois premiers acides aminés (Kasarda et al., 1983, Tatham et al., 1995). ω -gliadines de type ARE seraient les ω -gliadines ancestrales (Tableau 8). Les ω -gliadines de type SRL sont codées par le chromosome 1B alors que les types ARE et KEL, le sont par le chromosome 1D (Tatham et al., 1995 ; Dupont et al., 2000).

Une séquence primaire complète d' ω -gliadines de type ARE a été obtenue par Hsia et Anderson (Hsia et al., 2001). Le domaine répétitif est presque complètement composé de glutamine et de proline sur la base du motif PQQPFPQQ. Les ω -gliadines de type SRL sont caractérisées par différents motifs plus riches en glutamine : QQXP, QQQXP et QQQQXP, X pouvant être soit une phénylalanine, une isoleucine ou une leucine (Dupont et al., 2000). Une autre séquence primaire complète d' ω -gliadines a été récemment déterminée, elle possède une séquence N-terminale légèrement différente (ARHLNPSDQELQS) et contient 30 répétitions des séquences consensus PQQPX, PQQQX et XQQPQQX (Masoudi-Nejad et al.,

2002). Le gène codant pour cette protéine est situé dans le quart distal du bras court du chromosome 1A.

2.2.2.3. Les prolamines de haut poids moléculaire

Les SG-HPM sont les prolamines les mieux caractérisées car de nombreuses études ont établi des corrélations entre la présence de certaines SG-HPM et la qualité boulangère des farines (Shewry et al., 1989, 1992). Leur composition en acides aminés diffère de celle des SG-FPM (Tableau 6). La teneur en résidus hydrophobes susceptibles de participer à des interactions est plus faible. En revanche la grande teneur en glycine augmente la possibilité de liaisons hydrogènes. Les séquences de plusieurs SG-HPM montrent un domaine répétitif très important (440 à 680 résidus sur environ 630 à 830 résidus, Figure 5).

La partie N-terminale est constituée d'un domaine non répétitif composé par une centaine d'acides aminés, contenant trois cystéines (type x) ou 5cystéines (type y). Ce domaine est composé de 26% d'hélice α et 33% de feuillet β à pH 8.2 et il joue un rôle important dans les propriétés de solubilité des SG-HPM (Van Dijk et al., 1997 ; Shewry et al., 2003). La partie C-terminale plus petite et non répétitive (environ 40 aa) peut contenir une cystine supplémentaire (Figure 4). Elle a une structure en hélice α (Tatham et al., 1984). Les motifs répétitifs diffèrent en fonction du type x (GYYP TSPQQ, PGQGQQ, GQQ) ou y (GYYP TSLQQ, PGQGQQ) de SG-HPM (Popineau et al., 1996). Le domaine répétitif est composé de coudes β réguliers qui forment une structure tridimensionnelle de type hélicoïdale (Figure 5) (Shewry et al., 2003). Cette caractéristique structurale pourrait être responsable des propriétés élastiques des SG-HPM (Tatham et al., 2000).

2.2.3. Les albumines et les globulines

Les albumines et les globulines représentent environ 20% des protéines totales de la farine de blé. Elles sont solubles dans les solutions aqueuses (albumines) et salines (globulines). Elles présentent une grande diversité structurale. Les albumines renferment principalement des protéines de structure, des enzymes ou des inhibiteurs d'enzymes et des protéines de réserve comme les albumines de type 2S. Les globulines contiennent en majorité des protéines de réserve et quelques protéines ayant des fonctions physiologiques lors de la maturation de la graine. Les gènes des albumines et globulines du blé ont été assignés aux chromosomes 3, 5, 6 et 7 (Garcia-Olmedo et al., 1982).

2.2.3.1. Les protéines à activité physiologique

a. Les protéines de transfert de lipides

Les protéines de transfert de lipides, appelées LTP pour « lipid transfer protein », font partie de la famille des protéines fixatrices de lipides. Une protéine fixatrice de lipides est une protéine qui est capable de se lier spontanément aux lipides ou aux agrégats de lipides (micelles, structures liquides-cristallines). Les LTPs de blé sont localisées dans la couche à aleurone, mais aussi dans l'embryon. Différents isoformes de LTP de plantes, dites non spécifiques (nsLTP), car capables de transporter différents types de lipides, ont été isolées à partir d'un extrait soluble où elles représentent environ 5 à 10% des protéines solubles totales (Kader, 1996). La présence de ces isoformes suggère que les LTPs de blé appartiennent à une famille multigénique dans laquelle on distingue principalement deux groupes. Le premier est constitué de protéines ayant une masse moléculaire d'environ 9 kDa appelées LTP1, et le second de protéines de masse moléculaire d'environ 7 kDa, nommées LTP2 (Douliez et al., 2000).

Les LTP1s de plantes sont des protéines monomériques, basiques (pI 9) et d'environ 90 aa. Dans la séquence protéique de LTP1, il n'y a pas de tryptophane et la phénylalanine est un résidu rare. Deux tyrosines, très conservées, sont situées à proximité des extrémités N et C-terminales. De plus, toutes les LTPs sont caractérisées par la présence de 8 cystéines très conservées et impliquées dans la formation de 4 ponts disulfures intramoléculaires (Figure 6). La structure tridimensionnelle des LTP1s du grain de blé, d'orge, de maïs et du riz ont été résolues par RMN (Simorre et al., 1991 ; Gincel et al., 1994 ; Petit et al., 1994 ; Heinemann et al., 1996 ; Poznanski et al., 1999) et radiocristallographie (Pebay-Peyroula et al., 1992 ; Shin et al., 1995 ; Lee et al., 1998 ; Charvolin et al., 1999). Ces protéines sont composées d'un seul domaine compact constitué de 4 hélices α reliées par des boucles flexibles reposant sur un fragment C-terminal, ayant une forme originale en saxophone. Le repliement de ces hélices permet la formation d'un tunnel hydrophobe tapissé par les chaînes latérales des résidus hydrophobes des hélices amphiphiles et de la région C-terminale (Figure 7). Cette cavité hydrophobe est partiellement fermée par une extrémité C-terminale mobile. En comparant les structures des différentes LTP1, la taille du tunnel apparaît comme variable d'un isoforme à l'autre (Lee et al., 1998) conférant ainsi aux protéines des propriétés de fixation et de transfert de lipides plus ou moins importantes.

A ce jour la fonction biologique des LTPs reste une énigme. Les LTPs pourraient être impliquées dans le transfert de phospholipides de leur lieu de synthèse jusqu'aux membranes

(Kader, 1996). Cependant les LTPs sont sécrétées ce qui va à l'encontre d'un rôle possible dans le transfert de lipides intracellulaires. Néanmoins, il a été montré récemment que les LTPs pouvaient interagir avec des récepteurs membranaires cellulaires spécifiques de l'élicitrine, petite protéine de 10 kDa fixatrice de lipides sécrétée par un champignon (Oomycètes) (Buhot et al., 2001). Les hypothèses actuelles suggèrent que les LTPs seraient impliquées dans le transport de monomères hydrophobes de la cutine ou encore dans des réactions de défense de la plante contre des pathogènes microbiens (Garcia-Olmedo et al., 1995).

b. Les puroindolines

Les puroindolines sont présentes dans la couche à aleurone et l'albumen amylicé du grain de blé (Dubreil et al., 1998). Cependant leur localisation dans l'albumen est différente de celle des LTPs. En effet, elles sont localisées entre les grains d'amidon et la matrice protéique. Des protéines similaires ont été identifiées dans l'avoine, le seigle et l'orge, mais sont absentes du maïs, riz et sorgho (Blochet et al., 1993 ; Gautier et al., 1994, 2000 ; Tanchak et al., 1998). Ces protéines semblent donc spécifiques des familles *Triticeae* et *Aveneae*. Contrairement aux LTPs, elles ne sont pas ubiquitaires dans le monde végétal. Les puroindolines constituent une famille de protéines capables d'interagir avec les lipides et donc de pénétrer profondément et spontanément dans les bicouches lipidiques. Deux principales isoformes ont été mises en évidence : la puroindoline a et la puroindoline b. Cette famille est également multigénique (Gautier et al., 1994).

Les puroindolines sont des protéines basiques (pI 10), constituées d'environ 115 aa et de masse moléculaire d'environ 13 kDa. Ces protéines possèdent dix cystéines très conservées formant 5 ponts disulfures intramoléculaires. Les puroindolines sont caractérisées par la présence d'un domaine riche en tryptophane (W-R-W-W-K-W-W), situé entre les résidus 39 et 45, qui est à l'origine de leur nom (Blochet et al., 1993). Dans le cas des puroindolines b, ce domaine est tronqué (W-P-Y-K-W-W).

A la différence des LTPs, la structure tridimensionnelle des puroindolines n'a pu être déterminée. Bien que présentant 4 hélices α (LeBihan et al., 1996), elles diffèrent des LTP1s par l'absence d'une cavité hydrophobe et par la présence d'un domaine riche en tryptophanes, qui lors du repliement formerait une boucle d'insertion capable d'interagir avec les membranes. Les résidus cystéines forment un motif particulièrement conservé (C-C-C-CC-CXC-C-C), similaire à celui des LTPs. Deux cystéines supplémentaires, situées de part et d'autre du domaine tryptophane, forment un pont disulfure qui aide à la stabilisation de la

boucle d'insertion. Les autres cystéines ont des connexions similaires à celles des LTPs. En effet, d'autres protéines issues de plantes, telles que les albumines 2S et la protéine hydrophobe du soja, possèdent les mêmes motifs cysteinyls et ont un repliement de type LTPs.

On dispose encore de peu d'informations sur leur fonction biologique. Les puroindolines sont des protéines restreintes à quelques monocotylédones ce qui laisse penser qu'elles doivent remplir une fonction spécifique. En outre, elles possèdent des propriétés techno-fonctionnelles qui les rendent potentiellement intéressantes. Des activités fongicides ont été observées (Dubreil et al., 1997, 1998), probablement liées à leur activité porine (Mattei et al., 1998), mais aussi d'excellentes propriétés tensioactives permettant la stabilisation des mousses et émulsions (Dubreil et al., 1997).

c. Les inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs trypsiques

Dans le blé et l'orge, les inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs trypsiques représentent une famille importante parmi les albumines. Plus de 20 membres différents de cette famille de protéines ont été identifiés (Carbonero et al., 1999). Certains de ces membres ont été extraits sélectivement en présence d'un mélange de chloroforme/méthanol, ce qui leur a valu le nom de protéines CM. Ces protéines peuvent être classées selon leur degré d'agrégation sous forme monomérique, dimérique ou tétramérique. Les inhibiteurs trypsiques sont sous forme monomérique. Des inhibiteurs d' α -amylases d'origine endogène ou exogènes ont été trouvés dans l'albumen de blé (Buonocore et al., 1977). Les inhibiteurs d' α -amylases endogènes inhibent les α -amylases de plantes et de microorganismes tandis que les inhibiteurs d' α -amylases exogènes inhibent les α -amylases d'insectes et de mammifères. Les inhibiteurs d' α -amylases exogènes sont regroupés en trois familles selon leur masse moléculaire qui sont autour de 60 kDa, 24 kDa et 12 kDa (Deponce et al., 1976). La famille des inhibiteurs d' α -amylases de 60 kDa sont des protéines tétramériques dont les sous-unités ont été identifiées comme des protéines CM. Chez le blé hexaploïde, cinq sous-unités ont été identifiées : les sous-unités CM1, CM2, CM3, CM16 et CM17 (Kusaba-Nakayama et al., 2001). Les inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs trypsiques sont codés par une famille multigénique dispersée sur les bras longs et courts des chromosomes 3, 4, 6 et 7 des génomes B et D. (Carbonero et al., 1999 ; Islam et al., 2003). Leur composition en acides aminés est différente des protéines du gluten, ils sont riches en lysine et pauvres en glutamine. Du fait de leur richesse en lysine, ces protéines ont une composition en acides aminés très intéressante pour

la nutrition humaine mais elles sont trop minoritaires dans l'albumen de blé pour compenser le manque en lysine de la farine de blé.

d. β -amylases

Les β -amylases sont des enzymes solubles dans l'eau. Elles ont une masse moléculaire d'environ 60 kDa révélée par électrophorèse en condition réduite. Elles sont codées par les bras longs des chromosomes 4A, 4D et 5A (Loci β -Amy-1). Elles forment des polymères entre elles reliés par des ponts disulfures (Gupta et al., 1991). Un complexe insoluble de gluténines et de β -amylases a été observé par Rothfus et Kennel (Rothfus et al., 1970). Jusqu'à récemment il n'y avait pas eu de confirmation de l'implication de β -amylases avec des polymères de gluténines, mais Peruffo et al. (Peruffo et al., 1996) ont identifié des ponts disulfures entre des β -amylases et des sous-unités SG-FPM. De plus la quantité de β -amylases semble inversement corrélée à la taille des macropolymères de gluténines (Curioni et al., 1996).

2.2.3.2. Les globulines

Les globulines sont présentes dans le germe, la couche à aleurone et l'albumen. Les globulines du blé ont été peu étudiées mais celle du maïs ont été bien caractérisées (Kriz, 1989, 1999 ; Wallace et al., 1991). Ces protéines sont solubles dans les solutions salines et sont séparées selon leur coefficient de sédimentation. Elles sont riches en lysine et arginine mais plus pauvres en tryptophane et en acides aminés amidés (asparagine et glutamine).

Les globulines qui ont un coefficient de sédimentation autour de 7S, ont des séquences similaires à celles des vicilines 7S des légumineuses et autres dicotylédones. Elles ont également des structures et des propriétés similaires (Kriz, 1999). Les globulines 7S de céréales sont localisées premièrement dans l'embryon (Burgess et al., 1986) et dans la couche à aleurone (Shewry, 1995) et ne semblent avoir d'autres fonctions que celles de réserve pour la plante. Leurs rôles ne semblent pas indispensables à la germination ou au développement de la plante (Kriz et al., 1991) ; elles sont éliminées de la farine lors de la mouture. Les globulines 7S sont des protéines mineures de réserve chez les céréales, et elles restent encore peu caractérisées. Les globulines 7S de céréales ont des séquences N-terminales proches de celles des dicotylédones (Heck et al., 1993) et ne semblent pas former de ponts disulfures entre les différents polypeptides (Yupsanis et al., 1990). Elles sont codées par seulement un gène pour le maïs et pour l'orge (Kriz, 1989 ; Heck et al., 1993). Cette propriété est unique chez les protéines de réserve des céréales qui sont généralement codées par une famille

multigénique. Elles sont proches des autres protéines de réserve car elles contiennent un taux relativement élevé de glutamine et d'arginine mais sont pauvres en méthionine et cystéine. Les composants principaux de ces protéines sont des polypeptides de masse moléculaire d'environ 50-55 kDa et les composants minoritaires sont approximativement de 40 et 70 kDa. Le polypeptide de 70 kDa est en très faible quantité chez le blé (Burgess et al., 1986).

Les globulines 11-12S sont localisées dans l'albumen de quelques céréales. Chez l'avoine et le riz ces protéines représentent la fraction majoritaire des protéines de réserve, représentant autour de 70 à 80% des protéines totales. Elles peuvent être comparées aux légumineuses qui sont des globulines importantes chez les dicotylédones. Elles sont appelées « triticines » chez le blé. Ce sont des protéines tétramériques (Singh et al., 1993). Elles sont composées de quatre sous-unités reliées par des ponts disulfures. Elles ont été désignées selon leur masse moléculaire en sous-unité D (58 kDa), sous-unité δ (22 kDa), sous-unité A (52 kDa) et sous-unité α (23 kDa). Les triticines sont codées par les bras courts des chromosomes 1A (locus *Tri-A1*) et 1D (locus *Tri-D1*). Récemment, des gènes codant pour des triticines ont été observés sur le chromosome 1B (locus *Tri-B1*), mais aucune protéine exprimée par ce locus n'a été identifiée, suggérant que ce locus est inactif (Dubcovsky et al., 1997).

2.3. Homologies des séquences et de structures des protéines du blé

Il existe 30% d'homologie entre les séquences des gliadines et des gluténines, 50% entre celles des α/β - et les γ -gliadines et jusqu'à 95% entre celle des différentes SG-FPM. Les prolamines du blé possèdent toutes la même organisation : un court domaine N-terminal dont la séquence est spécifique de chaque famille, suivi d'un domaine répétitif. Chez les ω -gliadines et les SG-FPM, le domaine répétitif couvre la quasi-totalité de la séquence tandis que les α/β , γ -gliadines et les SG-FPM possèdent un important domaine C-terminal non répétitif. Des homologies importantes se rencontrent au niveau des domaines répétitifs (Tableau 9). Les séquences répétitives des α/β - des γ - et des ω -gliadines ainsi que des SG-FPM sont plus riches en prolines. Il semble que ces séquences aient une origine commune. Les motifs répétitifs présents chez les SG-FPM diffèrent et sont plus riches en glycine.

La position de certaines cystéines est conservée dans la structure primaire des α/β - et γ -gliadines et des SG-FPM (Shewry et al., 1994). Les résidus cystéines conservés semblent impliqués dans les liaisons disulfures intramoléculaires. Chez les SG-FPM, il existe deux résidus cystéines supplémentaires disponibles pour la formation de liaisons intermoléculaires (Shewry et al., 1994). Pour certaines gliadines, des mutations conduisant à l'insertion ou à la perte d'une cystéine peuvent faire apparaître un résidu cystéine non apparié et ainsi

transformer une protéine de type monomérique en une protéine à comportement polymérique. Les résidus cystéines conservés ont été identifiés également chez certaines albumines et chez certains inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs tryptiques (Egorov et al., 1996).

Les domaines C-terminaux non répétitifs des α/β - et γ -gliadines et des SG-FPM comprennent trois régions de 20 à 35 résidus. Ces régions nommées A, B et C, contiennent les cystéines et sont séparées par des régions plus variables. Les régions A, B et C, qui montrent entre elles des similitudes de séquences, pourraient provenir de la triplication d'une même séquence ancestrale (Kreis et al., 1989 ; Shewry et al., 1990). Des domaines apparentés à A, B et C existent également chez les SG-HPM, les régions A et B étant situées dans le domaine N-terminal non répétitif et la région C dans le domaine C-terminal. Des séquences similaires à celles des régions A, B et C se retrouvent chez les protéines de réserve d'autres céréales (orge, seigle, maïs) mais également chez d'autres protéines du grain comme les inhibiteurs d'enzymes et certaines albumines et globulines.

Les LTPs de plantes présentent également de nombreuses homologues au niveau des séquences comme le montre l'alignement des séquences primaires de quelques isoformes de LTP1 (Figure 8) cependant elles n'ont aucune homologie avec les LTPs de mammifère. Des homologues de séquences ont aussi été mises en évidence entre les LTPs et les puroindoline.

Les puroindolines de céréales présentent de fortes homologues entre elles, 85% d'homologies pour les puroindolines a, 90% pour les puroindolines b et 60% entre les puroindolines a et b.

Les fortes homologues existant entre les différentes protéines de blé pourraient être le reflet d'un lien de parenté étroit entre les différentes familles qui sont réunies dans la superfamille des prolamines de céréale de plantes (Kreis et al., 1985 ; Shewry et al., 2002a). L'existence de cette superfamille a été proposée pour la première fois en 1985 par Kreis et al sur la base de la comparaison des séquences en acides aminés qui montrent un squelette cystéine conservé de huit résidus cystéines espacés de la façon suivante (Kreis et al., 1985) :

-C-X_n-C-X_n-CC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C

La présence des motifs CC et/ou CXC est assez peu courante et a ainsi facilité l'identification d'un certain nombre des membres de cette superfamille qui par contre, montrent peu ou pas d'identité de séquence. La figure 9 montre un schéma des squelettes cystéines de plusieurs protéines de cette superfamille.

La superfamille des prolamines de céréales est répartie en quatre groupes majeurs :

- les prolamines de blé, d'orge, de seigle et de maïs et les prolamines minoritaires d'avoine, du riz, du sorgho et du millet
- les albumines de réserve 2S
- les protéines de transfert de lipides non spécifiques (nsLTP)
- les inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs tryptiques

Les albumines 2S, les nsLTP et les inhibiteurs de céréales ont peu de similitudes au niveau des séquences primaires, mais elles ont en commun leur petite taille (poids moléculaire entre 7 et 16 kDa) et possèdent une structure tridimensionnelle commune. Cette similarité est apparente dans les trois structures tridimensionnelles présentées dans la figure 10. Ces trois groupes de protéines ont également un rôle de défense pour la plante contre les ravageurs et les pathogènes, au moins dans certains tissus ou espèces (Mills et al., 2003). Elles peuvent donc être également classées dans les PR-protéines (Pathogen Related).

Les homologues de séquences ou de structures sont des données importantes lors de l'étude des allergènes comme nous le verrons dans le chapitre sur les allergènes alimentaires.

2.4. Les différentes formes d'utilisation des protéines de blé

Le blé est couramment utilisé pour l'alimentation humaine. Cela tient au fait que les protéines de réserve (prolamines) du grain de blé ont la propriété unique de pouvoir former, après hydratation, une masse cohérente, insoluble et viscoélastique : le gluten. Les prolamines sont responsables de l'extensibilité (gliadines) et de l'élasticité (gluténines) du gluten. Les applications du blé dérivent des fonctionnalités de ses divers constituants (Tableau 10) (Godon, 1996 ; Damodaran et al., 1997 ; Popineau et al., 2002).

La farine de blé est utilisée dans la fabrication des pains, pâtisseries, pâtes, etc... L'amidon est utilisé natif ou modifié comme fécule, sirop ou épaississant dans l'industrie alimentaire et dans les industries des plastiques, enrobage, fermentation, tandis que le son du grain de blé est utilisé pour ses apports en fibres dans l'alimentation humaine et animale. Le germe peut être transformé en huile et entrer dans la composition de cosmétiques et d'aliments. Le gluten enfin est une des matières protéiques végétales utilisées pour ses qualités d'apport protéique et pour ses fonctionnalités (liant et émulsifiant). Il est valorisé dans de nombreuses applications comme liant et émulsifiant comme principalement dans les produits de panification (amélioration de valeur boulangère) mais aussi parfois dans les plats cuisinés, les aliments diététiques et de régime, les préparations à base de viande ou de produits carnés avec des limitations de concentration dans certains cas et des conditions de dénomination et

d'étiquetage spécifique. Il est également employé dans les produits d'enrobage (médicaments) et dans l'industrie cosmétique (Miletic et al., 1994).

L'hydrolyse est utilisée pour casser la structure des protéines natives et les rendre plus solubles tout en modifiant leurs propriétés fonctionnelles. L'hydrolyse du gluten entraîne donc la perte des propriétés viscoélastiques, la solubilisation des protéines, le développement de propriétés de stabilisation des mousses ou d'émulsions ainsi que des propriétés émulsifiantes (Popineau et al., 1999, 2002). L'hydrolyse des protéines du blé peut être obtenue par différents procédés chimiques (hydrolyse acide ou basique) ou enzymatique. La taille des peptides obtenus est fonction des paramètres d'hydrolyse utilisés (durée, température, rapport enzyme/substrat...) donnant des peptides de fonctionnalité différente en fonction de caractères physicochimiques tels que le poids moléculaire, la taille, la charge ou la teneur en acide aminé hydrophobes ou hydrophiles. Ces hydrolysats de protéines de blé sont utilisés depuis peu dans les cosmétiques en remplacement des protéines d'origine animale (collagène bovin) pour des raisons de sécurité sanitaire. Ils sont incorporés dans les shampoings, après shampoings, ainsi que dans des produits cosmétiques pour leurs propriétés émulsifiantes.

La désamidation apparaît aussi comme un moyen intéressant de modifier les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines du gluten. Ces protéines contiennent en effet, environ 40% de résidus glutamates et aspartates, dont environ 90% sont sous forme amidée. Les protéines du gluten à l'état natif sont très faiblement chargées ; en revanche, une désamidation, même partielle, des résidus de glutamine provoque une augmentation importante de la charge nette des molécules. La désamidation entraîne des changements de conformation des protéines et le déplacement de leur point isoélectrique vers les pH acides, ce qui entraîne une meilleure solubilité dans la zone de pH neutre. Elle peut se faire par voie enzymatique ou chimique (condition acide). Cette dernière a été mise en œuvre à l'échelle industrielle.

Les protéines de blé sont donc utilisées sous différentes formes (natives, modifiées, hydrolysées, désamidées) de plus en plus largement dans l'industrie agroalimentaire. Ces « nouvelles » utilisations s'ajoutent aux utilisations traditionnelles comme le pain, la biscuiterie et les pâtes qui entraînent une forte consommation, fréquente et variée, de protéines de blé. Cette présence de plus en plus importante des protéines de blé dans différents aliments est un réel problème pour les personnes souffrant de troubles liés à la consommation de blé tel que la maladie cœliaque ou l'allergie alimentaire au blé.

II. L'ALLERGIE

Dans les pays développés, plus de 40% de la population peut être affectée par des allergies. Alors que la «première vague» de la maladie allergique (asthme et rhinite allergique) est apparue il ya 50 ans, une "deuxième vague" de l'allergie alimentaire a émergé au cours des 10-15 dernières années (Prescott et Allen, 2011). Les maladies allergiques constituent un problème de santé publique du fait des consultations répétées, de la consommation médicamenteuse et de l'impact des manifestations cliniques, sur la qualité de vie. Pour exemple, le coût annuel des traitements de l'asthme aux Etats-Unis est estimé à 5,8 milliards de dollars dont 5,1 milliards de coûts directs. En France, l'asthme touche 3,5 millions de personnes et son coût global est estimé à 1,5 milliards d'euros. En Algérie, le tiers de la population est allergique. Le pays compte en parallèle 2.5 millions d'asthmatiques et 5 millions de personnes souffrant de rhinite allergique en 2009. Le cout global est estimé à 1.2 milliard de dollars.

1. Les définitions : Petites histoires et Grandes dates

« Vieux comme le monde », est une expression populaire que l'on pourrait utiliser pour les phénomènes d'allergie. En effet, le premier allergique connu aurait été Ménès, Pharaon de la 1ère dynastie en l'an 2650 avant JC. Allergique au venin d'Hyménoptère, il serait mort à la suite d'une piqûre de guêpe. Des personnages célèbres, tels qu'Hippocrate (cinquième siècle avant JC.) et Galen (second siècle après JC.) ont reconnu que le lait de vache ou de chèvre pouvait causer des troubles digestifs et de l'urticaire. Ils marqueront ainsi l'Histoire...de l'allergie.

Mais il faut attendre le début du 20^{ème} siècle pour que le phénomène d'anaphylaxie soit décrit et que l'allergie soit clairement définie. En effet, en 1902, les Français Richet et Portier décrivent l'induction expérimentale d'une hypersensibilité fatale chez le chien. Leurs expériences portent sur l'administration successive à un chien de doses non toxiques de venin d'anémones de mer dans un but de désensibilisation préventive. Cependant, lors de l'injection d'une faible dose de poison, l'animal supporte bien l'agression mais quelques semaines plus tard, lors de la réinjection de la même dose de poison et contrairement aux prévisions, l'animal réagit violemment et meurt. Pour ce phénomène reproductible, ils proposent alors le terme d'anaphylaxie, dérivé des mots grecs « ana » pour contraire et « phylaxis » pour protection.

Dès 1906, le terme « allergie » (*allos*, autre, *ergon*, action) a été défini par Von Pirquet comme « une altération de la capacité de l'organisme de réagir à une substance étrangère ». Cette définition est extrêmement large et inclut différentes réactions immunologiques.

L'allergie est actuellement définie de manière plus restreinte comme « une maladie consécutive à une réponse anormale du système immunitaire à un antigène inoffensif ». Il ne faut pas la confondre avec des réactions toxiques, ni avec des réactions non toxiques mais également non immunologiques (intolérances alimentaires dont l'exemple est l'intolérance au lactose) d'origine pharmacologique, enzymatique ou psychosomatique.

L'Académie Européenne d'Allergie et Immunologie Clinique a défini une nomenclature des réactions adverses aux aliments (Bruijnzeel-Koomen et al., 1995). Les réactions adverses sont définies comme des réactions aberrantes dues à la consommation d'aliments ou d'additifs qui peuvent être d'origine toxique ou non toxique. Les réactions toxiques peuvent avoir lieu chez tous les individus et dépendent de la dose ingérée. Les réactions non toxiques dépendent de la susceptibilité des individus et peuvent résulter de mécanismes non immunitaires (intolérance) ou de mécanismes immunitaires (allergie). Les réactions non immunitaires, ou intolérances, peuvent résulter d'une déficience enzymatique (c'est le cas pour les intolérants au lactose par manque de lactase), d'effets pharmacologiques ou comme dans la majorité des cas d'idiopathie. Les allergies alimentaires peuvent se diviser en deux groupes, celles qui sont médiées par les IgE et celles non médiées par les IgE (Ebo et al., 2001).

2. La classification des réactions allergiques

Les réactions d'hypersensibilité sont divisées en quatre groupes (Tableau 11). En effet, récemment, Rajan (2003) a proposé un cinquième groupe de réaction d'hypersensibilité, non répertoriée dans la classification de Gell et Coombs. Il s'agit d'une stratégie utilisée par l'organisme contre une classe d'agents infectieux aux effets délétères. Cela concerne les agents indigestibles, extracellulaires tels que *Mycobacterium tuberculosis*. Les mécanismes effecteurs, menés par l'immunité innée (cytokines de type 1 ou de type 2), font intervenir la formation de granulosomes qui encapsulent et isolent le pathogène.

3. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'allergie

Une cascade complexe d'événements se déroule entre le premier contact de la muqueuse avec l'allergène et l'apparition des symptômes allergiques liés au deuxième contact avec le même allergène.

3.1. Les IgE et les récepteurs aux IgE

Les IgE sont essentiellement produites au niveau des principaux sites d'infection parasitaire : la peau, les poumons et l'intestin. Les réactions induites par les IgE rencontrées lors de réactions allergiques (inflammation, bronchoconstriction, sécrétion de mucus, vomissements et diarrhées) représentent en fait les changements anatomiques et physiologiques normalement mis en œuvre pour lutter contre les parasites, rôle « normal » des IgE.

La structure générale des IgE est analogue à celle décrite pour les quatre classes d'immunoglobulines. Il s'agit de glycoprotéines composées de 4 chaînes, dont deux chaînes lourdes (type ϵ) et deux chaînes légères réunies par des ponts disulfures, de masse relative 188 kDa, comportant une proportion importante (12%) de résidus glucidiques. Les chaînes lourdes sont composées de quatre domaines constants ($C\epsilon$), le domaine $C\epsilon 3$ permettant la liaison des IgE sur leur récepteur (figure 11).

Les récepteurs aux IgE sont présents sur les cellules effectrices telles que les mastocytes et les basophiles. Il existe deux types de récepteurs aux IgE : un récepteur de forte affinité ($K_a = 10^{10} M^{-1}$), le $RF\epsilon I$, et un récepteur de faible affinité, le CD23 ou $RF\epsilon II$. Le récepteur de forte affinité est impliqué dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, du fait de sa présence à la surface des mastocytes tissulaires et des basophiles circulants, mais il est également présent sur les cellules de Langherans et les éosinophiles. Le CD23 est exprimé par les cellules B, les macrophages, les éosinophiles, les plaquettes, les cellules NK (Natural Killer), les cellules de Langherans et les cellules épithéliales. La concentration sérique des IgE circulantes est faible (de l'ordre de $0,4 \text{ mg.ml}^{-1}$). La demi-vie sérique des IgE est brève (environ 2,5 jours) mais elles persistent beaucoup plus longtemps à la surface des mastocytes sensibilisés.

Un mécanisme de régulation génétique autosomique récessif contrôlerait la transmission de la production d'un taux élevé d'IgE polyclonaux. Les gènes de réponse immunitaire du complexe majeur d'histocompatibilité interviennent dans l'hyperréactivité générale, non spécifique d'antigène, ni d'isotype (David, et al., 1998). Par ailleurs, ils jouent un rôle de coopération au niveau de la production d'anticorps spécifiques. La production d'IgE est modulée de façon positive ou négative par des facteurs d'origine cellulaire (IgE Binding Factors), produits par des lymphocytes T activés. L'IL4 induit l'expression des récepteurs des IgE de faible affinité à la surface des lymphocytes B. Ces récepteurs, après clivage, sont eux-mêmes des facteurs de croissance stimulant les lymphocytes B, sécréteurs d'IgE. Les IgE produites exercent alors une rétroaction négative sur la transformation des récepteurs en facteur de croissance.

3.2. La phase de sensibilisation et la production d'IgE

Le développement d'une allergie se fait en plusieurs étapes (figure 12). La première phase de l'allergie est une phase « silencieuse ». Elle se traduit par la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B à la suite d'un premier contact avec l'antigène, qui est alors défini comme allergène. On parle de phase de sensibilisation. Elle peut avoir lieu pendant la vie intra-utérine (allergènes traversant la barrière placentaire). Elle survient le plus souvent pendant la petite enfance. Cette sensibilisation résulte de la présentation d'un allergène aux lymphocytes T CD4 par des cellules spécialisées dans cette fonction : les cellules présentatrices de l'antigène (les cellules dendritiques et les cellules de Langherans de la peau, par exemple) (Figure 13).

La présentation de l'allergène active les lymphocytes T CD4 qui se différencient en lymphocytes dits Th2 qui produisent des interleukines-4 (IL-4), 5, 6, 9, 10 et 13. L'IL-4 et l'IL-13 contribuent à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et induit une production d'IgE par ces plasmocytes (Figure 14) (Finkelman et al., 1988 ; Punnonen et al., 1993). L'induction d'une réponse Th2 dépend de nombreux facteurs tels que la prédisposition génétique (atopie), l'environnement, l'hygiène...une sensibilisation est une condition nécessaire mais pas suffisante pour qu'une maladie atopique s'exprime (environ 20% des individus ont des signes de sensibilisation –tests cutanés positifs- vis-à-vis d'un allergène donné, sans aucune manifestation clinique). Les IgE fixées sur leur récepteur attendent un second contact avec l'allergène : aucun signe clinique n'est apparent.

3.3. La phase de déclenchement

La deuxième étape est une étape effectrice responsable des manifestations allergiques. Elle survient à l'occasion d'une nouvelle rencontre de l'allergène. Elle se décompose elle-même en deux phases : la phase aiguë et la phase inflammatoire.

- la phase aiguë résulte d'une réaction d'hypersensibilité immédiate. L'allergène interagit avec les IgE préformées fixés sur les récepteurs de haute affinité pour les IgE (RFcεI) sur les mastocytes. Il se fixe au moins par deux épitopes distincts sur deux IgE présentes à la surface membranaire, créant ainsi un pontage des IgE (Figure 15).
Après pontage des IgE par l'allergène les mastocytes libèrent des médiateurs variés (Figure 16), préformés principalement l'histamine ou néoformés (prostaglandines D2, leucotriènes C4, PAF-acéter) synthétisés à partir des phospholipides membranaires (l'acide arachidonique) qui sont responsables de la phase aiguë. Les réactions à

médiation IgE ont généralement une apparition rapide dans les minutes à deux heures à partir du moment de l'ingestion de l'agent inoffensif (Guandalini et Newland, 2011). Ces médiateurs conduisent à l'apparition rapide de signes cliniques de la réaction d'hypersensibilité immédiate, c'est-à-dire une vasodilatation, avec œdème et hypersécrétion muqueuse, et une contraction des muscles lisses (en particulier, bronchoconstriction). (Tableau 12).

Les mastocytes et les basophiles peuvent également sécréter diverses chimiokines et cytokines, notamment l'IL-4 et IL-5, dont la libération engendre respectivement l'infiltration et l'activation des leucocytes, notamment les éosinophiles, responsables de la phase tardive de la réaction allergique.

- La phase inflammatoire est due au recrutement local d'éosinophiles mais également de macrophages, secondaire à la libération de cytokines et de chimiokines par les lymphocytes T CD4, les mastocytes et les basophiles. Cette deuxième phase survient quelques heures après la première. Son expression clinique est inconstante.

III. L'ALLERGIE ALIMENTAIRE

Les allergies alimentaires sont devenues un problème de santé publique à l'égal des allergies respiratoires. En expansion, elles touchent 3 à 5% de la population générale. Les allergies alimentaires sont plus fréquentes chez les jeunes enfants (2 à 8%) que chez les adultes (2%) (Sampson, 2003). Selon un communiqué de presse, les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes chez les enfants algériens, elles concernent 4 à 8 % des enfants de moins de 3 ans en 2010. L'allergie alimentaire peut se traduire par n'importe quel symptôme de l'allergie. Les raisons de cette augmentation peuvent être multiples, notamment la mondialisation des échanges commerciaux, avec pour conséquence une modification des habitudes alimentaires (Monoret-Vautrin et al., 1987), une évolution des techniques et des procédés de transformations des produits alimentaires (Monoret-Vautrin et al., 1998) et une augmentation de la prévalence des réactions aux pneumallergènes polliniques et non polliniques (et donc de la prévalence des réactions croisées aux aliments) (Jaffuel et al., 1996). Même si des centaines d'études épidémiologiques ont été publiées, il est encore difficile de déterminer avec certitude l'allergie alimentaire ce qui montre clairement qu'elle est une préoccupation de santé publique (Sicherer, 2011).

1. La pathophysiologie de l'allergie alimentaire

Le système digestif forme une barrière entre l'environnement extérieur et l'organisme mais fournit également une surface de contact et d'absorption pour les aliments ingérés, indispensable à la vie. Le système immunitaire associé à cette barrière est donc capable de discriminer parmi les protéines étrangères celles qui sont inoffensives de celles qui proviennent d'organismes ou pathogènes dangereux (Figure 17).

Le système immunitaire de la muqueuse intestinale est composé d'un système immunitaire inné et d'un système adaptatif. A l'inverse du système immunitaire systémique, le système immunitaire adaptatif de la muqueuse intestinale est spécialement efficace dans l'inhibition des réponses contre les antigènes non dangereux (tolérance orale) et néanmoins très efficace dans la mise en place rapide d'une réponse à un pathogène. Cependant, l'immaturation de la barrière intestinale et du système immunitaire de la muqueuse chez les jeunes enfants, peut jouer un rôle dans la prévalence élevée d'infections gastro-intestinales et d'allergies alimentaires durant la première année de la vie (Sampson, 1999). En dépit d'une barrière et d'un système immunitaire mature, 2% des aliments ingérés sont absorbés et transportés dans l'organisme sous une forme intacte du point de vue de leur immunoréactivité (Husby et al., 1987). Une étude a montré, à partir de sérums de patients souffrant d'allergie alimentaire, la rapidité avec laquelle les antigènes alimentaires sont absorbés et transportés aux mastocytes intestinaux et cutanés (Brunner et al., 1928). Pour la plupart des individus, les protéines (allergènes) alimentaires traversent le tractus gastro-intestinal et ne sont généralement pas la cause de symptômes cliniques car ils ont acquis une tolérance à leur égard. L'insensibilité des lymphocytes T aux protéines ingérées est le résultat d'un état d'anergie des lymphocytes T ou de l'induction de cellules T régulatrices (lymphocytes T reg, Th3 et Tr-1) (Smith et al., 2000). Les lymphocytes Th3 qui sont générés par les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse, inhibent l'activation des Th1 et Th2 avoisinants permettant la mise en place de la tolérance (Mowat et al., 1999). Les cellules épithéliales et la flore bactérienne de l'intestin jouent un rôle important également dans l'acquisition de la tolérance en éduquant notamment les Th3 (Sudo et al., 1997 ; Mayer., 2000). Le rôle des probiotiques a également été proposé pour participer à la mise en place de cette tolérance (Majamaa et al., 1997 ; Farhadi et al., 2003). De plus des études indiquent que l'allaitement maternel pourrait promouvoir au développement de la tolérance orale et prévenir des allergies alimentaires et des dermatites atopiques (Zeiger, 1995, Jarvinen et al., 2001b). Les réactions d'hypersensibilités alimentaires peuvent se développer chez les individus génétiquement prédisposés quand la tolérance orale

ne s'est pas mise en place normalement ou qu'elle s'est interrompue. La tolérance orale est nécessaire pour le système immunitaire des muqueuses intestinales qui doit analyser et répondre de façon appropriée aux pathogènes commensales et les antigènes alimentaire (Vickery et al., 2012). Verhasselt et al. (2010) ont montré que la présence d'un antigène dans l'alimentation induit une tolérance orale locale et immunitaire systémique à cet antigène. Physiologiquement ce processus est probablement d'une importance centrale pour prévenir les réactions inflammatoires aux nombreux antigènes alimentaires et microbiens au niveau des muqueuses intestinales. La tolérance orale chez les adultes nécessite une exposition à une dose optimale d'un antigène par voie orale, la translocation de cet antigène à travers la barrière intestinale, et sa présentation par présentatrice d'antigène les cellules de lymphocytes T, ce qui entraîne une tolérance spécifique d'un antigène. Une tolérance orale déficiente peut conduire à des maladies inflammatoires intestinales, la maladie cœliaque et les allergies alimentaires (Verhasselt et al., 2010).

2. Une symptomatologie variée

Les différents symptômes retrouvés lors des réactions allergiques alimentaires sont analysées d'après deux revues faisant état de nombreuses études sur ce sujet (Sampson, 1999) (Sampson, 2003) et sont multiples : cutanés (urticaire, oedème localisé, eczéma), respiratoires (asthme, rhinite, gêne laryngée), gastro-intestinaux (vomissements, douleurs abdominales, diarrhée), ophtalmologiques (conjonctivite). L'allergie peut se manifester sous des formes plus graves comme l'oedème de Quincke ou le choc anaphylactique (réactions systémiques généralisées).

2.1. Symptômes gastro-intestinaux

Les symptômes gastro-intestinaux se retrouvent dans un peu plus de 50% des cas d'allergie alimentaire. Ils ont été classifiés en hypersensibilités exclusivement médiées par les IgE, partiellement médiées par les IgE ou exclusivement à médiation cellulaire comme nous le détaillons dans le tableau 13.

2.2. Symptômes cutanés

Les symptômes cutanés se retrouvent dans environ 60% des cas d'allergie alimentaire et sont classifiés selon le même principe que les symptômes gastro-intestinaux (Tableau 14).

2.3. Symptômes respiratoires

Les symptômes respiratoires se retrouvent dans environ 30% des cas d'allergie alimentaire. Les réactions IgE-dépendantes, les plus fréquentes, atteignent les voies respiratoires supérieures (rhino conjonctivite allergique) ou inférieures (asthme, bronchospasme). Pour les réactions mixtes, les symptômes retrouvés sont la toux, la dyspnée et l'éternuement. Pour les réactions non IgE dépendantes, les manifestations les plus courantes sont les pneumonies associées à des infiltrations pulmonaires.

2.4. Anaphylaxies généralisées

Les formes graves d'allergie sont l'anaphylaxie (atteinte simultanée de plusieurs « organes cibles »), le choc anaphylactique (symptômes précédents associés à une chute de la pression sanguine, sensation de mort imminente, troubles neurologiques), les menaces de mort subite et les décès soudains (Fries, 1982 ; Sampson et al., 1992). De nombreux rapports sur les cas d'anaphylaxies, survenues suite à une ingestion alimentaire, montrent l'amplitude du problème (Bock et al., 2001). En France, en 2002, 107 cas d'anaphylaxie sévère ont été enregistrés : 59,8% de chocs anaphylactiques (dont un fatal), 18,7% de réactions systémiques, 15,9% d'œdèmes laryngés et 5,6% d'asthmes aiguës sévères (dont un fatal) (Moneret-Vautrin et al., 2004). Les symptômes cutanés, respiratoires et gastro-intestinaux, s'accompagnent de symptômes cardio-vasculaires (hypotension, collapse vasculaire, dysrythmie cardiaque), probablement induits par une dégranulation massive des mastocytes. Une étude de Bock et *al.* (2001) rapporte ce type de réaction et montre qu'il n'y a pas de différence de fréquence et d'incidence entre les sexes des individus et que l'anaphylaxie alimentaire peut causer le décès dans 30 minutes chez les jeunes adultes ou adolescents. Tous les aliments peuvent être impliqués, avec une nette prédominance de la farine de blé (Kano et al., 2000). Certaines substances comme l'alcool, l'aspirine, les bêtabloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les inhibiteurs de la monoamine oxydase, les antidépresseurs tricycliques et l'infection simultanée sont d'autres facteurs qui peuvent augmenter la sévérité des réactions anaphylactiques ou diminuer l'efficacité de l'épinéphrine (Pumphrey, 2004). D'autres facteurs peuvent influencer sur l'anaphylaxie. L'anaphylaxie induite par l'exercice se produit chez les personnes prédisposées lorsqu'ils ingèrent un aliment déclenchant dans les 2-4 h après un exercice physique (Wang et Sampson, 2007). Ceci est un cas particulier de l'anaphylaxie parce que les symptômes ne se produisent pas en l'absence d'exercice ou si l'alimentation n'est pas ingérée avant l'exercice. Si un mécanisme IgE-dépendant est établi, les

explications physiopathologiques intimes de l'AAIE demeurent incertaines et hypothétiques. Il apparaît toutefois que l'exercice active la transglutaminase tissulaire et forme des complexes avec l' ω_5 gliadine qui ont une forte affinité vis-à-vis des IgE spécifiques expliquant les réactions cliniques (Beaudouin et al., 2006 ; Perkins et al., 2002 ; Palosuo et al., 2001).

3. Les tests de diagnostics de l'allergie alimentaire

La multiplicité des aliments, les réactions allergiques observées et leur caractère parfois subjectif rendent difficiles l'établissement du diagnostic de l'allergie et l'implication d'un allergène précis. La démarche diagnostique comporte donc différentes étapes afin de déterminer l'origine allergique des symptômes et d'identifier le ou les allergènes en cause. L'étape clinique comprend tout d'abord un interrogatoire et un examen clinique. Les manifestations, et notamment une anaphylaxie aigue, consécutives à l'ingestion isolée d'un aliment sont particulièrement évocatrices. Toutefois, dans la majorité des cas, les incertitudes liées aux manifestations et à la rencontre avec l'aliment rendent nécessaires l'utilisation de tests complémentaires aux premières investigations. Il s'agit de l'étape biologique.

3.1. Les tests *in vivo*

L'étude clinique peut ainsi être enrichie par des tests *in vivo* tels que les tests cutanés avec une batterie d'allergènes, ou les tests de provocation ouverts, en simple ou en double aveugle.

3.1.1. Les tests cutanés

Les tests cutanés d'allergie ont pour but d'objectiver la réaction primaire d'hypersensibilité IgE-dépendante au niveau de la peau du sujet sensibilisé. Ils consistent à mettre en contact les mastocytes dermiques avec les allergènes. Si les mastocytes sont porteurs des IgE spécifiques correspondantes, ils subissent une dégranulation provoquant la libération des différents médiateurs chimiques contenus dans les granules. Ce phénomène, très complexe mais rapide, est responsable de modifications cutanées liées à l'inflammation composant la classique triade de Lewis : œdème, érythème et prurit. En pratique, seul l'œdème est pris en considération par mesure de la papule en millimètres.

3.1.2. Les tests de provocation

Le test de provocation apparaît dès lors comme la méthode de référence (« gold standard ») pour confirmer le diagnostic des allergies alimentaires. Il permet d'authentifier l'allergie alimentaire en reproduisant les symptômes cliniques et en précisant la dose réactogène.

3.1.2.1. Test de provocation par voie labiale

Le test de provocation labial utilise les caractéristiques anatomiques des lèvres : importante vascularisation, richesse en mastocytes et faible kératinisation du versant externe (Rance et Dutau, 1997). Il s'agit d'un test de contact de l'aliment avec la muqueuse labiale dont le but est de produire des réactions locales, reflet de l'expression de la réponse IgE à l'allergène. Les stades de positivité sont au nombre de cinq (Rance et Dutau, 1997) :

- Stade 1 : déplissement de la lèvre inférieure
- Stade 2 : plaque d'érythème sur la lèvre
- Stade 3 : urticaire de la joue et du menton
- Stade 4 : œdème gagnant la joue, rhinite, larmoiement
- Stade 5 : réaction systémique, prurit sur la zone d'eczéma, toux, asthme.

3.1.2.2. Test de provocation par voie orale

La place du test de provocation par voie orale est capitale en allergologie alimentaire. Il reproduit l'histoire clinique en respectant le temps, la quantité des aliments (ou doses cumulées réactogènes) et les symptômes. Ces informations évaluent le risque encouru lors de la consommation accidentelle de l'aliment et fournissent des renseignements sur les mesures à prendre (degré d'éviction et composition de la trousse d'urgence). Le test de provocation pourrait aussi permettre d'apprécier la guérison éventuelle de l'allergie (Sicherer, 1999). Les tests de provocation peuvent être réalisés en « ouvert » (l'équipe soignante et le patient connaissent le contenu de la mixture ingérée) ou en « aveugle » (le contenu de la mixture ingérée est connu par l'équipe médicale seule : simple aveugle ou par aucun des intervenants : double aveugle).

3.2. Les tests *in vitro* : le dosage des IgE spécifiques

L'étude clinique peut être confortée par des tests *in vitro* qui tentent de traduire objectivement, par la mesure d'un paramètre sur un échantillon biologique humain, l'état allergique du patient. Ces tests biologiques, sans risque pour le patient, permettent

d'incriminer un allergène particulier au sein d'un aliment. Différents tests biologiques sont utilisés :

- le dosage des IgE spécifiques, isolément ou par groupes, d'un aliment ou d'une protéine donnés.
- les immunoempreintes : elles permettent d'établir la reconnaissance par les IgE spécifiques de protéines séparées sur un gel de polyacrylamide.
- les tests par inhibition : ils permettent de comparer le pouvoir allergénique de deux allergènes différents, mais également, d'établir les réactions croisées entre des allergènes de structure proche.
- les tests d'histamino-libération et de dégranulation des basophiles : ils permettent d'évaluer le potentiel déclenchant de l'allergène et mettent ainsi en évidence la libération de médiateurs, notamment l'histamine, au contact des allergènes.

La technologie des micropuces ou microarray (ISAC) est un composant du diagnostic en permettant l'analyse d'environ 100 allergènes. Il a encore quelques limitations à l'heure actuelle, comme la mauvaise performance de certains allergènes (blé) ou de l'absence de certaines sources d'allergènes. Cependant, dans un proche avenir, il pourrait être appliqué à des études épidémiologiques et d'être utile dans la recherche de réactions croisées (Moneret Vautrin et al., 2011).

4. Caractéristiques générales des allergènes alimentaires

En dépit de l'énorme diversité du régime alimentaire humain, relativement peu d'aliments sont responsables de la plupart des allergies alimentaires. La connaissance des allergènes alimentaires progresse régulièrement, donnant lieu à une première classification des familles de protéines concernées. Ces connaissances sont à la base de la compréhension de la réactivité croisée et des conditions du risque allergique alimentaire.

4.1. Définitions et nomenclature

Les allergènes sont des antigènes reconnus par les IgE et capables d'induire une réponse immunitaire dite « allergique » liée à la synthèse d'IgE spécifiques. Les allergènes alimentaires sont appelés trophallergènes par opposition aux allergènes respiratoires, les pneumallergènes. Les trophallergènes représentent un groupe important des allergènes et sont divisés en deux groupes selon Aalberse (1997):

- Capacité à sensibiliser et induire des réactions chez des individus prédisposés (allergènes alimentaires complets).

- Capacité à seulement induire des symptômes cliniques chez des individus sensibilisés (allergènes incomplets).

Un allergène est dit majeur s'il fait réagir 50% des sujets à cet élément, c'est-à-dire s'il est reconnu par les IgE spécifiques d'au moins 50% des patients testés et s'il donne des tests cutanés immédiatement positifs, à une concentration très faible, chez au moins 90% des sujets. Un allergène est dit mineur s'il n'intéresse environ que 10% des sujets. L'allergène intermédiaire se situe entre ces deux chiffres.

Un isoallergène désigne un allergène de masse moléculaire et de fonction biologique identiques à un autre allergène ayant une homologie de séquence d'acides aminés d'au moins 67%. Ils se différencient par leur point isoélectrique. En effet, la modification de groupements carboxyles ou amino-terminaux transforme ainsi la charge électrique donc le point isoélectrique. Ces isoallergènes sont associés en groupe car toujours reconnus ensemble.

L'allergénicité est le fait de régions peptidiques de la protéine : les déterminants antigéniques ou épitopes. Les épitopes sont les portions de la molécule protéique (antigénique) qui se lient à l'anticorps spécifique et qui sont donc responsables de l'immunoréactivité. Ceux qui réagissent avec les lymphocytes T sont appelés épitopes de type T, ceux qui se lient aux IgE produites par les lymphocytes B, sont les épitopes de type B. un épitope T est constitué de 8 à 9 aa, qui sera présenté au récepteur TCR par une molécule HLA de classe II à la surface des cellules présentant l'antigène (Reizis et al., 1998). Les résidus en position 1, 4, 6 et 9 sont considérés par exemple comme les résidus d'ancrage pour la molécule HLA-DR. La position 1 apparaît critique pour la fixation et est invariablement occupée par des résidus aromatiques ou des résidus aliphatiques (Rammensee et al., 1995). Les épitopes B ont une taille comprise entre 8 et 16 aa (Taylor et al., 1996). Des épitopes réduits à 5 aa ont toutefois été observés pour la farine de blé (Tanabe et al., 1996).

La dénomination de nouveaux allergènes est codifiée par la nomenclature WHO/IUIS, publiée pour la première fois en 1986 (Marsh et al., 1986) et remise à jour en 1994 (Hoffman D et al., 1994). Ces dernières années, les avancées dans la caractérisation et la détermination de séquence d'allergènes ont été rapides, grâce aux approches de la biologie moléculaire. En accord avec la taxonomie, les allergènes sont désignés comme il suit : les trois premières lettres du genre, un espace, la première lettre de l'espèce, un espace et un chiffre arabe. Les chiffres sont donnés par ordre d'identification. Ainsi le premier allergène de l'arachide (*Arachis Hypogaea*) est Ara h 1. Il peut y avoir des précisions, données lors de l'appellation, pour indiquer le genre ou l'espèce exacte.

4.2. Structure

Les trophallergènes sont classiquement décrits comme des glycoprotéines de masse moléculaire variant entre 10 et 60 kDa (Burks et al., 2001) et de points isoélectriques acides. Il n'est pas connu de caractéristiques biochimiques ou immunochimiques uniques propres aux allergènes alimentaires. Cependant quelques caractéristiques biochimiques distinctes peuvent être associées aux protéines reconnues comme étant allergéniques, à savoir que les allergènes alimentaires peuvent être solubles dans l'eau (albumines) ou dans les solutions salines (globulines). En dehors de la masse moléculaire suffisante pour assurer une bonne immunogénéicité et une absorption muqueuse, l'allergénicité d'une protéine dépend également du nombre et des propriétés des épitopes. On distingue les épitopes séquentiels dépendant de l'enchaînement des acides aminés (structure primaire) des épitopes conformationnels dépendant de la structure tertiaire ou quaternaire de l'allergène. Ces épitopes conformationnels sont continus s'ils correspondent à un enchaînement d'acides aminés, ou discontinus s'il s'agit d'un rapprochement spatial de séquences non contiguës. On considère que généralement les épitopes réagissant avec les lymphocytes T sont linéaires. Les épitopes réagissant avec les lymphocytes B sont le plus souvent situés à la surface extérieure de la molécule. Ils peuvent être conformationnels, continus ou discontinus (Bufe, 2001) mais de nombreuses exceptions ont été observées. En effet, les protéines du lait de vache possèdent des épitopes B linéaires, enfouis dans les parties hydrophobes des molécules, et qui ne deviennent accessibles aux IgE qu'après la protéolyse (Wal, 2001). Les épitopes conformationnels sont généralement plus fragiles que les épitopes séquentiels, mais certains épitopes d'Ara h1 situés aux extrémités d'assemblage des monomères en trimères, bien que dépendants de cette structure quaternaire, sont très résistants (Burks et al., 1998 ; Maleki et al., 2000). Des épitopes particuliers sont représentés par des résidus carbohydrates greffés sur le squelette protéique des glycoprotéines, abondantes dans les pollens, les fruits et les légumes (Aalberse et al., 2001). La connaissance de la structure primaire et des épitopes linéaires de nombreux allergènes alimentaire n'a pas permis de dégager des caractéristiques communes d'allergénicité. Des particularités conformationnelles de la surface extérieure des molécules sont envisagées, mais peu de structures tridimensionnelles sont connues. Elles semblent indiquer que le trait commun des allergènes serait une structure globulaire. Un autre élément notable est la fréquence de l'activité enzymatique de ces allergènes (Bredehorst et al., 2001). Récemment Lollier et al. (2011) ont montré que les résidus épitopiques ne sont pas répartis sur la surface spécifique accessible aux anticorps et que dans certains cas ils peuvent couvrir

la séquence antigénique entière. L'analyse *in silico* des allergènes par bioinformatique structurale montre que la conservation de la structure tridimensionnelle de la protéine est nécessaire pour toute évaluation d'une réactivité IgE potentielle pour les nouvelles protéines (John et al., 2005).

4.3. Classification des allergènes alimentaires

Les allergènes alimentaires sont classés actuellement selon la classification biochimique des protéines, en y ajoutant les allergènes de fonctions biologiques connues. Les allergènes végétaux ont été particulièrement étudiés depuis ces dernières années. De nombreuses familles de protéines recèlent des allergènes : protéines de structure, protéines de réserve, protéines liées aux agressions pathogènes (PR-protéines), allergènes enzymatiques et inhibiteurs d'enzyme et trophallergènes variés.

Les tissus des plantes consommées régulièrement renferment un nombre important de protéines dont la plupart sont présentes en petites quantités ou de façon transitoire. En effet, l'analyse moléculaire indique qu'entre 4500 et 8000 gènes sont exprimés lors du développement du grain de blé mais seulement environ 1700 protéines sont identifiées par électrophorèse bidimensionnelle (Clarke et al., 2000). Les composants identifiés et caractérisés sont généralement présents en grande quantité ou ont des propriétés fonctionnelles ou structurales importantes pour la plante. Ces dernières années, les informations disponibles ont fortement augmenté du fait du séquençage des génomes de plantes modèles (exemple : *Arabidopsis*) et également de l'obtention des séquences d'ARN messager (appelées séquences EST) spécifiques de certains tissus. Le développement de bases de données regroupant toutes ces informations et la mise au point de logiciels de traitement permettant d'effectuer des comparaisons de séquences d'acide aminé et de structures des protéines, a permis de déterminer des relations structurales ou d'évolution des allergènes majeurs de plantes.

Un groupe de travail européen a mis en place une base de données (appelée Protall, disponible à l'adresse électronique suivante : <http://www.ifr.ac.uk/PROTALL/cover.html>) sur les allergènes alimentaires de plantes (Mills et al., 2003).

Le tableau 15 montre quelques allergènes alimentaires majeurs de plantes inclus dans cette base de données.

Les différentes comparaisons et analyses montrent que la vaste majorité des allergènes alimentaires de plantes actuellement référencés qui transitent via le tractus gastro-intestinal appartiennent seulement à trois groupes majeurs des protéines de plantes (Mills et al., 2003) :

- la superfamille des prolamines de céréales qui regroupe les albumines 2S, les protéines de transfert de lipide (nsLTP), les inhibiteurs d' α -amylases et inhibiteurs trypsiques, les prolamines de réserve et les puroindolines de céréales. Elles ont en commun des homologies de séquences, la localisation du pattern des cystéines et une structure tridimensionnelle contenant trois ou quatre hélices α .
- la superfamille des cupines, dont la structure tridimensionnelle est basée sur un tonneau β qui regroupe les protéines de réserve de nombreuses graines, et des enzymes. Les cupines les plus étudiées sont les globulines 7S et 11S qui sont largement distribuées dans les graines de monocotylédones et surtout de dicotylédones.
- la superfamille des protéases à cystéine, appelées également protéases C1, est identifiée comme ayant des sites actifs avec des résidus Gln, Cys, His et Asn conservés et incluent de nombreuses peptidases avec des activités exo- et/ou endopeptidases (Rawlings et al., 1993). Elles participent à de nombreux processus dans les plantes comme la sénescence ou la digestion des protéines de réserve durant la germination. Elles peuvent avoir également un rôle de protection de la plante contre les ravageurs et pathogènes. Des allergènes alimentaires de cette superfamille ont été identifiés chez le kiwi (Act c 1) et chez le soja (Gly m Bd 30K) (Ogawa et al., 1993 ; Pastorello et al., 1998).

Récemment, un autre groupe de travail a mis en place une base de données disponible à l'adresse électronique suivante : <http://www.meduniwien.ac.at/allergens/allfam/> sur les allergènes alimentaires d'origine végétale (Radauer et al., 2007). Les allergènes sont répartis en quatre familles qui contiennent près de 60 % de tous les allergènes alimentaires de plantes. Ces familles sont les superfamilles des prolamines, des cupines, des profilines et la superfamille des protéines liées à l'allergène majeur du pollen du bouleau Bet v 1 (Jenkins et al., 2005 ; Radauer et al., 2007).

Le petit nombre de familles de protéines qui contiennent des allergènes et la distribution fonctionnelle étroite de la plupart des allergènes confirment l'existence de facteurs encore inconnus rendant les protéines allergéniques (Radauer, 2008).

4.4. Réactions croisées

La réactivité croisée des allergènes est le phénomène qui se produit lorsque les anticorps IgE dirigés initialement contre des épitopes d'une source allergénique reconnaissent des structures similaires dans une autre source allergénique (Ortolani et Pastorello 2006). Les phénomènes

de réactivité croisée entre des allergènes sont liés à une importante homologie de séquence ou de structure. Les allergènes incriminables dans les phénomènes de réactions croisées sont des protéines fonctionnellement indispensables et donc conservées, à quelques modifications près, au cours de l'évolution. Ce sont donc des protéines ubiquitaires. On les dénomme pan allergènes. Elles entraînent de nombreuses réactions croisées entre des fruits et des légumes phylogénétiquement éloignés, ainsi qu'avec des pollens et le latex. À ce jour, 160 allergènes provenant de 56 plantes alimentaires sont énumérés par l'IUIS (Union internationale des Sociétés d' Immunologie) dans une base de données d'allergènes (<http://www.allergen.org>). Jenkins et al. (2005) a montré que 65% des allergènes alimentaires végétaux appartiennent à seulement quatre familles structurales, la superfamille des prolamines de céréales, les cupines, les homologues de Pet v 1 et les profilines. Cela pourrait conduire à une vaste réactivité croisée des IgE, même parmi les allergènes appartenant à des plantes taxonomiquement éloignées. De plus, la réactivité croisée des IgE liées peut être retenue par 35-40% de la séquence d'acides aminés si la structure conformationnelle est préservée. Cependant, parfois, la réactivité croisée des IgE peut donner de nombreux résultats faux positifs lors des tests de diagnostic. Par conséquent, il est important d'avoir des listes d'aliments qui peuvent donner une réactivité croisée avec un pollen donné ou, pire encore, les aliments contenant l'un des «pan allergènes» (Ortolani et Pastorello 2006). Le tableau 16 donne un exemple sur quelques pan allergènes.

4.5. Les conditions de l'allergénicité alimentaire

De nombreux paramètres peuvent rentrer en jeu pour expliquer l'allergénicité de tel ou tel aliment. Un lien évident existe entre la fréquence et la quantité consommée, et la fréquence des allergies correspondantes. L'allergie alimentaire au riz et au sarrasin est particulièrement fréquente au Japon, par exemple. Cependant, la prévalence d'une allergie alimentaire dans un pays donné peut être influencée par d'autres facteurs. L'arachide, très consommée par les jeunes enfants indonésiens, et beaucoup moins allergisante qu'aux États-Unis ; des modalités culinaires différentes existent (respectivement, bouillie versus grillée), mais peut être également une prédisposition génétique est possible. L'allergénicité d'un aliment ne dépend pas de la teneur en protéines, la pêche ne contient qu'1% de protéines, or l'allergie alimentaire à la pêche est relativement fréquente. Inversement, des protéines présentes en quantité importante, comme l'actine et la myosine des viandes, la protéine Rubisco des plantes ne sont pas allergéniques. L'allergénicité d'un produit alimentaire dépend dans une certaine mesure du taux d'allergène majeur présent. Le risque allergique d'un aliment pourrait dépendre de la fréquence de sensibilisation aux différents allergènes de l'aliment. L'allergénicité pourrait

dépendre également d'une densité optimale d'épitopes à la surface de la protéine, cette dernière pourrait influencer l'affinité de liaison des IgE spécifiques (Bufe, 2001).

IV. LES PRINCIPALES PATHOLOGIES ASSOCIEES AU BLE

Le blé est une source importante de protéines pour l'alimentation humaine, mais, malheureusement, fait partie des six principaux allergènes alimentaires (avec le lait, l'œuf, l'arachide, le soja et le poisson). Les protéines de blé, ingéré ou inhalé sous forme de farine crue ou produits cuits peuvent être responsables des effets indésirables. Ces effets indésirables au blé peuvent avoir un large spectre de manifestations cliniques dues aux différentes voies affectées en tant que: entéropathie au gluten de blé (maladie cœliaque) et les allergies respiratoire, cutanée et alimentaire à la farine de blé (Battais et al., 2008). Les protéines du blé hydrolysées peuvent également être impliquées dans une sensibilisation par contact. C'est rare, mais elles peuvent provoquer une réaction allergique grave (Laurière et al., 2006).

1. La maladie cœliaque ou intolérance au gluten

La maladie cœliaque appelée également intolérance au gluten, est une des maladies gastro-intestinales chroniques les plus fréquentes, sa prévalence est d'environ 0,3 à 1% dans les pays industrialisés (Mowat, 2003) La maladie cœliaque touche environ 1% de la population en Europe, Amérique du Nord et Amérique du Sud, Afrique du Nord et le sous-continent indien (Hischenhuber et al., 2006). Elle est provoquée par l'ingestion d'aliments contenant du blé, du seigle, de l'orge et éventuellement de l'avoine qui entraînent une réponse immunitaire à médiation cellulaire et une réaction inflammatoire au niveau de l'intestin grêle conduisant à une atrophie des villosités intestinales. Cette atrophie perturbe la nutrition du malade, notamment en ce qui concerne l'absorption de certains sucres et acides gras, du fer et de certaines vitamines. Cette pathologie est dépendante de la présence de gluten dans le régime alimentaire et d'un terrain génétique particulier. En effet, plus de 95% des patients souffrants de cette maladie expriment les molécules HLA-DQ2 et HLA-DQ8 (Sollid, 2002).

1.1. Mécanismes cellulaires de la maladie cœliaque

Les mécanismes impliqués dans la détérioration de la muqueuse intestinale sont encore mal connus. L'hypothèse retenue actuellement est un dérèglement du système immunitaire chez certains individus susceptibles. La majorité des malades cœliaques expriment, en effet des molécules particulières du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (DQ2 et DQ8) (Sollid et al., 1989, 2002). La fonction de ces molécules du CMH de classe II est de

présenter de petits peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4+. A l'inverse des sujets sains, les malades cœliaques expriment ces molécules de CMH de classe II au niveau des cellules intestinales. Les changements survenant ensuite au niveau de la muqueuse intestinale, ont vraisemblablement pour origine la sécrétion de cytokines inflammatoires par ces lymphocytes activés (Cornell et al., 1994 ; Skerritt et al., 1994). La maladie cœliaque représente donc probablement une réponse aberrante des lymphocytes T présents dans l'intestin grêle à la libération lors de la digestion de certains peptides de prolamines. La maladie cœliaque est également considérée comme une maladie auto-immune, car les auto-anticorps dirigés contre la transglutaminase enzyme tissulaire (TG2) sont observés chez les patients. Apparemment, la TG2 augmente l'affinité entre les peptides de la gliadine hydrolysés et les molécules de HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 de classe 2 molécules sur les cellules présentatrices d'antigène, par un procédé de désamidation sélective de ces peptides (Hischenhuber et al., 2006).

1.2. Nature des antigènes impliqués

La nature des antigènes stimulants les réponses des lymphocytes T a été le sujet de nombreuses études. Des études sérologiques ont montrées que les anticorps présents dans le sérum des malades réagissaient essentiellement avec les gliadines du blé, de l'orge et du seigle (Skerritt, 1988). Les recherches des dernières années ont essentiellement porté sur les mécanismes immunologiques de la maladie et sur l'identification des épitopes de gliadines capables de stimuler la réponse lymphocytaire T *in vivo* ou *in vitro* (Sturgess et al., 1994 ; Ellis et al., 2003). Différents peptides d' α -gliadines notamment ont été suspectés à partir d'études *in vitro*. Il a été identifié une région (57-75) d' α -gliadines présentant des épitopes immunodominants (Anderson et al., 2000 ; Arentz-Hansen et al., 2000 ; Ellis et al., 2003). Arentz-Hansen et al (Arentz-Hansen et al., 2002) ont récemment montré qu'une large proportion de lymphocytes T CD4+ de malades cœliaques reconnaissait trois peptides chevauchants, riches en proline et glutamine (PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ et PYPQPQLPY), dérivant d'une région α -gliadines reconnue par les anticorps de patients. La fraction gliadine, en particulier α -gliadines sont les polypeptides les plus importants impliqués dans la maladie cœliaque, mais plusieurs peptides de γ -gliadine et gluténines stimulant les cellules T ont été identifiés par spectrométrie de masse ou par criblage de banques de peptides de grande taille (Tollefsen et al., 2006). Camarca et al. (2009) ont constaté que les cellules T intestinales étaient fréquemment et fortement stimulées par un peptide dérivé d' ω -gliadine, DQ2- ω -1 (QPQQPFPQPQQPFPWQP). Les résultats obtenus par Camarca et al. (2009) ont

montré qu'il existe une grande hétérogénéité dans les réponses des lymphocytes T au gluten dans l'intestin et a souligné l'implication de γ - et ω -gliadines dans la pathogenèse de la maladie cœliaque. De plus, les auteurs ont montré que les α -, γ -et ω -gliadines étaient les peptides de gluten les plus actifs dans les DQ2+ des patients cœliaques (Camarca et al., 2009).

2. Réactions d'hypersensibilité au blé

2.1. L'asthme du boulanger

L'AB est une des formes les plus communes d'asthmes professionnels et affecte entre 4 et 10 % des professionnels de la boulangerie en Europe (Weichel et al., 2006). Les patients souffrant d'AB sont principalement sensibilisés à des particules natives de la farine de blé inhalées via la muqueuse respiratoire (Battais, 2007). Plusieurs études ont montré une forte association entre l'exposition aux poussières de farine et de la sensibilisation aux allergènes de blé, mais aucune preuve n'a été trouvée pour l'existence d'un seuil d'exposition et la sensibilisation au blé pour les symptômes liés au travail (Cullinan et al., 2001; Peretz et al., 2005). Dans une étude récente, Jacobs et al. (2008) ont montré que la prévalence de la sensibilisation au blé, les symptômes respiratoires liés au travail et l'asthme a augmenté jusqu'à des niveaux moyens d'exposition au blé d'environ 25-30 g/m³. Le diagnostic de l'asthme du boulanger peut être réalisé avec les prick tests, et la réactivité cutanée est liée à la qualité, la puissance et la standardisation des extraits allergéniques, qui sont souvent mal définis pour les céréales et d'autres allergènes professionnels (Salcedo et al., 2011). Un autre test utilisé pour le diagnostic de l'asthme du boulanger est le SIC (Specific Inhalation Challenge) qui est considéré comme un test étalon (Salcedo et al., 2011). Allergen-specific immunotherapy (SIT) et d'autres traitements immunomodulateurs, tels que les anticorps monoclonaux anti-IgE jouent un rôle important dans le traitement de l'asthme du boulanger.

2.2. L'allergie de contact

La dermatite atopique causée par le blé est un des symptômes cliniques les plus fréquents chez l'enfant associée ou non à des symptômes respiratoires et des problèmes digestifs (Hischenhuber et al., 2006). Plusieurs cas de dermatite de contact causés par le blé ou les protéines qui en dérivent ont été rapportés (Varjonen, 2000a ; Meding et al., 2003). L' α -amylase, une enzyme couramment utilisé dans les additifs de la farine est considérée comme l'une des causes de la dermatite de contact chez les boulangers (Morren et al., 1993). Un allergène de blé de 27 kDa, la peroxydase, et la phosphatase acide pourpre ont été identifiés

comme protéines de blé se liant aux IgE des patients atteints de dermatite de contact (Matsuo, 2010). Les données présentées dans cette étude suggèrent également que les fractions glycosylées dans ces protéines sont impliquées dans la liaison aux IgE de patients (Matsuo, 2010). L'urticaire chronique est rarement due à une allergie alimentaire et très certainement inférieure à 3%. Les allergènes les plus souvent incriminés sont la farine de blé et plus rarement le lait de vache et les viandes (Moneret-Vautrin, 2003). D'après l'expérience nancéenne, sur 11 patients souffrant d'urticaire chronique et dont le test de provocation orale a confirmé l'apparition des symptômes après prise de farine de blé, le régime d'éviction stricte a entraîné dans un délai de 6 à 12 mois une guérison dans sept cas de l'allergie à la farine de blé tout comme celle de l'urticaire chronique. Chez deux patients, l'urticaire chronique est asymptomatique sous éviction et chez les quatre restants, l'urticaire persiste malgré le régime d'éviction (Moneret-Vautrin et al., 2006).

2.3. L'allergie alimentaire au blé

L'allergie alimentaire touche environ 6% des jeunes enfants et de 3-4% des adultes souffrant d'allergies alimentaires (Sicherer et Sampson, 2006). La prévalence de l'allergie alimentaire au blé dans la population générale a été estimée pour les enfants par des tests de provocation orale dans la gamme de 0,2-0,5% des enfants (Zuidmeer et al., 2008). Chez les adultes, la sensibilisation au blé (présence de blé IgE spécifiques dans le sérum) a été estimée entre 0,4 et 3,6% de la population générale (Zuidmeer et al., 2008)

L'allergie alimentaire au blé a été moins étudiée que les allergies alimentaires au lait de vache, à l'arachide ou à l'œuf. Les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire au blé sont assez classiques des allergies alimentaires affectant la peau, le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires (Sicherer, 2000). Elle est présente aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte, mais paraît se manifester par des tableaux cliniques différents. Les symptômes principaux sont la dermatite atopique associée ou non à des symptômes respiratoires et des troubles digestifs chez l'enfant (Sutton et al., 1982 ; Rasanen et al., 1994 ; Isolauri et al., 1996 ; Majamaa et al., 1999 ; Moneret-Vautrin et al., 2000 ; Varjonen et al., 2000b). L'anaphylaxie induite par l'exercice, le choc anaphylactique, l'urticaire récidivante ou chronique (Guinnepain et al., 1996 ; Hanakawa et al., 1998 ; Guenard-Bilbault et al., 1999 ; Morita et al., 2000 ; Lehto et al., 2003). Le blé est introduit dans les régimes alimentaires très tôt, autour de 5 mois après la naissance. Cependant, la sensibilisation peut avoir lieu bien avant par ingestion lors de l'allaitement maternel (Linna, 1996). La présence de gliadines non

dégradées dans le lait des mères allaitantes non soumises à un régime alimentaire particulier (Chirido et al., 1998). La sensibilisation chez les enfants à d'autres aliments comme le lait et l'œuf coexiste fréquemment. Le blé est reconnu comme étant en cause dans de nombreux cas d'anaphylaxies alimentaires induites par l'exercice (Romano et al., 2001 ; Aihara et al., 2002 ; Lehto et al., 2003). Ces formes particulières d'allergies sont difficiles à prédire et à diagnostiquer car les quantités de blé ingérées et le degré d'effort nécessaire pour provoquer les symptômes sont très variables (Varjonen et al., 1997 ; Palosuo et al., 1999 ; Aihara et al., 2002). Les patients avec des allergies alimentaires sont sensibilisés à des protéines ayant subi un traitement thermique et un processus de digestion à travers le tractus gastrointestinal ainsi qu'une absorption à travers l'épithélium intestinal (Battais, 2007). L'histoire naturelle de l'allergie alimentaire est mal connue.

3. Les différents allergènes du blé

La dénomination de nouveaux allergènes est codifiée par la nomenclature WHO/IUIS. Cette base de données d'allergènes (<http://www.allergen.org>) ne contient que les allergènes approuvés et reconnus officiellement. Le tableau 17 est pris à partir de ce site web et inclut tous les allergènes de blé qui sont reconnus.

3.1. Protéines de réserve

Plusieurs études ont montré que le gluten a été impliqué dans des réactions d'hypersensibilité au blé (Battais et al., 2006; Palosuo, 2003; Pastorello et al., 2007 ; Mittag et al., 2004), en particulier la liaison des IgE aux gliadines et gluténines de faible poids moléculaire observée chez les adultes et les enfants ayant une allergie alimentaire au blé (Battais et al., 2003). Les α - et ω -5 gliadines ont été également trouvés comme des allergènes mineurs dans l'asthme du boulanger (Sandiford et al., 1997). Battais et al. (2005) ont réalisé une étude détaillée avec 60 patients, ont montré que différents profils allergéniques peuvent être détectés dans l'allergie alimentaire au blé. En fait, pour les enfants atteints de dermatite atopique, les principaux allergènes sont des protéines solubles et α/β - et γ -gliadines. Les ω -5 gliadines étaient les allergènes majeurs pour les 100% des adultes ayant une anaphylaxie induite par l'exercice et/ou une anaphylaxie, et pour les 55% des patients avec de l'urticaire. Varjonen et al. (2000b) ont montré également que les gliadines sont des allergènes importants chez les patients atteints de dermatite atopique. Des études préalables (Morita et al., 2003 ; Palosuo et al., 2001; Lehto et al., 2003) ont montré que l' ω -5 gliadine (Tri a 19) était l'allergène majeur dans l'anaphylaxie induite par l'effort. Bien que les gluténines de faible poids moléculaire de type B sont

considérées comme un allergène important chez les adultes (Pastorello et al., 2007; Battais et al., 2005) et les enfants (Akagawa et al., 2007) avec l'anaphylaxie et chez les patients atteints de dermatite atopique (Tanabe et al., 1996), les gluténines de haut poids moléculaire ont été considérés comme des allergènes mineurs.

3.2. Protéines solubles

En plus des protéines du gluten, plusieurs protéines de la fraction soluble de blé ont été également identifiées comme des allergènes, parmi ceux-ci: la fructose biphosphate aldolase, l'inhibiteur de sérine protéase (serpine), l'inhibiteur d' α -amylase, LTP, l'acyl-coenzyme A oxydase, et la peroxydase de la farine de blé (Sánchez-Monge et al., 1997 ; Weiss et al., 1997 ; Sander et al., 2011). Le plus important de ces allergènes solubles impliqués dans l'asthme du boulanger sont les inhibiteurs d' α -amylase. Letho et al. (2010) ont montré également que la thaumatine-like protein est un allergène impliqué dans l'asthme du boulanger. Un autre allergène important du blé est la LTP, qui est impliquée dans l'allergie alimentaire (Pastorello et al., 2007; Battais et al., 2005) mais aussi dans l'asthme du boulanger (Palacin et al., 2009). Pastorello et al. (2007) a également identifié d'autres protéines se liant aux IgE de patients souffrant d'allergie alimentaire au blé. Plusieurs d'entre elles (wheat germ agglutinin, peroxydase, serpin, β -amylase, thioredoxin *h* B) ont été signalées comme allergènes dans l'asthme du boulanger tandis que d'autres (globulin, β -purothionin, puroindolines a and b, tritin, granule-bound starch synthase) ont été identifiées dans d'autres études. Akagawa et al. (2007) ont également trouvé des serpines, alors que la β -D-glucan exohydrolase a été trouvé par Šotkovský et al. (2008) par analyse protéomique avec des sérums de patients ayant une allergie alimentaire. Cette diversité pourrait s'expliquer par des différences dans les populations ou dans les différentes approches utilisées pour identifier les protéines se liant aux IgE (Tatham et Shewry, 2008). La figure 18 illustre les différentes classes des allergènes du blé.

L'analyse des effets de la digestion gastro-intestinale sur les protéines de blé et de la capacité de ces protéines natives ou sous formes de peptides à traverser les cellules épithéliales de l'intestin sont des approches également indispensables pour appréhender complètement tous les mécanismes qui entrent en jeu dans l'allergie alimentaire au blé. Sutton et al. (1982) ont montré que le chauffage a diminué l'allergénicité de l'extrait de gluten; Varjonen et al. (1996) ont également montré que les albumines / globulines, les gliadines, hordéines et sécalines de farines de blé, d'orge et de seigle, ont une diminution de la capacité de liaison aux IgE après chauffage. En opposition Simonato et al. (2001) ont montré que l'allergénicité des prolamines

du blé a été augmentée par la cuisson. La réactivité des IgE persiste dans la mie et dans la croûte alors qu'elle est fortement diminuée dans la pâte à pain après digestion. En fonction de la température de cuisson, les protéines de blé peuvent être modifiées de différentes façons et devenir résistantes à la digestion. Une digestibilité réduite des pâtes cuites à très haute température a également été observée par Petitot et al. (2009) probablement due à la formation de protéines hautement agrégées liées par de très fortes liaisons covalentes.

La voie de sensibilisation est importante dans le développement de l'allergie au blé. Les patients souffrant d'asthme du boulanger, sont pour la plupart sensibilisés à des protéines de blé ayant subi des traitements thermiques et la digestion gastro-intestinale puis traversant l'épithélium intestinal (Palosuo, 2003). Ceci peut expliquer les différences apparentes dans la sensibilisation à de nombreux allergènes et que les patients souffrant d'asthme du boulanger tolèrent l'ingestion de pain cuit. Beaucoup de travail reste à faire avant que les allergènes de blé et les épitopes reconnus par les IgE soient tous identifiés. La connaissance de la structure et des propriétés biochimiques et immunologiques des allergènes majeurs du blé est un prérequis pour le développement de nouvelles stratégies pour le diagnostic et le traitement.

V. L'ALLERGENOMIQUE

Le terme «allergénomique" ou allergomique a été proposé comme une application particulière de la protéomique pour identifier les allergènes alimentaires (Yagami et al., 2004 ; González-Buitrago et al., 2007). La première étape dans l'allergénomique, est l'extraction et la solubilisation des protéines à partir de la source allergénique suivie d'une séparation par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE. Des centaines de protéines sont séparées selon la charge (Première dimension) par IEF, puis selon la taille (seconde dimension) par SDS-PAGE. Après les protéines sont transférées sur une membrane, mais, en raison de la nature hétérogène des protéines, le transfert ne peut pas être complet. La deuxième étape est la détection d'antigènes se liant aux IgE par une immunodétection impliquant une incubation de la membrane avec le sérum allergique suivie par une détection par anticorps anti-IgE. Dans la dernière étape, les polypeptides liés aux IgE sont découpés à partir des gels, manuellement ou par robotique spot-picker et hydrolysés par digestion enzymatique. Enfin, les protéines ou peptides fragmentés sont identifiés par spectrométrie de masse puis interrogation de base de données. Après identification et isolement, l'allergène peut être utilisé pour des études immunologiques pour établir ses effets physiologiques. Les approches physico-chimiques comme la technique spectroscopique et RMN peuvent être utilisées pour définir la structure et la conformation de l'allergène (De Angelis et al., 2010). La caractérisation des allergènes

alimentaires est la première étape qui peut aider à identifier les épitopes impliqués dans la sensibilisation et d'expliquer les réactions croisées (Sanchez-Monge et al., 2005). Cette approche peut être utilisée pour identifier les allergènes dans les cultures traditionnelles, les plantes génétiquement modifiées ou également dans les nouveaux aliments; d'ailleurs elle peut aussi être utile pour les approches de sélection et de biotechnologie fondées sur une expression silencieuse des allergènes. La figure 19 illustre les différentes étapes de l'allergénomique.

VI. MODIFICATIONS GENETIQUES ET ALLERGIE

La modification génétique consiste à introduire un nouveau gène dans le patrimoine génétique d'un organisme vivant, afin d'améliorer ses performances agronomiques ou ses qualités nutritionnelles. Actuellement, les transgènes sont des constructions relativement simples : il s'agit souvent d'un gène codant une protéine d'intérêt. Mais il existe déjà des constructions avec deux ou trois transgènes, voire quatre (cas du riz doré). Il est probable que des constructions plus complexes puissent voir le jour à des fins agronomiques (pour obtenir une résistance aux stress abiotiques, notamment). Mais la présence d'un seul transgène peut déjà, à elle seule, entraîner une modification de l'expression de plusieurs protéines (notion de pléiotropisme). La mise au point de plantes génétiquement modifiées (PGM) à visée nutritionnelle pourrait, quant à elle, peut-être impliquer des modifications génétiques plus complexes, et modifier de façon plus importante certaines voies métaboliques, étant donné que le but recherché est de faire varier significativement la composition en nutriments de la plante (par exemple pour réaliser un enrichissement en protéines ou en acides aminés dits indispensables). Si l'on considère les risques potentiels d'allergie qui pourraient résulter d'une MG, on peut donc identifier (Lehrer, 2005) :

- Le risque de provoquer de nouvelles sensibilisations puis de nouvelles allergies au sein de la population, du fait de la présence de nouveaux allergènes dans les aliments et/ou dans le pollen. Ces nouveaux allergènes peuvent être des protéines codées par les transgènes, des protéines "de fusion", des protéines dont l'expression résulte de l'activation ou de l'inactivation involontaire de gènes par la modification génétique.
- Le risque d'induire des allergies croisées dues à une homologie entre ces nouveaux allergènes et des allergènes existants, auxquels certains individus sont déjà sensibilisés ;
- Le risque d'augmenter les sensibilisations d'une part, et d'aggraver les manifestations cliniques de l'allergie d'autre part, du fait d'une sur-expression des allergènes existant en faible quantité dans la plante non GM.

La comparaison d'une plante GM avec la plante non GM la plus proche peut être un outil de l'évaluation sécuritaire. Le but de l'évaluation ne peut pas être d'établir une sécurité absolue, il est de montrer que la PGM est "équivalente en substance" à un témoin isogénique (plante la plus proche obtenue par des méthodes conventionnelles). L'équivalence en substance est estimée en comparant la composition chimique des deux organismes, notamment au niveau des allergènes. Shewry et al. (2007) ont comparé des blés GM avec leurs homologues conventionnels sur quatre ans, et sur deux sites avec des climats contrastés. Les résultats obtenus ont montré que les lignées de blé GM et conventionnel ont des performances agronomique et des propriétés fonctionnelles du grain similaires. En outre, les profils d'expression génique entre les lignées transgéniques et le génotype parental sont plus semblables à ceux des lignées parentales que les profils des lignées produites par la sélection végétale classique. La variation observée sur les profils métaboliques des blés GM et des lignées parentales est similaire à la variation observée entre génotypes cultivés dans différentes conditions environnementales (Shewry et al., 2007). Trois blés GM sur-exprimant les gluténines de haut poids moléculaires et correspondant à des lignées parentales et des lignées non ségrégantes ont été comparés avec l'approche métabolomique afin d'établir leur équivalence substantielle (Baker et al., 2006). Les génotypes ont été cultivés dans deux sites au Royaume-Uni. Une augmentation des niveaux du maltose et/ou de saccharose pour une lignée transgénique est observée. Néanmoins, les différences entre les lignées de control et les lignées GM étaient de même ordre que les différences observées entre les lignes de control cultivées sur différents sites (Baker et al., 2006). L'approche transcriptomique et l'analyse par micro puces ont été effectuées afin d'établir l'équivalence substantielle au niveau de l'expression des ARN entre plusieurs lignées transgénique et conventionnelles de blé tendre, exprimant des gènes supplémentaires codant pour les gluténines de haut poids moléculaire (Baudo et al., 2006). Les auteurs ont montré que la différence dans le profil du transcriptome entre la lignée GM et son génotype non transformé est très faible, alors qu'elle est plus importante dans l'expression des gènes entre les lignées de blé tendre conventionnelles puis entre les lignées transgéniques et non transformées présentant le même complément de sous unités de gluten (Baudo et al., 2006). Ce sont quelques exemples concernant l'évaluation des blés génétiquement modifiés. L'EFSA propose des directives pour l'évaluation de la sécurité des plantes génétiquement modifiées (EFSA, 2010), mais aucune approche validée pour les plantes transgéniques de routine n'est encore disponible.

VII. LES VARIETES HYPOALLERGENIQUES : UN BENEFICE APORTE PAR LES PGM ?

La seule solution actuellement disponible pour prévenir les réactions allergiques est d'éliminer du régime alimentaire du patient le ou les aliments responsables de ces réactions.

Ceci n'est pas sans conséquences lorsque l'aliment est présent dans de nombreux produits transformés : le patient a, de ce fait, un choix diététique réduit, pouvant même engendrer des carences. Sa qualité de vie en est aussi affectée. La transgénèse pourrait également être utilisée comme un moyen de diminuer l'allergénicité d'un aliment. Des recherches ont été menées, notamment au Japon sur le riz et aux Etats-Unis sur le soja, afin de diminuer, voire éliminer les principaux allergènes de ces espèces. Deux grands axes de recherche sont explorés : l'un vise à dénaturer les allergènes de l'aliment afin de diminuer leur caractère allergisant, l'autre consiste à éliminer les allergènes en inhibant l'expression des gènes qui les codent. Au cours des dernières années, la transgénèse a été utilisée pour obtenir des cultures hypoallergéniques, même si à l'heure actuelle aucune culture hypoallergénique n'est disponible dans le commerce (Riascos et al., 2010). Pour l'arachide hypoallergénique, (Rabjohn, 1999 ; Bannon, 2001 ; Li, 2000) ont procédé à la dénaturation des épitopes de trois allergènes de l'arachide Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3 par substitution d'un acide aminé au niveau des épitopes immunogènes. Konan, 2003 et Dodo, 2005 ont utilisé le mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle du gène codant Ara h 2 ou "post-transcriptional gene silencing" pour réduire l'expression d'Ara h 2 dans l'arachide.

Tada et al. (1996) ont tenté de mettre au point un riz transgénique hypoallergénique par inhibition du gène codant un allergène majeur du riz par la technique ARN anti-sens.

Concernant le soja hypoallergénique, Herman et al. (2003) ont cherché à éliminer de la graine la protéine P34, de 30 kDa, un des trois allergènes majeurs de la graine de soja (Ogawa, 2000). L'introduction dans le génome du soja d'un transgène inhibant la traduction du gène codant Gly m Bd 30 kDa a permis d'éliminer de la graine cet allergène (non détectable par les méthodes d'analyse). Une équipe de l'université de Kyoto avait déjà mis au point une lignée hypoallergénique de soja, le Tohoku 124, par sélection génétique (Samoto, 1997 ; Ogawa, 2000).

Dans le pommier hypoallergénique, Gilissen et al. (2005) ont réalisé une inhibition du gène codant un allergène majeur de la pomme Mal d 1 par la technique d'interférence ARN, de façon à obtenir des fruits consommables par la plupart des individus allergiques.

Dans le blé hypoallergénique, Buchanan et al. (1997) ont tenté de diminuer l'allergénicité du blé en traitant la farine de blé à la thiorédoxine h. La thiorédoxine h a la propriété de réduire

les ponts disulfures des protéines riches en cystine (elle convertit les liaisons S–S en SH), Si des allergènes en contiennent, ils sont donc dénaturés et cela peut les rendre plus digestibles. Leur immunogénicité peut donc, théoriquement, être atténuée après action de cette protéine. Le potentiel allergénique de la farine de blé traitée par la thiorédoxine h a été mesuré in vivo chez le chien en pratiquant des tests cutanés. Une diminution significative de la réponse a été observée avec la farine traitée sur 15 des 16 animaux testés (Buchanan, 1997). La thiorédoxine h a dénaturé les gliadines et les gluténines (représentant la plus grande partie de la fraction protéique), mais les résultats ont été moins convaincants sur le reste des protéines (albumines, globulines notamment). Certains sujets allergiques au blé pourraient donc moins réagir avec du blé traité par la thiorédoxine h, ou avec du blé GM dans lequel l'expression de la thiorédoxine h serait augmentée. Quelques publications évoquent la mise au point de blé et d'orge GM dans lesquels des copies supplémentaires du gène codant la thiorédoxine h auraient été insérées (Frick, 1996 ; Cho, 1999 ; Joudrier, 2005). Des lignées dont les grains contiennent plusieurs fois la quantité "normale" de thiorédoxine h auraient ainsi été créées. Cependant, aucune étude ne relate des tests d'allergénicité effectués directement avec ce blé GM sur un modèle animal ou sur des patients allergiques. La thiorédoxine h peut aussi être utilisée pour réduire l'allergénicité d'autres aliments. Une étude a montré qu'elle avait un effet sur deux des allergènes majeurs de l'arachide, Ara h 2 et Ara h 3, et un des allergènes mineurs, Ara h 6 (Yano, 2001). Son effet sur la β -lactoglobuline, allergène majeur du lait de vache, a également été démontré (Del Val, 1999).

Partie I

Diversité génétique des céréales

*Le prêtre persuade les humbles d'endurer leur sort ;
le politicien les incite à se révolter contre lui; et le
scientifique réfléchit à une méthode qui, permettait
de l'améliorer.*

« La science est-elle nécessaire ? » Max F. Perutz

Chapitre 1

**Diversité des gluténines et sécalines dans une
collection de variétés de triticales cultivées en
France**

Préambule

En croisant le blé et le seigle, l'homme voulait combiner les qualités du blé (notamment la productivité, la résistance à la verse, l'aptitude à la panification) à la rusticité du seigle et créer ainsi une céréale avec de multiples potentiels, laquelle un jour pourrait remplacer le blé et le seigle. Si ce dernier a été facilement remplacé par le triticales dans l'alimentation animale, il n'est pas encore envisagé que le triticales puisse remplacer ou du moins égaler le blé surtout dans l'alimentation humaine. Le pain à base de farine de blé fait partie des habitudes alimentaires les plus anciennes et les plus difficiles à changer, d'autre part la farine du triticales et moins apte à former du « bon gluten ». D'un point de vue technologique (propriétés viscoélastiques des pâtes), le pain du triticales est inférieur à celui du blé. Ceci est dû en grande partie à la nature des protéines héritées des deux parents blé et seigle. Ces protéines, appelées souvent « protéines du gluten » ont été largement étudiées chez le blé. Cependant leurs homologues, chez le seigle et le triticales, l'ont été très peu.

Avant de retracer l'origine des variétés de triticales cultivées en France, nous avons procédé dans un premier temps à l'analyse de la diversité génétique des protéines de réserve du triticales hexaploïde dans une collection de variétés de triticales cultivées en France et à l'utilisation des fréquences alléliques de ces protéines au niveau des loci *Glu-1*, *Gli-2* et *Glu-3* pour établir les distances entre les variétés de triticales de différentes origines. L'origine génétique des variétés de triticales cultivées en France est ensuite retracée en comparant les fréquences alléliques au niveau des loci *Glu-1* communs aux trois espèces blé dur, blé tendre et triticales.

Bien que la création du triticales date de seulement un peu plus d'un siècle, le polymorphisme de ses protéines de réserve est grand. Cette variabilité génétique est le résultat du travail des sélectionneurs qui l'ont introduite principalement pour améliorer les performances agronomiques du triticales. Une grande diversité génétique des sous-unités gluténines de haut et faible poids moléculaire (SU-HPM et SU-FPM), des sous-unités sécalines de haut poids moléculaire (SS-HPM), révélées par SDS-PAGE, a été décrite dans une collection représentant les triticales français. Cette diversité a fait ressortir deux grands groupes de triticales cultivés : les triticales du Nord et les triticales du Sud. De plus la caractérisation de ces allèles est un outil intéressant pour l'évaluation des caractéristiques technologiques du triticales. Cependant, pour retracer l'origine du triticales et particulièrement les triticales substitués et/ou transloqués, les marqueurs moléculaires seraient plus utiles.



Available online at www.notulaebotanicae.ro

Print ISSN 0255-965X; Electronic 1842-4309

Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 38 (2) 2010, Special Issue 48-55



Diversity of Seven Glutenin and Secalin Loci within Triticale Cultivars Grown in France

Ines BELLIL¹⁾, Annaig BOUGUENNEC²⁾, Douadi KHELIFI¹⁾

¹⁾ Mentouri University, Faculty of Natural Science and Life, Laboratory of Genetics and Biochemistry Plant Biotechnology, 25000 Constantine, Algeria; bines07@yahoo.fr, dkhelifi@yahoo.fr

²⁾ INRA UMR Genetics Diversity and Ecophysiology of Cereals 234 Avenue Brézé, 63039 Clermont-Ferrand, France; annaigbouguennec@clermont.inra.fr

Abstract

Although the endosperm storage protein of hexaploid triticales have already been analysed, the allelic diversity of glutenins and secalins remains to be described. Analysis by SDS-PAGE of the majority of hexaploid triticales (69 cultivars) grown in France allowed to identify 36 alleles at seven loci: *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Gli-R2*, *Glu-B2*, *Glu-A3* and *Glu-B3*. *Glu-B1* and *Glu-B3* loci were the most polymorphic with 9 alleles each. On the basis of allelic frequencies at the seven loci, genetic distances between hexaploid triticales grouped according to their origins revealed two groups: winter triticales mostly originating from European germplasm and spring triticales essentially of CIMMYT origin. Comparison of allele frequencies between hexaploid triticales cultivars and a world collection of bread (*Triticum aestivum*) and durum (*Triticum durum*) wheat was investigated at *Glu-A1* and *Glu-B1*: only a significant association was found for *Glu-A1* alleles ($\chi^2 = 2.26$, $p = 0.36$) between triticales and bread wheat.

Keywords: polymorphism, rye, storage proteins, triticales, wheat

Introduction

Genetic characterization of storage proteins in the parental species of triticales: hexaploid wheat, tetraploid wheat and rye has been carried out and structural genes of high molecular weight (HMW) glutenins and HMW secalins have been assigned to loci on the long arms of chromosomes 1A (*Glu-A1*) (Lawrence and Shepherd, 1980), 1B (*Glu-B1*) (Bietz *et al.*, 1975), 1D (*Glu-D1*) (Orth and Bushuk, 1974) and 1R (*Glu-R1* or *Sec-3*) (Lawrence and Shepherd, 1981). The gliadins are known to be controlled by genes *Gli-1* and *Gli-2* located on the short arms of groups 1 and 6 of chromosomes A, B and D (Shepherd, 1988) respectively, whereas one omega-secalin and two 40K gamma-secalins are coded at loci *Gli-R1* (or *Sec-1*) (Shepherd, 1968), two omega-secalins at *Gli-R3* (or *Sec-4*) (Carrillo *et al.*, 1992) on chromosome 1RS and 75K gamma-secalins at *Gli-R2* (or *Sec-2*) on chromosome 2RS, (Shewry *et al.*, 1984). The low molecular weight (LMW) glutenins are encoded at *Glu-3* loci (Singh, 1985) and closely linked to *Gli-1* loci (Jackson *et al.*, 1983). In contrast of these two parental species, wheat and rye, their combining product, triticales hybrid, has yet to be investigated sufficiently in this way. A study of unreduced prolamins fractions of eu- and alloplasmic octoploid triticales forms was published using acid-polyacrylamid gel electrophoresis (A-PAGE) and a nomenclature of the prolamins band patterns of the triticales forms was suggested (Rozinek *et al.*, 1998). Another study was undertaken by Brzezinski

and Lukaszewski (1998) who screened a set of 139 lines of hexaploid winter triticales from breeding programs in Europe and North America for their allelic composition at the *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1* and *Gli-R2* loci by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) following Laemmli (1970). They found a high heterogeneity with up to seven different electrophoretic variants per line. Among uniform lines, they were able to localize some secalin bands but their allelic forms were not defined. In response to this lack of information, Amieur *et al.* (2001b) analysed offsprings of ten crosses of hexaploid triticales and identified allelic forms at *Glu-1* and *Glu-3* loci encoding for high molecular weight (HMW) of glutenin and secalin subunits and low molecular weight (LMW) of glutenin subunits respectively.

Storage proteins are important in wheat; they play a major role in breadmaking quality due to their ability to form gluten. Many studies have dealt with this topic (Payne, 1981; Branlard and Dardevet, 1985; Payne, 1987 and for a review see MacRitchie, 1999). Storage proteins are also considered as useful genetic markers and have been widely used for cultivar identification in wheat (Autran and Bourdet, 1975; Pogna *et al.*, 1985; Branlard and Le Blanc, 1985; Vallega and Waines, 1987; Branlard *et al.*, 1989; Metakovsky and Branlard, 1998; Igrejas *et al.*, 1999a). Rye storage proteins are unable to develop a cohesive viscoelastic gluten (Kipp *et al.*, 1996). In addition, its allogamic system makes the identification of cultivars using storage proteins difficult. Consequently, prolamins

of this species have not been investigated to the same extent as those of wheat. Triticale has two forms: primary and secondary one. Primary triticale is the amphiploid derived from the hybridisation of wheat and rye. Secondary triticale is mostly derived from crosses between primary triticales. The secondary hexaploid triticale with the three genomes: A and B from wheat and R from rye is most frequently cultivated. Triticale occupies an intermediate position with a breadmaking quality inferior of that of wheat. Studies have mainly focused on cytogenetics, yield potential and agronomic traits. Nevertheless, some experiments have been undertaken trying to improve its breadmaking quality (Lukaszewski *et al.*, 1987; Hohmann, 1988; Kazman and Lelley, 1996), some others dealt with protein variability (Rubio *et al.*, 1996; Brzenski *et al.*, 1998; Igrejas *et al.*, 1999b).

The aim of the present work was to analyse the genetic diversity of these proteins in a set of hexaploid triticale cultivars grown in France. The allelic diversity observed at the *Glu-1*, *Gli-2* and *Glu-3* loci allowed us to compare our hexaploid triticale cultivars grown in France with other European triticale cultivars according to their country of breeding. On the basis of allelic frequencies at the *Glu-1* loci described in the three species triticale, bread and durum wheat, the involvement of these two latter species in the origin of French triticale is discussed

Material and methods

Material

It has been analysed 69 cultivars of secondary hexaploid triticale grown in France and registered in the official French Catalogue (Tab. 1). Most of the cultivars registered were kindly provided by GEVES (Groupement Expérimentation Variétale et Etude des Semences), France. The cultivars were obtained with kind permission from INRA of Clermont Ferrand, France.

Methods

Protein extraction and SDS-PAGE

Proteins were extracted from a single half seed using the sequential procedure of Singh *et al.* (1991). Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Singh *et al.* (1991).

Protein nomenclature

The nomenclatures of Payne and Lawrence (1983) and Vallega and Waines (1987) were adopted for HMW glutenin subunits. Gupta and Shepherd (1990) and Jackson *et al.* (1996) bread wheat nomenclatures were used for LMW glutenin subunits. For *Glu-R1* and *Gli-R2* loci and the allelic forms at the other *Glu-* loci, the nomenclature proposed by Amieur *et al.* (2001b) was used.

Tab. 1. Allelic composition of the seven following loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Gli-R2*, *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-B2* respectively, found in 69 triticale grown in France

1) a, a, a, c, d, h, b 'Fleurus'	23) b, b, c, a, e, b, b 'Alimac'	45) c, a, a, c, e, b, b 'Vivero'
2) a, b, a, a, a, i, b 'Partout'	24) b, b, c, c, d, d, b 'Agrillac'	46) c, a, a, c, d', k, b 'Amanillo'
3) a, b, c, c, a, h', b 'Auriac'	25) b, b, c, c, a, k, b 'Triveder'	47) c, a, a, c, e, d, b 'Ragrac'
4) a, b, c, c, a, i, b 'Sw Morado'	26) b, b, d, c, a, h', b 'Rhino'	48) c, a, b, c, a, i, b 'Osomo'
5) a, d, d, a, a, i, b 'Grandual'	27) b, b, d, c, e, k, b 'Califomia'	49) c, a, c, c, d, d, b 'Beauval'
6) a, k, b, d, d, h, b 'Tridoc'	28) b, b, c, c, d, d, b 'Trigone'	50) c, a, c, c, a, d, b 'Maximal'
7) a, r, b, c, e, k, b 'Lupus'	29) b, d, b, c, a, h', b 'Balzac'	51) c, b, b, c, a, d, b 'Automnal'
8) a, s, c, c, d, d, b 'Espoir'	30) b, d, c, a, d-f, j, b 'Trouveré'	52) c, b, c, c, d, k, b 'Magnat'
9) b, a, c, c, d, k, b 'Kortego, Passo'	31) b, d, c, c, d, b, b 'Aprim'	53) c, b, c, a, a, h, b 'Precocious'
10) b, a, c, c, a, d, b 'Cedro, Sw Midelo'	32) b, d, c, c, d, i', b 'Trignac'	54) c, b, c, c, a, h', b 'Collegial'
11) b, a, c, a, a, d, b 'Trilogie, Triptic'	33) b, d, d, c, a, b, b 'Stimulus'	55) c, b, c, c, a, d, b 'Gwendal'
12) b, a, c, c, a, h', b 'Triplus'	34) b, f, c, c, d', d, b 'Constant'	56) c, b, c, c, d', h', b 'Seconzac'
13) b, a, c, d, a, d, b 'Trivial'	35) b, k, c, c, e, k, b 'Lamberto'	57) c, b, c, c, f, d, b 'Innoval'
14) b, b, a, c, e, b, b 'Puerto'	36) b, p, b, c, a, i, b 'Delgado'	58) c, b, c, c, a, d, b 'Pivot'
15) b, b, a, c, d, k, b 'Triskell'	37) b, r, c, c, d, k, b 'Bienvenu'	59) c, c, b, c, a, h', b 'Kansas'
16) b, b, b, c, a, h', b 'Bellac'	38) b, r, c, c, a, h, b 'Bilbao'	60) c, d, c, b, c, i, b 'Matinal'
17) b, b, c, c, d, b, b 'Triade, Protignac'	39) b, r, c, c, a, h', b 'Blenio'	61) c, d, c, c, a, h, b 'Tanguy'
18) b, b, c, a, f, j, b 'Tremplin'	40) b, r, c, c, a, d, b 'Sw Talentro'	62) c, d, d, c, a, d, b 'Drwann'
19) b, b, c, c, d', j, b 'Wilfried'	41) b, s, a, c, d, k, b 'Bencicio'	63) c, k, e, c, d', d, b 'Tritikon'
20) b, b, c, c, a, i, b 'Sw Falmoro'	42) b, s, c, a, d, h', b 'Trimour'	64) c, p, d, c, a, i, b 'Bedretto'
21) b, b, c, a, a, h', b 'Floirac'	43) b, s, c, c, a, i', b 'Ticalo'	65) c, r, c, d, d, k, b 'Raboliol'
22) b, b, c, c, a, b, b 'Grenado'	44) b, s, c, c, e, b, b 'Bencetto'	

Statistics

Genetic distances between groups of cultivars were computed using Statistica-6 software. Comparison of allelic frequencies was performed using the χ^2 test.

Results and discussion

Diversity of glutenin subunits and secalin patterns

Most of triticales cultivars were homogenous, only 'Trouvere' showed two diagrams in LMW glutenin subunits. Extensive variability was observed for the HMW glutenins and secalins (Fig. 1).

A total of 17 HMW subunits and four of 75K gamma secalins were revealed from the analysis of different triticales. The majority of the sixty-nine cultivars analysed possessed four to five bands and 42 types of patterns were determined (Tab. 2).

Each diagram was encountered in one to seven cultivars. Concerning the B-LMW subunits, a large variability in patterns was detected (Fig. 1) and 25 diagrams were listed (Tab. 3). The number of cultivars for each diagram of B-LMW subunits varied from one to eleven.

The hexaploid triticales, which is composed from three genomes, has glutenins and secalins which had not as yet been analysed. Although some progenies had rather complex polymorphism, we were able to screen the variability of glutenin subunits and particularly the LMW glutenins encoded on *Glu-A3* and *Glu-B3*.

On the other hand, HMW glutenins and HMW secalins were easily screened. 75K gamma secalins, encoded at *Gli-R2*, were composed by two or three bands: t1 corresponded to the triplet bands and d1 and d2 corresponded to two double bands. The majority of cultivars (79.7%) possessed the triplet t1 (*Gli-R2c*). Only one cultivar, 'Matinal', possessed the two double bands d2 (*Gli-R2b*) and three cultivars, 'Tridoc', 'Trivial' and 'Raboliot', show absence of secalins (*Gli-R2d*).

The results showed that the greatest polymorphism of storage proteins in hexaploid triticales was on chromosome

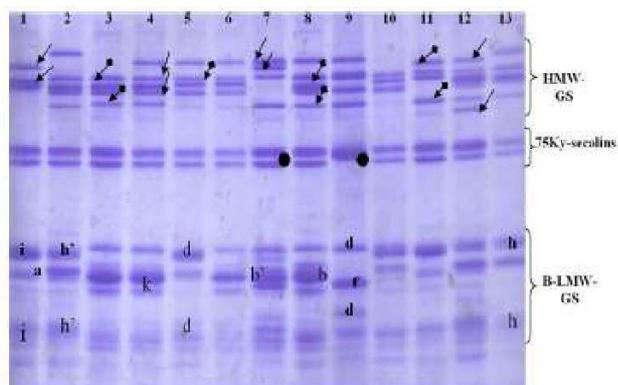


Fig.1. Diversity of storage proteins of triticales grown in France revealed by SDS-PAGE. 1. 'Osorno'; 2. 'Auriac'; 3. 'Dagro'; 4. 'Bienvenu'; 5. 'Cedro'; 6. 'Passo'; 7. 'Domital'; 8. 'Triade'; 9. 'Trouvere' (heterogeneous); 10. 'Beauval'; 11. 'Spatial'; 12. 'Bedretto'; 13. 'Bilbao'. (lanes 3, 7 and 11 triticales cheks) ← *Glu-R1*, ← *Glu-B1*, ● *Gli-R2*

Tab. 2. Allelic composition of HMW glutenin subunits, HMW secalin subunits and 75 gamma-secalins of hexaploid triticales

Cultivar	loci			
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-R1</i>	<i>Gli-R2</i>
1) 'Fleurus'	1	7	1r-4r	t1
2) 'Partour'	1	(7-8)	1r-4r	d1
3) 'Auriac', 'Sw Morado'	1	(7-8)	6r-13r	t1
4) 'Grandual'	1	(6-8)	2r-9r	d1
5) 'Tridoc'	1	22	2r-6.5r	null
6) 'Lupus'	1	(7-18)	2r-6.5r	t1
7) 'Espoir'	1	6.8-20y	6r-13r	t1
8) 'Kortego, Cedro, Passo, Sw Midelo, 'Triplus'	2*	7	6r-13r	t1
9) 'Triologic, Triptic'	2*	7	6r-13r	d1
10) 'Trivial'	2*	7	6r-13r	null
11) 'Puerto', 'Triskell'	2*	(7-8)	1r-4r	t1
12) 'Bellac'	2*	(7-8)	2r-6.5r	t1
13) 'Triade, 'Wilfried', 'Sw Falmoro', 'Grenado', 'Agrillac, Protignac, 'Triveder'	2*	(7-8)	6r-13r	t1
14) 'Tremplin', 'Floirac', 'Alimac'	2*	(7-8)	6r-13r	d1
15) 'Rhino', 'California'	2*	(7-8)	2r-9r	t1
16) 'Trigone'	2*	(7-8)	6.5r	t1
17) 'Balzac'	2*	(6-8)	2r-6.5r	t1
18) 'Trouvere'	2*	(6-8)	6r-13r	d1
19) 'Aprim', 'Trignac'	2*	(6-8)	6r-13r	t1
20) 'Stimulus'	2*	(6-8)	2r-9r	t1
21) 'Constant'	2*	(13-16)	6r-13r	t1
22) 'Lamberto'	2*	22	6r-13r	t1
23) 'Delgado'	2*	(7-8-9)	2r-6.5r	t1
24) 'Bienvenu', 'Bilbao', 'Blenio', 'Sw Talentro'	2*	(7-18)	6r-13r	t1
25) 'Beneficio'	2*	6.8-20y	1r-4r	t1
26) 'Trimour'	2*	6.8-20y	6r-13r	d1
27) 'Ticalo', 'Benetto'	2*	6.8-20y	6r-13r	t1
28) 'Vivero', 'Amarillo', 'Ragtag'	null	7	1r-4r	t1
29) 'Osorno'	null	7	2r-6.5r	t1
30) 'Beauval'	null	7	6r-13r	t1
31) 'Maximal'	null	7	6.5r	t1
32) 'Automnal'	null	(7-8)	2r-6.5r	t1
33) 'Magnar', 'Collegial', 'Gwendal', 'Seconzac', 'Innoval'	null	(7-8)	6r-13r	t1
34) 'Precocius'	null	(7-8)	6r-13r	d1
35) 'Pivot'	null	(7-8)	6.5r	t1
36) 'Kansas'	null	(7-9)	2r-6.5r	t1
37) 'Matinal'	null	(6-8)	6r-13r	d2
38) 'Tanguy'	null	(6-8)	6r-13r	t1
39) 'Diwann'	null	(6-8)	2r-9r	t1
40) 'Tritikon'	null	22	6.5r	t1
41) 'Bedretto'	null	(7-8-9)	2r-9r	t1
42) 'Raboliot'	null	(7-18)	6r-13r	null

Tab. 3. Allelic composition of LMW glutenin subunits of hexaploid triticale

Cultivars	Loci		
	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-B2</i>
1) 'Stimulus', 'Grenado'	a	b	b
2) 'Cedro', 'Trilogic', 'Automnal', 'Sw Midelo', 'Sw Talentro', 'Triptic', 'Trivial', 'Diwann', 'Maximal', 'Pivot', 'Gwendal'	a	d	b
3) 'Bilbao', 'Precocius', 'Tanguy'	a	h	b
4) 'Kansas', 'Rhino', 'Bellac', 'Auriac', 'Blenio', 'Balzac', 'Floirac', 'Triplus', 'Collegial'	a	h'	b
5) 'Partout', 'Osorno', 'Bedretto', 'Sw Palmoro', 'Sw Morado', 'Grandual', 'Delgado'	a	i	b
6) 'Ticalo'	a	i'	b
7) 'Triveder'	a	k	b
8) 'Triadé', 'Aprim', 'Protignac'	d	b	b
9) 'Beauval', 'Agnlac', 'Espoir', 'Trigone'	d	d	b
10) 'Trouveré'	d-f	j	b
11) 'Tridoc', 'Fleurus'	d	h	b
12) 'Trimour'	d	h'	b
13) 'Trignac'	d	i'	b
14) 'Raboliot', 'Kortego', 'Magnat', 'Bienvenu', 'Passo', 'Triskell', 'Beneficio'	d	k	b
15) 'Tritikon', 'Constant'	d'	d	b
16) 'Seconzac'	d'	h'	b
17) 'Wilfried'	d'	j	b
18) 'Amarillo'	d'	k	b
19) 'Alimac', 'Puerto', 'Vivero'	e	b	b
20) 'Beneto'	c	b'	b
21) 'Ragtaç'	c	d	b
22) 'Marinal'	e	i	b
23) 'Lamberto', 'Lupus', 'California'	e	k	b
24) 'Innoval'	f	d	b
25) 'Tremplin'	f	j	b

1B with 9 allelic forms at the loci *Glu-B1* and *Glu-B3*. The most frequent alleles at *Glu-B1* locus were 'b', coding subunits 7-8 (39.1%), and the allele 'a' coding subunit 7 (21.7%). At *Glu-B3* locus the predominant alleles were 'd' and 'k' with 27.5% and 17.4% respectively. Variability was also important at *Glu-R1* with five allelic forms. The most frequent alleles at *Glu-R1* were 'c' (62.3%), 'a' and 'b' (11.6%). At *Glu-A3* five alleles were observed with the predominance of 'a' (49.3%). *Glu-A1* remains the least polymorphic locus with three alleles and 'b' (subunit 2*) was the most frequent (58.0%).

Analysis of B-LMW zone was based on the nomenclature of Gupta and Shepherd (1990) and Jackson *et al.* (1996) who identified many allelic groups of B-LMW glutenins in hexaploid wheat. However, correspondence could be done between *Glu-B3d* according to Gupta and Shepherd (1990) and *Glu-B3a* encoding subunits 2-4-15-19 and identified in durum wheats by Nieto-Taladriz *et al.*

(1997). Studies carried out on some Portugal triticales had revealed that B-LMW subunits of glutenin can be of *T. durum* type (Igrejas *et al.*, 1999).

Allelic diversity of glutenins and secalins

To study the genetic diversity of glutenin and secalin subunits, the proteins encoded at the following seven loci were considered: *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Gli-R2*, *Glu-A3* and *Glu-B2*. They are located on chromosome arms 1AL, 1BL, 1RL, 2RS, 1AS, 1BS respectively. Considering that individual seeds were analysed for each cultivar to determine the corresponding diagrams, only 1 out of 69 cultivars was heterogeneous (1%).

A total of 36 alleles were identified at the seven loci above. On the basis of the genetic diversity found at the seven loci, 65 patterns were established among the 69 triticale cultivars analysed (Tab. 1). 61 patterns were specific of one cultivar each.

At the *Glu-A1* locus, allelic distribution among the 69 cultivars was 58.0% and 30.4% for the two alleles 'b' and 'c' respectively and lower for allele 'a' with 11.6%.

At the *Glu-B1* locus, alleles 'c' encoding for subunits 7-9, 'f' encoding for subunits 13-16 and 'p' for subunits 7-8-9 were rare with respectively 1.4% and 2.9%. Otherwise, the most frequent alleles were *Glu-B1b* and *Glu-B1a* encoding for the 7-8 and 7 subunits with 39.1% and 21.7% respectively.

At *Glu-R1* locus, subunits 6'-13' encoded by *Glu-R1c* were predominant (62.3%). The less frequent alleles were *Glu-R1d* (2'-9') observed only in six triticale cultivars (8.7%) and *Glu-R1e* (6.5') found only in four lines (5.8%).

At the *Gli-R2* locus we observed with low frequency one allele: *Gli-R2b* encoded only in one triticale cultivar (1.4%). The most frequently observed allele was *Gli-R2c* (r1) (79.7%). Moreover *Gli-R2a* was found in ten cultivars (14.5%) (Tab. 2). The 75K gamma-secalins encoded at the *Gli-R2* locus were absent in 3 triticale cultivars (4.3%). This absence could be due to a possible 2D/2R substitution in triticales. To answer this question, the triticale cultivars showing no 75K gamma-secalins will be checked using wheat microsatellite markers located on the chromosome 2D from wheat. The results will allow us to conclude that absence of 75K gamma-secalins in some triticales of the collection was due to the substitution *SD/2R* previously named *Gli-R2d*. Amplification of the microsatellites mapped on chromosome 2D also will indicate that no recombinant occurred between chromosomes 2D and 2R.

Using the bread wheat nomenclatures proposed by Gupta and Shepherd (1990) and Jackson *et al.* (1996) for LMW glutenin subunits, we were able to identify 15 LMW subunits of the 69 cultivars.

The *Glu-B3d* allele was frequent in the collection (27.5%). Otherwise, the less frequent alleles were the null

Tab. 4. Allelic frequencies per locus per country where triticale cultivars originated

Locus	Origin and number of cultivars									
	FR	POL	GE	CH	SW	IT	PT	UK	SP	MX
	69	24	15	10	7	8	5	3	21	4
<i>GLUA1</i>										
a (1)	11.6	20.8	06.7	30.0	/	25.0	40.0	66.7	47.6	75.0
b (2*)	58.0	58.3	60.0	30.0	71.4	25.0	/	33.3	09.5	/
c (null)	30.4	20.8	33.3	40.0	28.6	50.0	60.0	/	42.9	25.0
<i>GLUB1</i>										
a (7)	21.7	/	/	/	/	/	/	/	/	/
b (7-8)	39.1	16.7	06.7	10.0	/	/	/	33.3	04.8	/
c (7-9)	1.4	04.2	/	/	/	/	/	/	04.8	/
d (6-8)	13.0	20.8	33.3	20.0	14.3	12.5	20.0	33.3	/	/
e (20)	/	/	/	/	/	/	/	/	04.8	/
f (13-16)	1.4	/	20.0	10.0	/	25.0	/	33.3	19.1	50.0
IV (23-18)	/	/	/	/	12.5	/	/	14.3	/	/
k (22)	4.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/
p (7-8-9)	2.9	/	/	/	/	/	/	/	/	/
r (7-18)	8.7	50.0	06.7	30.0	42.8	37.5	/	/	19.1	25.0
s (6.8-20y)	7.2	08.3	33.3	30.0	42.8	12.5	80.0	/	33.3	25.0
<i>GLUR1</i>										
a (1r-4r)	11.6	12.5	06.7	10.0	28.6	/	/	/	/	/
b (2r-6.5r)	11.6	16.7	33.3	/	/	12.5	20.0	/	/	/
c (6r-13r)	62.3	66.7	40.0	80.0	71.4	75.0	80.0	66.7	76.2	50.0
d (2r-9r)	8.7	04.2	20.0	/	/	/	/	33.3	/	/
e (6.5r)	5.8	/	/	/	/	/	/	/	/	/
f (0.8r-6r)	/	/	/	10.0	/	12.5	/	/	19.1	50.0
g (5.8r)	/	04.8	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>GLJR2</i>										
a (d1)	14.5	/	/	60.0	14.3	50.0	100.0	/	52.4	25.0
b (d2)	1.4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
c (t1)	79.7	95.8	93.3	40.0	85.7	/	/	100.0	04.8	/
d (null)	4.3	/	06.7	/	/	50.0	/	/	42.9	75.0
e (t2)	/	04.2	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>GLUA3</i>										
a	49.3	12.5	33.3	40.0	14.3	25.0	60.0	33.3	42.8	25.0
d	27.5	62.5	40.0	50.0	42.8	50.0	40.0	33.3	42.8	25.0
d'	7.2	/	/	10.0	/	25.0	/	/	14.4	/
e	13.0	20.8	26.7	/	28.6	/	/	/	/	50.0
f	2.9	04.2	/	/	14.3	/	/	33.3	/	/
<i>GLUB3</i>										
b	11.6	04.2	/	/	/	25.0	20.0	/	/	25.0
b'	1.4	16.7	20.0	/	14.3	12.5	20.0	/	28.6	/
d	27.5	08.3	33.3	80.0	/	25.0	60.0	33.3	47.6	75.0
h	7.2	4.2	/	/	/	25.0	/	33.3	14.3	/
h'	15.9	/	/	/	/	/	/	/	04.8	/
i	11.6	37.5	46.7	/	28.6	/	/	/	04.8	/
i'	2.9	/	/	/	/	/	/	33.3	/	/
j	4.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/
k	17.4	29.1	/	20.0	57.1	12.5	/	/	/	/
<i>GLUB2</i>										
a	/	/	/	10.0	/	/	/	/	/	/
b	100.0	100.0	100.0	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

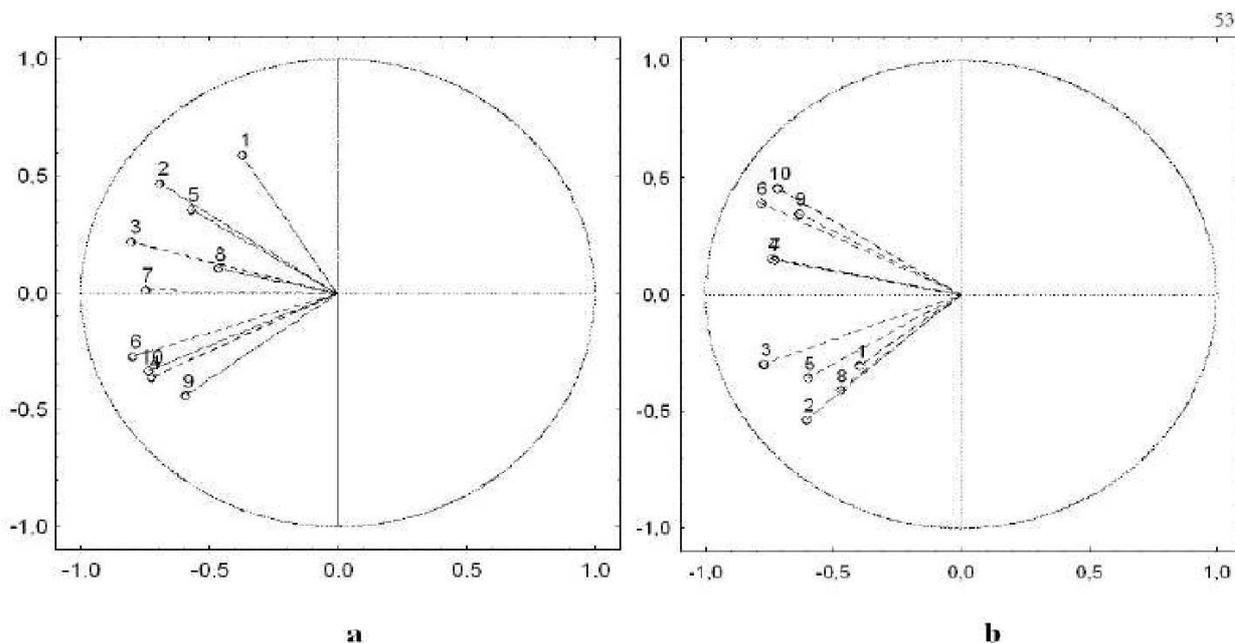


Fig. 2. Genetic distances between groups of cultivars originating from different countries including; a) The six following loci: *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-B2*; b) the same loci plus *Gli-R2* locus. 1- France; 2- Poland; 3- Germany; 4- Switzerland; 5- Sweden; 6- Italy; 7- Portugal; 8- Great Britain; 9- Spain; 10- Mexico

allele 'j' and the allele 'i' which were observed only in three and two cultivars (4.3% and 2.9%) respectively.

Concerning *Glu-A3*, 76.8% of the collection analysed can be characterized by only 2 alleles: *Glu-A3a* and *Glu-A3d* found in 49.3% and 27.5% of the cultivars respectively. The three other alleles 'd', 'e' and 'f' were less common. The *Glu-B2* locus was less polymorphic with one allele: the *Glu-B2b* which was predominantly present.

Genetic distances

Frequencies of the alleles encoded at seven loci were calculated for our triticale cultivars grown in France and for each country of origin of triticale cultivars tested by Amieur *et al.* (2001a) (Tab. 4).

These frequencies permit us to compute genetic distances between groups of cultivars according to their origins including our collection of triticale cultivars grown in France. The clustering was particularly influenced by two loci: *Gli-R2* and *Glu-B3*. Allelic variation at *Gli-R2* allowed us to distinguish 2 groups: group '1' characterized by allele *Gli-R2c* coding for triplet t1 and mainly present in British, Polish, German, Swedish and French cultivars (percentage between 79 and 100%) and group '2' where two forms were predominant: *Gli-R2a* coding for doublet d1 very common in Portuguese, Swiss, Italian and Spanish samples (between 50 and 100%) and the null form (absence of secalins named *Gli-R2d*) present only in five countries, particularly in Italian, Spanish and Mexican cultivars with high frequency (Tab. 4). A *Gli-R2* effect was

evidenced in the comparison of the two graphics presented in (Fig. 2). Concerning *Glu-B3*, the effect was less obvious: we observed allele 'd' more frequent in Swiss, Mexican, Portuguese and Spanish cultivars.

Our division into two groups agreed with the classification based on morphological and agronomic traits made on triticales by Royo (1995) and agreed with the classification made by Amieur *et al.* (2001a) based on the comparison between hexaploid triticale cultivars according to their country of breeding. Group '1' (Great Britain, Poland, Germany, Sweden and France) was developed from European germplasm, which is mostly of winter type. Group '2' characteristic to the south countries of Europe has two origins: Spanish cultivars derived from Iberian material using tetraploid wheat (Sanchez-Monge, 1996) and CIMMYT germplasm containing essentially spring type with two distinct pools: 'complete' triticale with complete rye genome and 'substituted' triticale with 2D/2R substitution.

Comparison of allele frequencies

Although they are of a complex origin, most triticale cultivars have been developed from hexaploid and/or tetraploid (durum) wheat crossed with rye. In order to improve our understanding of triticale origin, we compared allelic frequencies at loci having the same allelic nomenclature for the two parental species of triticale: bread and durum wheat (Branlard *et al.*, 1989) (Tab. 5).

At the *Glu-A1* locus the three alleles were observed in the three species with a significant relationship between triticale and bread wheat ($\chi^2 = 2.26$, $p = 0.36$). At *Glu-B1*

Tab. 5. Comparison of allele frequencies at the *Glu-A1* and *Glu-B1* loci between triticale cultivars registered in the French Catalogue and a world collection of bread and durum wheats

Origin	Loci														
	<i>GLU-A1</i>			<i>GLU-B1</i>											
	a	b	c	a	b	c	d	e	f	k	p	r	s	IV	
	1	2*	nul	7	7-8	7-9	6-8	20	13-16	22	7-8-9	7-18	6.8-20y	23-18	
Triticale cultivars	11.6	58.0	30.4	18.2	36.4	1.1	15.9	/	2.3	3.4	2.3	10.2	10.2	/	
Bread wheat cultivars ¹	28	28	44	19	20	27	19	5	1.5	/	/	/	/	/	
Durum wheat cultivars ¹	7	4.6	83.5	0.8	25.9	/	23.6	33.5	5.5	/	/	/	/	3.4	

¹ From Branlard *et al.*, 1989

locus, 4 alleles out of 11 were common to the three species. Nevertheless, some particularities were observed: the very common allele of bread wheat *Glu-B1c* (7-9) which is absent in durum wheat and the allele *Glu-B1IV* (23-18) observed in durum wheat but not in bread wheat, were both present and absent in triticale respectively. In spite of this, there were no significant statistical relationships between the three species for *Glu-B1* locus.

As expected, the absence of any significant association between the three species for *Glu-B1* reflects the complex origin of this man-made cereal. However, the allelic identity outlined above could only be used to trace the origin of some triticale cultivars.

Conclusions

Analysis of hexaploid triticale has been a useful means of investigating the genetic diversity of these cereal storage proteins. In spite of its being a new species and therefore with a short existence, triticale shows a high polymorphism for its storage proteins. This is due to the genetic variability introduced by breeders via various routes in order to increase the agronomic performance of secondary triticale. Genetic diversity of HMW and LMW subunits of glutenins and secalins, as revealed by SDS-PAGE, enabled us to describe a large set of triticale cultivars grown in France. This allelic identification could be a powerful tool in studying the respective effects of glutenin and secalin subunits dealing with variations in the technological characteristics of triticale.

The frequency of alleles which correlate with good bread-making quality, *Glu-A1a*, *Glu-A1b* and *Glu-B1b* was high in our triticale cultivars. However, factors like low gluten content, inferior gluten strength mainly due to the lack of D genome, presence of R genome and high level of α -amylase make triticale often unsuitable for breadmaking quality (Varughese *et al.*, 1996). Efforts to solve these problems are undertaken in many triticale breeding programs. Genetic diversity of triticale storage proteins could be of a high interest in the breadmaking quality improvement. In addition, the numerous possible allelic combinations within the extent of variation observed would be useful tool for the identification of pure lines and hybrids.

Other molecular markers would be very useful for tracing the genomic structure, particularly in triticales carrying substitutions and/or translocations.

References

- Amiour, N., A. Bouguennec, C. Marcoz, P. Sourdille, M. Bourgoin, D. Khelifi and G. Branlard (2001a). Diversity of seven glutenin and secalin loci within triticale cultivars grown in Europe. *Euphytica* 123:295-305.
- Amiour, N., M. Dardevet, D. Khelifi, A. Bouguennec and G. Branlard (2001b). Allelic variation of HMW and LMW glutenin subunits, HMW secalin subunits and 75K gamma-secalins of hexaploid triticale. *Euphytica* 123:179-186.
- Autran, J. C. and A. Bourdet (1975). L'identification des variétés de blé: établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grains. *Ann Amélior Plantes* 25(3):277-301.
- Bietz, J. A., K. W. Shepherd and J. S. Wall (1975). Cereal single kernel analysis of glutenin: use in genetics and breeding. *Cereal Chem* 52:513-532.
- Branlard, G. and D. A. Le Blanc (1985). Les sous-unités gluténines de haut poids moléculaire des blés tendres et des blés durs cultivés en France. *Agronomie* 5: 467-477.
- Branlard, G. and M. Dardevet (1985). Diversity of grain protein and bread wheat quality. 2. Correlation between molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. *J. Cereal Sci* 3:345-354.
- Branlard, G., J. C. Autran and P. Monneveux (1989). High molecular weight glutenin subunit in durum wheat (T. durum). *Theor Appl Genet* 78:353-358.
- Brzezinski, W. and A. J. Lukaszewski (1998). Allelic variation at the Glu-1, Sec-2 and Sec-3 in winter triticale. In: P. Juskiew (Ed.), *Proc 4th Int Triticale Symp*, Alberta, II:6-12.
- Carillo, J. M., J. F. Vázquez and J. Orellana (1992). Identification and mapping of the Gli-R3 locus on chromosome 1R of rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 84:237-241.
- Gupta, R. B. and K. W. Shepherd (1990). Two-steps one dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theor Appl Genet* 80:65-74.

- Hohmann, U. (1988). Direct use of hexaploid wheat in production of hexaploid triticale. In: T. E. Miller and R.M.D. Koebner (Eds.), *Proc 7th Int Wheat Genet Symp*, Cambridge, England, p. 303-308.
- Igrejas, G., H. Guendes-Pinto, V. Carnide and G. Branlard (1999a). The high and low glutenin molecular subunits and ω -gliadin composition of bread and durum wheats commonly grown in Portugal. *Plant Breed* 118:297-302.
- Igrejas, G., H. Guendes-Pinto, V. Carnide and G. Branlard (1999b). Seed storage protein diversity in triticale varieties commonly grown in Portugal. *Plant Breed* 118: 303-306.
- Jackson, E. A., L. M. Holt and P. I. Payne (1983). Characterization of high molecular weight gliadins and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal location of their controlling genes. *Theor Appl Genet* 66:29-37.
- Jackson, E. A., M. H. Morel, T. Sontage-Stroh, G. Branlard, E. V. Metakovsky and R. Redaelli (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.
- Kazman, M. E. and T. Lelley (1996). Can breadmaking quality be introduced into hexaploid triticale by whole-chromosome manipulation? In: H. Guendes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (Eds.), *Triticale Today and Tomorrow*, p. 141-148. Kluwer Academic Publ, Netherlands.
- Laemmli, U. K. (1970). Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lawrence, G. J. and K. W. Shepherd (1980). Variation in glutenin protein subunits in wheat. *Aust. J. Biol. Sci* 33:221-233.
- Lawrence, G. J. and R. W. Shepherd (1981). Chromosomal location of genes controlling seed proteins in species related to wheat. *Theor Appl Genet* 59:25-31
- Lukaszewski, A. J., B. Apolinarska and J. P. Gustafon (1987). Introduction of D-genome chromosomes from bread wheat into hexaploid triticale with a complete rye genome. *Genome* 29:425-430.
- MacRitchie, F. (1999). Wheat Proteins: Characterization and role in flour functionality. *Cereal Food World* 44:188-193.
- Metakovsky, E. V. and G. Branlard (1998). Genetic diversity of French common wheat germplasm based on gliadins alleles. *Theor Appl Genet* 96:209-218.
- Nieto-Taladriz, M. T., M. Ruiz, M. C. Martinez, J. F. Vázquez and J. M. Carillo (1997). Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theor Appl Genet* 95:1155-1160.
- Orth, R. A. and W. Bushuk (1974). VI Chromosomal location of genes coding for subunits of glutenin of common wheat. *Cereal Chem* 51:118-126.
- Payne, P. I. and G. J. Lawrence (1983). Catalogues of alleles of the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high molecular subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res Commun* 11:29-35.
- Payne, P. I. (1987). Genetic of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. *Ann Rev Plant Physiol* 38:147-153.
- Payne, P. I., K. G. Corfield and J. A. Balckman (1981). Correlation between the inheritance of certain high molecular weight subunits of glutenin and breadmaking quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J Sci Food Agri* 32:51-60.
- Pogna, N., F. Milleni and A. Dal Berlin Puroffo (1985). The role of PAGE in varietal identification and in developing new varieties of durum wheat with good spaghetti-making quality. In: *Durum Wheat Symp*, Foggia, Monograf Genet Agric 7:199-212.
- Royo, C., C. Soler and I. Romagosa (1995). Agronomical and morphological differentiation among winter and spring triticales. *Plant Breed* 114:413-416.
- Rozinek, B., T. Gunther and C. U. Hesemann (1998). Gel electrophoretic investigations of prolamins in eu- and alloplasmatic octoploid primary triticale forms. *Theor Appl Genet* 96:46-51.
- Rubio, P., N. Jouve, C. Soler and A. Bernardo (1996). Isoenzymes and endosperm protein markers in the determination of chromosomal constitution in *X Triticosecale wittmack*. In: H. Gudes-Pinto, N. Darvey & V.P. Carnide (Eds.), *Triticale Today and Tomorrow*, p. 409-415. Kluwer Academic Publ, Netherlands.
- Sanchez-Monge, E. A. (1996). A retrospection on triticale. In: H. Guendes-Pinto, N. Darvey and V. P. Carnide (Eds.), *Triticale Today and Tomorrow*, p. 73-81. Kluwer Academic Publ, Netherlands.
- Shepherd, K. W. (1968). Chromosomal control of endosperm proteins in wheat and rye. In: *Proc. 3rd Int Wheat genet symp*, Canberra, Australia.
- Shepherd, K. W. (1988). Genetics of endosperm proteins in wheat: in retrospect and prospect. In: *Proc 7th Int Wheat genet symp*, Cambridge, England.
- Shewry, P. R., D. Bradberry, J. Franklin and R. P. White (1984). The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamins storage proteins (secalins) of rye. *Theor Appl Genet* 69:63-69.
- Singh, N. K. (1985). The structure and genetic control of endosperm proteins in wheat and rye. Ph. D. Thesis, University of Adelaide, Australia.
- Singh, N. K., K. W. Shepherd and G. B. Cornish (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J Cereal Sci* 14:203-208.
- Vallega, V. and J. G. Waines (1987). High-molecular-weight glutenin subunit variation in *Triticum turgidum* var. dicoccum. *Theor Appl Genet* 74:706-710.
- Varughese, G., W. H. Pfeiffer and R. J. Pena (1996). Triticale: A Successful Alternative Crop (Part 2). *Cereal Foods World* 41:635-645.

Chapitre 2

**Variabilité des sous unités gluténines de haut
et de faible poids moléculaire des blés durs
botaniques**

Préambule

L'espèce *Triticum turgidum ssp durum* s'est différencié dans trois centres secondaires différents qui sont le bassin occidental de la méditerranée, le sud de la Russie et le proche Orient. Chaque centre secondaire donna naissance à des groupes de variétés botaniques aux caractéristiques phénologiques, morphologiques et physiologiques particulières. Cette diversification morphologique a été mise à profit en sélection. La recherche de nouvelles formes alléliques au sein des blés anciens, apparentés et sauvages demeure, désormais, une nécessité. Pour cet objectif plusieurs techniques biochimiques et moléculaires ont été mises en oeuvre. De nombreuses investigations ont montré que les blés anciens, autochtones et ceux qui sont étroitement liés aux blés cultivés possèdent une variation allélique considérable de composition de SG-HPM et SG-FPM. La connaissance des caractères biochimiques est l'un des moyens les plus utilisés pour l'évaluation des ressources phylogénétiques. Les sous unités protéiques révélées par ces techniques constituent des empreintes génétiques permettant de distinguer entre espèces, variétés et mêmes accessions.

A travers cette étude, nous avons estimé la variabilité génétique des gluténines d'une collection de 17 populations botaniques, de blé dur local, comprenant 856 accessions collectées en Algérie. Cette collection représente un échantillon important de ressources génétiques de blé dur ancien collecté en Algérie. Ce blé a été cultivé extensivement pendant plusieurs centaines d'années. Durant cette longue période, ces espèces ont acquis une considérable diversification encouragée par la diversité des climats et les croisements spontanés menant à une vaste diversité génétique des variétés.

Les analyses électrophorétiques ont permis de montrer une grande variabilité allélique. Un total de 35 différents allèles est identifié au niveau des cinq loci étudiés. Trois nouveaux allèles sont détectés, 2 au Glu-B1 codant pour 4 nouvelles sous unités de HPM et un au Glu-B3 codant pour des sous unités de FPM.

La combinaison entre la variabilité allélique des gluténines détectée et certains caractères morphologiques et géographiques des accessions nous ont permis de réduire la collection composée de 856 accessions à seulement 21 accessions composant une core collection représentative de toute la variabilité. Rassembler une core collection est l'un des moyens les plus efficace dans les processus d'évaluation de la diversité génétique et un moyen pour réduire les coûts des recherches et faciliter la mise en valeur des allèles d'intérêt qui pourraient être utilisés dans les différents programmes de sélection.



Available online at www.notulaebotanicae.ro

Print ISSN 0255-965X; Electronic 1842-4309

Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 38 (2) 2010, Special Issue, 22-32



Genetic Variation and Geographical Diversity for Seed Storage Proteins of Seventeen Durum Wheat Populations Collected in Algeria

Wahiba HAMDI¹⁾, Ines BELLIL¹⁾, Gérard BRANLARD²⁾, Douadi KHELIFI¹⁾

¹⁾ *Mentouri University, Faculty of Nature and Life Sciences, Laboratory of Biochemical Genetics and Plant Biotechnology, 25000 Constantine Street, Algeria; dkbelifi@yahoo.fr; bines07@yahoo.fr; hamedi_ouahiba1@yahoo.fr*

²⁾ *INRA U.M.R. 1095 GDEC UBP, 234 Avenue Brézet Street, 63039 Clermont-Ferrand, France; branlard@clermont.inra.fr*

Abstract

Variation in the HMW and LMW glutenin subunits of a collection of 856 accessions of botanic durum wheat collected in Algeria and divided *a priori* according to their agronomical and morphological traits in 17 populations were analyzed using SDS-PAGE. Among the 16 alleles identified at the *Glu-1* loci, two were new. The first named *Glu-B1i₁*, encoding for two bands located between 17 and 18 which was assigned the nomenclature 17₁ and 18₁. The other named *Glu-B1e₁*, codes two bands similar to 20x and 20y but with faster mobility, which were named 20x₁-20y₁. At *Glu-3* and *Glu-2* loci, 19 alleles were identified, where the allele named *Glu-B3ab* (encoding for subunits 2-8-9-13-16) was considered as new. Global genetic diversity index (H) was relatively high (0.34). A final core collection of 21 accessions was selected. All the different geographical areas and the allelic diversity at the *Glu-1*, *Glu-2* and *Glu-3* polymorphic loci were represented in this core which represents a minimum of wheat Algerian genetic resources that could be used for dedicated breeding programs.

Keywords: Algerian botanic durum wheat, core collection, glutenin subunits, SDS-PAGE, variability

Introduction

In the mid-nineteenth century, Mendel and later other pioneering plant geneticists provided knowledge of plant genetics that made it possible to dramatically increase the production potential of agriculture. However, the wonders of crop improvement have undeniably resulted in the erosion of genetic diversity of many cultivars. Similarly to what has happened in many other crops, the advent of new and homogenous wheat varieties led to the progressive abandonment of the locally adapted, unimproved and genetically more diverse landraces and botanic old cultivars (Reif *et al.*, 2005). In some instances, these biological resources have been lost due to ignorance or late realization of their importance. To prevent further erosion, large collections and gene banks have been compiled. But given the fact that diversity should be usable by and accessible to breeders, its quantitative and qualitative evaluation and knowledge of its genetic structure are preconditions for the definition of plant improvement strategies and for the management of genetic resources. The study and evaluation of these large collections and their distribution over a wide range of agro-climatic environments will definitely increase our knowledge of the genetic diversity of the crop. It will also help identify geographical regions as potential donors of desirable traits for breeding purposes. Durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) represents only approximately 8% of the wheat production worldwide and

90% of its production has its origin in the Mediterranean region (Ammar *et al.*, 2000). In Algeria, *T. turgidum* ssp. *durum* Desf. em. Husn. is grown much more widely than *Triticum aestivum* L. This crop has been cultivated extensively for many centuries. During this long period, the species has undergone considerable diversification encouraged by the notable diversity of climates which resulted in the very wide genetic diversity of the species. Certain agronomic and morphological traits have already been used to describe the genetic diversity of durum wheat collections (Cecarelli *et al.*, 1987; Van Hintum and Elings, 1991). Biochemical markers like storage proteins whose polymorphism has already been described, offer the opportunity to analyze genetic diversity independent of environmental influences (Nakamura, 2001). Biochemical, genetic and molecular aspects of high and low molecular weight glutenin subunits have received a great deal of attention in recent years due to their importance in determining the flour processing properties of cultivated wheat. The first studies of the molecular aspects of quality in the world wheat collections revealed low variability for some protein components with a clear influence on bread making performance (Shewry *et al.*, 1989). For this reason, the search for species that could contribute genes for quality improvement is of great importance in most wheat breeding programmes (Jauhar, 1993). Genetic resources of good quality wheat germplasm are crucial to sustaining global wheat production now and in the future. Wheat

germplasms embody a wide range of genetic diversity that is critical to enhancing and maintaining the quality potential of wheat, as they provide new sources of allele quality. The new alleles detected can be studied to determine their value in improving the quality of wheat. The concept of the core collection was introduced by Frankel and Brown (1984) with the aim of minimizing costs and improving the exploitation of the gene banks. A core collection is a limited sample resulting from a vaster collection that is selected to represent genetic diversity as well as possible uses.

The objective of this study was to evaluate the polymorphism of high and low molecular weight glutenin markers of a large number of samples of *Triticum durum* collected in Algeria with the aim of selecting representative samples to create a core collection and to provide information needed for plant breeding programmes. Understanding the composition of high and low molecular weight glutenin subunits will promote the use of wheat germoplasm in the development of cultivars.

Materials and methods

Plant material

A total of 856 accessions of durum wheat collected in Algeria were analyzed for high and low molecular weight glutenin alleles. These accessions were collected jointly by the Technical Institute of Field Crops (Constantine, Algeria) and the International Center for Agricultural Research in Dry Areas (Aleppo, Syria), during the year 1988-1989. The accessions originated from different regions of Algeria were grouped *a priori* into 17 varieties according to their agronomical and morphological traits (Tab. 1). The germoplasm is currently being conserved by ICARDA. The study of morphological characters of the 17 populations was carried out at the agricultural experimental station of the Technical Institute of Field Crops (ITGC) in Khroub, during the 1995/1996, 1996/1997, 1997/1998 agricultural campaigns (Boudour, 2005).

Protein extraction, separation and nomenclature

Proteins were extracted from the brush of kernels following the sequential procedure described by Singh *et al.* (1991) and were separated using Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) at an acrylamide concentration of 10.8% according to the method of Singh *et al.* (1991). High Molecular Weight Glutenin (HPM-Glu) alleles were identified using the nomenclature of Payne and Lawrence (1983) completed by Branlard *et al.* (1989) and Low Molecular Weight Glutenin (LMW-Glu) alleles were identified using the nomenclature of Nieto-Taladriz *et al.* (1997). The new subunits and alleles identified were designated according to McIntosh *et al.* (2008). Some standard hexaploid and

tetraploid varieties were included to compare and classify the subunits detected.

Statistical analyses

The frequency of glutenin alleles at each glutenin locus was calculated for the genotypes belonging to each population and for the whole collection. Genetic diversity was evaluated through the *D*-index (Weir, 1996), according to the following expression: $D_i = 1 - \sum p_{ij}^2$, where p_{ij} is the proportion of the j^{th} allele at locus i^{th} . Roger's distances (Roger, 1972) were calculated on the allele frequency matrix. Cluster analysis was performed using BIOSTAT-1.

Results

Tab. 2 summarizes the allelic composition and frequencies of the HMW and LMW glutenin subunits encoded by the *Glu-1* and *Glu-3* loci respectively.

Fig. 1 shows the profiles of subunits in some accessions. In our interpretation of the results, the alleles with frequencies less than 5% were defined as rare in order to compare the distribution of alleles within and between different populations (Caballerro *et al.*, 2004).

Allelic variation at Glu-1 loci

At *Glu-1* loci encoded for HMW-GS, each locus contains two tightly linked genes (Harberd *et al.*, 1986) encoding subunits designated x- and y- type based on their molecular weights and biochemical characteristics (Payne *et al.*, 1981). However, because of the silencing of some genes, only one to three HMW subunit genes are expressed in different durum wheat accessions: one or two subunits are always expressed by the *Glu-B1* locus, and one or none (the null allele) by the *Glu-A1* locus. When only one subunit is expressed by *Glu-B1* or *Glu-A1* loci, this is always the x type (Shewry *et al.*, 2003). In these loci, up to 16 allelic forms were found. Four different alleles were detected at *Glu-A1* and 12 at *Glu-B1*. Although four alleles were observed at the *Glu-A1* locus, the null allele (*Glu-B1c*) was found in most genotypes of all populations studied (97.78%). The *Glu-A1a* allele (encoding subunit 1) which appeared at a lower frequency (1.05%) was considered to be rare (Caballerro *et al.*, 2004); it was present in one genotype of each one of the following populations: 'Obscurum', 'Fastuasum', 'Melanopus', 'Murciense', 'Lencomelan' and in two genotypes of the 'Reichenbachi' population. The *Glu-A1b* and *Glu-A1VI* alleles (encoding the 2* and 2*** subunits respectively) were also considered as rare, as each was only present in two genotypes of two populations among the 17 populations analyzed.

At the *Glu-B1* locus, a total of 12 alleles were detected of which two alleles and three bands have not been previously described. The *Glu-B1e* allele (encoding the subunit pair 20x/20y), *Glu-B1d* (subunits 6-8) and *Glu-B1f* (sub-

Tab.1. Local Algerian durum wheat accessions included in the study

Variety	Genotype identifier ^a
1) 'Apulicum' (3)	IG6884, IG6355, IG6356
2) 'Africanum' (3)	IG5805, IG5806, IG5808
3) 'Obscurum' (3)	IG7752, IG7755, IG7756
4) 'Algeriense' (6)	IG6766, IG6775, IG6778, IG6781, IG6782, IG6795
5) 'Fastuosum' (6)	IG10228, IG11049, IG11944, IG11945, IG 12202, IG12203
6) 'Alexandrinum' (8)	IG22413, IG22414, IG22415, IG22416, IG22417, IG22503, IG22583, IG22629
7) 'Melanopus' (11)	IG6933, IG6937, IG6998, IG7015, IG7053, IG7054, IG7055, IG7056, IG7752, IG7755, IG7756,
8) 'Circumfliseum' (14)	IG17559, IG17562, IG17563, IG17564, IG17565, IG17566, IG17567, IG17568, IG17569, IG17570, IG17571, IG17572, IG17574, IG17575;
9) 'Affine' (26)	IG14273, IG14274, IG14275, IG14276, IG14277, IG14278, IG14279, IG14280, IG14281, IG14282, IG14283, IG14284, IG14285, IG14286, IG14287, IG14288, IG14289, IG14290, IG14291, IG14292, IG14293, IG14294, IG14295, IG14296, IG14297, IG14299,
10) 'Lencurum' (28)	IG14301, IG14302, IG14303, IG14304, IG14305, IG14306, IG14307, IG14308, IG14309; IG14310, IG14311, IG14313, IG14314, IG14315, IG14316, IG14317, IG14318, IG14320, IG14321, IG14322, IG14323, IG14324, IG14325, IG14326, IG14328, IG14329, IG14330, IG14331;
11) 'Aegyptiacum' (42)	IG14332, IG14333, IG14334, IG14335, IG14336, IG14337, IG16257, IG16268, IG16269, IG16271, IG16320, IG16321, IG16417, IG16418, IG16419, IG16420, IG16433, IG16434, IG16435, IG16436, IG16437, IG16438, IG16439, IG16445, IG16446, IG16447, IG16448, IG16449, IG16457, IG16458, IG16459, IG16468, IG16469, IG16470, IG16481, IG16482, IG16484, IG16491, IG16492, IG16494, IG16495, IG16497;
12) 'Valenciac' (50)	IG16498, IG16499, IG16500, IG16501, IG16502, IG16503, IG16504, IG16505, IG16506, IG16507, IG16508, IG16509, IG16549, IG16550, IG16551, IG16554, IG16555, IG16556, IG16557, IG16558, IG16559, IG16561, IG16562, IG16563, IG16564, IG16565, IG16566, IG16567, IG16568, IG16569, IG16571, IG16572, IG16573, IG16574, IG16575, IG16576, IG16577, IG16578, IG16579, IG16580, IG16581, IG16582, IG16583, IG16584, IG16585, IG16586, IG16587, IG16588, IG16589, IG16590;
13) 'Murciense' (58)	IG16596, IG16599, IG16600, IG16601, IG16602, IG16603, IG16604, IG16605, IG16606, IG16607, IG16608, IG16609, IG16670, IG16683, IG16684, IG16685, IG16686, IG16687, IG16688, IG16689, IG16691, IG16692, IG16694, IG16695, IG16696, IG16697, IG16698, IG16699, IG16700, IG16701, IG16702, IG16703, IG16704, IG16705, IG16706, IG16707, IG16708, IG16714, IG16716, IG16717, IG16718, IG16719, IG16721, IG16722, IG16723, IG16724, IG16725, IG16726, IG16727, IG16730, IG16731, IG16732, IG16733, IG16734, IG16735, IG16736, IG16737, IG16738, IG16739;
14) 'Hordeiforme' (75)	IG16740, IG16741, IG16742, IG16743, IG16744, IG16748, IG16749, IG16754, IG16755, IG16756, IG16757, IG16758, IG16759, IG16760, IG16761, IG16762, IG16765, IG16767, IG16768, IG16769, IG16771, IG16772, IG16780, IG16781, IG16792, IG16793, IG16794, IG16795, IG16796, IG16797, IG16798, IG16799, IG16800, IG16801, IG16802, IG16803, IG16804, IG16810, IG16811, IG16812, IG16813, IG16814, IG16815, IG16816, IG16817, IG16818, IG16819, IG16820, IG16821, IG16824, IG16825, IG16826, IG16827, IG16828, IG16829, IG16840, IG16841, IG16842, IG16843, IG16844, IG16845, IG16846, IG16847, IG16848, IG16849, IG16850, IG16851, IG16852, IG16854, IG16855, IG16858, IG16857, IG16858, IG16859, IG16860
15) 'Italicum' (142)	IG16861, IG16862, IG16863, IG16864, IG16865, IG16866, IG16867, IG16868, IG16869, IG16870, IG16871, IG16872, IG16873, IG16874, IG16875, IG16876, IG16877, IG16879, IG16880, IG16881, IG16882, IG16883, IG16885, IG16886, IG16887, IG16889, IG16891, IG16893, IG16894, IG16895, IG16896, IG16897, IG16898, IG16899, IG16900, IG16901, IG16902, IG16903, IG16904, IG16905, IG16906, IG16907, IG16908, IG16909, IG16910, IG16911, IG16913, IG16914, IG16915, IG16916, IG16917, IG16918, IG16919, IG16920, IG16921, IG16922, IG16923, IG16924, IG16925, IG16926, IG16927, IG16928, IG16929, IG16930, IG16931, IG16933, IG16934, IG16936, IG16937, IG16938, IG16939, IG16940, IG16941, IG16942, IG16943, IG16944, IG16945, IG16946, IG16947, IG16948, IG16949, IG16950, IG16951, IG16952, IG16953, IG16954, IG16956, IG16957, IG16958, IG16959, IG16960, IG16961, IG16962, IG16963, IG16964, IG16965, IG16966, IG16967, IG16968, IG16969, IG16970, IG16984, IG16985, IG16986, IG16987, IG16988, IG16989, IG16992, IG16993, IG17005, IG17006, IG17007, IG17008, IG17009, IG17010, IG17011, IG17017, IG17024, IG17026, IG17027, IG17030, IG17031, IG17032, IG17033, IG17034, IG17035, IG17039, IG17079, IG17086, IG17087, IG17088, IG17089, IG17090, IG17091, IG17093, IG17094, IG17095, IG17095, IG17058, IG17059, IG17071, IG17072, IG17073, IG17074;
16) 'Reichenbachi' (176)	IG17075, IG17076, IG17077, IG17078, IG17046, IG17047, IG17048, IG17050, IG17052, IG17053, IG17054, IG17055, IG17056, IG17057, IG17096, IG17097, IG17099, IG17100, IG17101, IG17103, IG17104, IG17105, IG17107, IG17109, IG17110, IG17111, IG17112, IG17113, IG17114, IG17115, IG17116, IG17117, IG17118, IG17119, IG17120, IG17121, IG17124, IG17125, IG17126, IG17127, IG17128, IG17129, IG17130, IG17142, IG17143, IG17145, IG17146, IG17147, IG17148, IG17149, IG17151, IG17152, IG17153, IG17154, IG17155, IG17156, IG17158, IG17162, IG17163, IG17164, IG17165, IG17179, IG17180, IG17181, IG17182, IG17183, IG17184, IG17185, IG17186, IG17188, IG17189, IG17190, IG17191, IG17192, IG17193, IG17194, IG17195, IG17196, IG17197, IG17198, IG17199, IG17200, IG17201, IG17203, IG17204, IG17205, IG17207, IG17208, IG17209, IG17210, IG17211, IG17212, IG17215, IG17216, IG17217, IG17218, IG17220, IG17221, IG17222, IG17223, IG17224, IG17225, IG17226, IG17227, IG17228, IG17229, IG17230, IG17231, IG17233, IG17234, IG17235, IG17236, IG17237, IG17238, IG17239, IG17240, IG17241, IG17244, IG17245, IG17246, IG17247, IG17248, IG17249, IG17250, IG17251, IG17252, IG17253, IG17254, IG17255, IG17256, IG17257, IG17260, IG17263, IG17265, IG17266, IG17268, IG17269, IG17270, IG17271, IG17272, IG17273, IG17274, IG17275, IG17276, IG17277, IG17278, IG17279, IG17280, IG17281, IG17282, IG17284, IG17285, IG17286, IG17287, IG17288, IG17289, IG17292, IG17293, IG17294, IG17295, IG17296, IG17297, IG17298, IG17299, IG17300, IG17301, IG17302, IG17303, IG17308, IG17309, IG17310, IG17311, IG17312, IG17313, IG17314, IG17315;
17) 'Lencomelan' (206)	IG17316, IG17317, IG17318, IG17319, IG17320, IG17321, IG17322, IG17323, IG17324, IG17352, IG17326, IG17327, IG17328, IG17329, IG17330, IG17331, IG17332, IG17333, IG17334, IG17339, IG17341, IG17342, IG17343, IG17344, IG17345, IG17346, IG17347, IG17348, IG17349, IG17350, IG17351, IG17353, IG17354, IG17355, IG17356, IG17357, IG17358, IG17359, IG17360, IG17361, IG17362, IG17363, IG17364, IG17365, IG17370, IG17371, IG17372, IG17373, IG17374, IG17375, IG17376, IG17377, IG17378, IG17394, IG17395, IG17397, IG17398, IG17399, IG17400, IG17401, IG17402, IG17404, IG17407, IG17408, IG17409, IG17411, IG17412, IG17413, IG17414, IG17415, IG17416, IG17417, IG17418, IG17419, IG17420, IG17421, IG17422, IG17423, IG17424, IG17425, IG17426, IG17427, IG17428, IG17429, IG17430, IG17431, IG17432, IG17433, IG17434, IG17435, IG17436, IG17437, IG17438, IG17439, IG17440, IG17441, IG17442, IG17443, IG17444, IG17445, IG17447, IG17448, IG17449, IG17451, IG17452, IG17453, IG17454, IG17456, IG17457, IG17458, IG17459, IG17460, IG17461, IG17462, IG17463, IG17464, IG17465, IG17466, IG17467, IG17468, IG17469, IG17470, IG17471, IG17472, IG17473, IG17475, IG17476, IG17477, IG17478, IG17480, IG17481, IG17482, IG17483, IG17484, IG17485, IG17486, IG17487, IG17488, IG17489, IG17490, IG17491, IG17492, IG17493, IG17494, IG17495, IG17496, IG17497, IG17498, IG17499, IG17500, IG17501, IG17502, IG17503, IG17504, IG17505, IG17506, IG17507, IG17508, IG17509, IG17510, IG17511, IG17512, IG17513, IG17514, IG17515, IG17516, IG17517, IG17518, IG17519, IG17520, IG17521, IG17522, IG17523, IG17524, IG17525, IG17526, IG17527, IG17528, IG17530, IG17531, IG17532, IG17533, IG17534, IG17535, IG17536, IG17537, IG17538, IG17539, IG17540, IG17541, IG17542, IG17543, IG17544, IG17546, IG17547, IG17547, IG17547, IG17547, IG17548, IG17549, IG17550, IG17551, IG17552, IG17553, IG17556, IG17557, IG17558

a the references number are codes from ICARDA Bank Germoplasm

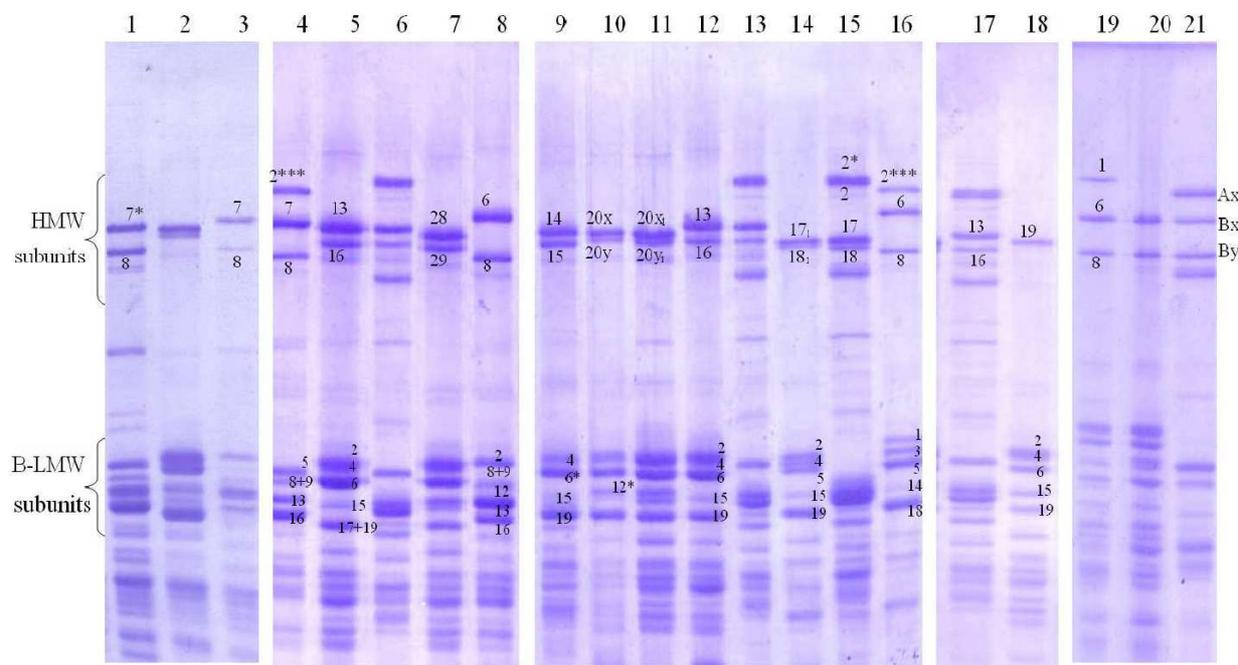


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of high molecular weight and low molecular weight glutenin subunits of endosperm proteins of accessions from some populations of local durum wheat collected in Algeria: 1. 'Africanum' IG5806, 2. 'Circumflescum' IG17564, 3. 'Fastuasum' IG11049, 4. 'Hordeiforme' IG16802, 5. 'Fastuasum' IG11945, 6. T1: 'Atlas 66', 7. 'Lencomelan' IG17409, 8. 'Melanopus' IG17565, 9. 'Algerience' IG6766, 10. 'Reichenbachi' IG17112, 11. 'Lencurum' IG14311, 12. 'Affine' IG14287' 13. T1: 'Atlas 66, 14' 'Affine' IG14288, 15. T2: 'Prinqual, 16. 'Lencurum' IG14320, 17. T1: 'Atlas' 66, 18. 'Aegyptiacim' IG16420, 19. 'Murciense' IG16684, 20. 'Italicum' IG16893, 21. T3: 'Clément'

units 13-16) were the most frequent with 31.54%, 25.70% and 21.38% frequency, respectively. The higher frequencies of these alleles were found in the three major populations in this collection (Italicum with 142 accessions, 'Reichenbachi' with 176 accessions and 'Lencomelan' with 206 accessions). Another relatively high frequency (12.73%) allele was *Glu-B1b* (encoding subunit pairs 14-15). The other six allelic forms that were identified (*Glu-B1b*, *Glu-B1u*, *Glu-B1z*, *Glu-B1i*, *Glu-B1r*, *Glu-B1ag*) encoding subunits 7-8, 7*-8, 7-15, 17-18, 19, 28-29 respectively. The four new bands were rarely expressed in this collection. They appeared at lower frequencies in only a few populations and were completely absent in the others. Accession IG-5806 of 'Africanum' population has subunit 7 of the pair 7+8 (Fig. 1. line 1) which migrates faster than subunit 7 of the pair 7+8 in Chinese Spring. This subunit is similar to subunit 7* of the pair 7*+8 observed by Pogna *et al.* (1989). One of the two new alleles was unique to the 'Lencurum' population and was found in only two accessions (IG-14303 and IG-14326). This allele encodes two subunits of which one had slightly faster mobility than that of band 20x encoded by the *Glu-B1e* allele, the other new band moved slightly faster than subunits 20y and 16, (Fig. 1, line 10 and 11). These subunits were designated 20x₁ and 20y₁ respectively and their encoding allele was named *Glu-B1e*₁. The second new allele was detected in acces-

sions IG-14311 and IG-14331 of the 'Lencurum' population and in IG-14288 of the 'Affine' population (Fig. 1. line 14), this allele codes for two subunits with mobility between bands 17-18 controlled by *Glu-B1i* allele (Fig. 1. line 15). We named these new bands 17₁ and 18₁ and their encoding allele *Glu-B1i*₁.

Allelic variation at *Glu-B2* and *Glu-3* loci

This set of durum wheat germplasm displayed abundant allelic variation of LMW-GS. A total of 19 alleles were identified (Tab. 2), six at the *Glu-A3* locus (*Glu-A3a*, *Glu-A3b*, *Glu-A3c*, *Glu-A3d*, *Glu-A3e*, and *Glu-A3b*), 10 at *Glu-B3* (*Glu-B3a*, *Glu-B3b*, *Glu-B3d*, *Glu-B3e*, *Glu-B3f*, *Glu-B3g*, *Glu-B3b*, *Glu-B3i*, *Glu-B3j*, *Glu-B3ab*) the last (coding for 2-8-9-13-16) being considered as new, and three at *Glu-B2* (*Glu-B2a*, *Glu-B2b*, *Glu-B2c*). The low molecular weight glutenin subunits identified were those previously described by Nieto-Taladriz *et al.*, (1997) except subunit 12* (Fig. 1, lane 10) which was identified by Martinez *et al.*, (2004) and 6* (Fig. 1, lane 9) encoded by the allele *Glu-B3j* which was identified by Lerner *et al.* (2004). For the B-LMW glutenins, the most common allelic composition was *Glu-A3a-Glu-B3a-Glu-B2a* encoding the pattern (2-4-6-12-15-19), 39% of the collection analyzed was characterized by this pattern.

The most common allele at *Glu-A3* was *Glu-A3a* encoding subunit 6 with a frequency of 83.06%, this allele was present in genotypes from every population analyzed, followed by *Glu-A3b* (null) with 10.5%; this allele was found in genotypes from nearly all populations and was absent

in only two (Afrinacum and ‘Algeriense’). The five other alleles classified as rare were all detected at lower frequencies of between 0.58% and 2.22%. At the *Glu-B3* locus, the frequency of allele *Glu-B3a* was 80.05%, it was present in many accessions in all populations except ‘Africanum’.

Tab. 2. Alleles of HMW and LMW subunits of glutenin found in the 856 local Algerian *T. durum* wheat

Locus	Varieties																		
	total	Apuli-	Africa-	Obscu-	Fastua-	Algerie-	Alexan-	Melan-	Circum-	Affi-	Lencu-	Aegypt-	Valen-	Murci-	Hordci-	Itali-	Reichen-	Lenco-	
Allele		cum	num	rum	sum	nce	drinum	opus	flescum	ne	rum	tiacum	ciac	ense	forme	cum	bach	melan	
Subunits	856	3	3	3	6	6	8	11	14	26	28	42	50	57	75	142	176	206	
Glu-A1																			
a: 1	1.05	/	/	33.33	16.66	/	/	9.09	/	/	/	/	/	3.50	/	/	1.70	0.48	
b: 2*	0.70	/	33.33	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10	/	/	/	/	/	
VI: 2***	0.46	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10.71	/	/	/	1.33	/	/	/	
c: null	97.78	100	66.66	66.66	83.33	100	100	90.91	100	100	89.28	100	90	96.5	98.66	100	98.3	99.52	
Glu-B1																			
d: 6-8	25.70	33.33	/	66.66	50	66.66	75	72.72	42.85	53.84	28.57	14.28	42	64.91	62.66	8.45	11.93	11.65	
b: 7-8	3.35	/	/	/	/	/	12.5	/	/	7.69	7.14	/	4	8.77	9.33	4.22	0.56	0.48	
u: 7*-8	0.12	/	33.33	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
z: 7-15	0.47	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.50	/	1.41	/	/	
f: 13-16	21.38	/	/	/	16.66	/	/	27.27	/	11.54	3.57	73.8	4	/	10.66	83.10	5.11	3.40	
h: 14-15	12.73	/	/	/	/	16.66	12.5	/	21.42	/	21.43	4.77	/	7.03	4	1.41	15.34	29.12	
i: 17-18	0.47	/	/	33.33	/	/	/	/	/	3.84	/	/	2	1.75	/	/	/	/	
r: 19	0.23	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.38	/	/	1.33	/	/	/	
e: 20x-20y	31.54	33.33	66.66	/	33.33	16.66	/	/	35.71	23.09	21.43	4.77	48	/	12	1.41	67.04	44.66	
ag: 28-29	2.57	/	/	/	/	/	/	/	/	/	3.57	/	/	/	/	/	/	0.48	
e: 20x1-20y1	0.23	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7.14	/	/	/	/	/	/	10.20	
i: 171-181	0.35	/	/	/	/	/	/	/	/	3.84	7.14	/	/	/	/	/	/	/	
Glu-A3																			
a: 6	83.05	33.33	33.33	66.66	66.67	100	75	72.72	64.28	61.54	71.43	95.23	18	91.37	84	95.07	83.52	93.20	
b: 5	1.87	33.33	66.66	/	16.66	/	/	/	7.14	11.54	7.14	/	/	1.72	/	/	2.84	/	
c: 6-10	0.83	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	1.70	1.94	
d: 6-11	0.93	/	/	/	/	/	/	/	14.28	/	/	/	/	3.44	4	/	0.57	/	
e: 11	0.58	/	/	/	/	/	/	/	/	19.22	/	/	/	/	/	/	/	/	
h: null	12.72	33.33	/	33.33	16.66	/	25	27.27	14.28	7.7	21.42	4.76	82	3.44	12	4.92	11.36	3.85	
Glu-B3																			
a:2-4-15-19	80.05	33.33	/	66.66	83.33	66.66	75	72.72	57.15	50	46.43	90.47	56	55.17	57.33	91.54	89.77	95.14	
b:8-9-13-16	1.63	33.33	33.33	33.33	/	/	/	/	/	/	7.14	7.14	/	1.72	4	0.71	/	0.48	
d:2-4-15-17-19	5.22	/	33.33	/	/	/	/	/	7.14	/	25	/	/	32.75	17.33	0.71	/	1.94	
e:2-4-15-16-18	0.23	/	/	/	/	16.66	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.71	/	/	
f:2-4-15-17	2.21	/	33.33	/	/	16.66	/	/	/	3.84	/	/	/	6.89	9.33	/	1.14	1.45	
g:2-4-15-16	1.40	/	/	/	/	/	/	/	14.28	7.7	3.57	/	2	/	/	1.41	2.27	/	
h:1-3-14-18	0.47	/	/	/	/	/	/	9.09	/	3.84	7.14	/	/	/	/	/	/	/	
i:7-8-14-18	0.93	/	/	/	/	/	/	/	7.14	26.92	/	/	/	/	/	/	/	/	
j:4-6*-15-19	1.05	/	/	/	/	/	12.5	/	/	3.84	3.57	/	/	/	/	0.71	2.84	/	
ab:2-8-9-13-16	6.77	33.33	/	/	16.66	/	12.5	18.18	14.28	3.84	7.14	2.38	42	3.44	12	4.22	3.98	0.97	
Glu-B2																			
a: 12	70.16	50	66.66	66.66	83.33	83.33	100	90.90	78.56	34.61	67.86	21.42	84	82.75	77.33	12.68	92.04	95.63	
b: null	28.66	50	33.33	33.33	16.66	/	/	9.09	21.43	65.39	32.14	78.57	16	17.23	22.66	87.32	5.68	4.37	
c: 12*	0.58	/	/	/	/	16.66	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.27	/	

Tab. 3. Genetic Index diversity

Locus	total	Apulic- cum	Africa- num	Obscu- rum	Fastua- sum	Algerie- nce	Alexan- drinum	Melan- opus	Circum- flescum	Affi- ne	Lencu- rum	Aegyp- tiacum	Valen- ciae	Murci- ense	Hordei- forme	Itali- cum	Reichen- bachi	Lenco- melan
		3	3	3	6	6	8	11	14	26	28	42	50	57	75	142	176	206
DGlu- A1	0.04	0.00	0.44	0.44	0.27	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.21	0.00	0.18	0.06	0.02	0.00	0.03	0.01
DGlu- B1	0.57	0.66	0.44	0.44	0.61	0.50	0.40	0.43	0.64	0.63	0.76	0.40	0.58	0.54	0.57	0.29	0.51	0.69
DGlu- A3	0.30	0.66	0.44	0.44	0.49	0.00	0.37	0.39	0.54	0.56	0.37	0.09	0.29	0.16	0.27	0.09	0.24	0.12
DGlu- B3	0.35	0.66	0.66	0.44	0.27	0.50	0.40	0.43	0.61	0.29	0.72	0.17	0.50	0.58	0.61	0.14	0.19	0.11
DGlu- B2	0.42	0.50	0.44	0.44	0.27	0.27	0.00	0.16	0.44	0.45	0.45	0.33	0.26	0.28	0.35	0.22	0.12	0.08
Di	0.34	0.48	0.48	0.44	0.38	0.25	0.23	0.31	0.45	0.39	0.50	0.20	0.36	0.32	0.36	0.14	0.22	0.20

Two other *Glu-B3* alleles (*Glu-B3d* and *Glu-B3*) were considered relatively abundant (>5%) (Caballero *et al.*, 2004) with approximately the same frequencies: 5.22% and 6.77% respectively.

Genetic diversity

The indices (D_i) of genetic diversity at each of the five loci of the 17 wheat populations are presented in Tab. 3. Most of the individual populations as well as the whole collection displayed relatively high levels of genetic diversity.

The average total gene diversity index (D_i) was 0.34. The *Glu-A1* locus had the lowest genetic variation (0.04) because it was monomorphic ($D_i=0$, expression of only one allele *Glu-A1c*) in seven populations: ‘Apulicum’, ‘Algeriense’, ‘Alexandrinum’, ‘Circumflescum’, ‘Affine’, ‘Aegyptiacum’ and ‘Italicum’. The highest genetic index diversity was at *Glu-B1* with an average total of 0.57. This locus was polymorphic in all populations. The extent of HMW and LMW glutenin subunit polymorphism varied among populations: the highest allelic diversity (0.50) was found in ‘Lencurum’ (28 accessions), with 10 alleles at *Glu-1* and nine at *Glu-3*, which also contained the two new alleles found at *Glu-1* and the new allele k at *Glu-B2*. ‘Italicum’, ‘Reichenbachi’ and ‘Lencomelan’, which have the highest numbers of accessions (142, 176 and 206 accessions respectively), showed the lowest diversity with D_i of 0.14, 0.22 and 0.20 respectively.

Cluster analysis based on HMW and LMW allelic frequencies

Cluster analysis based on HMW and LMW allelic frequencies was performed to determine the diversity among the durum wheat populations studied. The dendrogram (Fig. 2) obtained from Roger’s (1972) genetic distances of durum wheat population revealed several groups.

The ‘Africanum’ population (composed of only tree accessions) is very different from other populations. At Roger’s distance of 0.32, all populations split into two groups, one containing the two populations (Italicum and ‘Aegyptiacum’) which have a high level of similarity, while the second is further divided into two subgroups: the first comprising only one population (‘Valencia’), while the other is divided evenly into two groups, one comprising two populations (‘Affine’ and ‘Apulicum’) and the other containing the majority of the collection. The mean value of Roger’s distances was 0.30 (Fig. 2), at this distance, the dendrogram as a whole revealed high degree of similitude in the genetic diversity of proteins among the majority of populations. At distance 0.15, the dendrogram shows that the majority of populations could be clustered into two subgroups, the first comprising the population ‘Hordei-forme’ and the second a major group containing the nine remaining populations: ‘Lencomelan’, ‘Reichenbachi’,

Tab. 4. Representative of proposal core collection

Accessions	Geographical localisation	HMW-GS	LMW-GS	Morphological characters ^a
		Diagram's	Diagram's	
1. 'Apulicum' IG 6355	Guelma, Constantine, Bourdj-Relizane, Saida	Nul, 20x-20y	2-4-6-12-15-19	*Red ear pubescent, elongated, triangular shaped pyramid with a slightly flattened compact. The free glumelles are extended by dense black beards. The grain is white, large and translucent and the straw is hollow.
2. 'Africanum' IG5806	Toughourt, Biskra	Nul, 7*-8	5-7-8-12-14-18	*White ear pubescent, elongated, narrow slightly flattened with a rather low compactness. The glumelles are extended by long black beards little different or parallel. The grain is red, big and hunch back and the hollow straw.
3. 'Obscurum' IG7756	Tebessa, Tiaret, Relizane	1, 17-18	2-6-8-9-12-13-16	*Black hairless ear, semi compact pyramidal form or fusiform. The glumelles are extended by barbs black or bluish black, long and divergent. The grain is red, large, elongated hump and hollow straw generally 1/4th of the stem is hollow.
4. 'Fastuosum' IG11049	Medea, Relizane	Nul, 7-8	2-8-9-12-13-16	*Ear white pubescent. The glumelles are extended by barbs straight or parallel, nearly long, red grain, large, elongated hump and hollow to semi-hollow straw.
5. 'Fastuosum' IG11945	***	Nul, 13-16	2-4-6-15-17-19	
6. 'Algerience' IG6766	Relizane, Tebessa	Nul, 14-15	4-6*-15-19	*Red hairless ear, semi-compact. The glumelles are extended by black beard curved at the base sometimes divergent, red grain, large, elongated hump and hollow straw.
7. 'Alexandrinum' IG22415	Annaba	Nul, 6-8	2-8-9-12-13-16	*Same morphological characters as those of Algerience population.
8. 'Melanopus' IG17565	Guelma, Constantine, Bourdj-bouarrerdj	Nul, 6-8	2-8-9-12-13-16	*White pubescent ear, lying more or less flattened with a rather low compactness, long black beard divergent or parallel to grain white, large, elongated hump and hollow straw usually hollow to semi-hollow.
9. 'Circumflescum' IG17564	Mostaganem	Nul, 20x-20y	2-4-6-11-12-15-19	*White pubescent ear, fusiform, the glumelles are extended by long curved barbs at the base and grain red, large, elongated hump, hollow to semi-hollow.
10. 'Affine' IG14288	Mostaganem, Annaba and	New (171-181)	2-4-5-15-19	*White glabrous ear, straight, narrow, loose, white parallel beards sometimes divergent, red grain elongated hump and, hollow or semi-hollow straw
11. 'Affine' IG14299	Medea	Nul, 13-16	2-4-11-15-17	
12. 'Lencurum' IG14311	Oran and Annaba	New (20x1-20y1)	2-4-6-12-15-17-19	*White glabrous ear, sometimes nearly rectangular sometimes pyramid

Tab. 4. Representative of proposal core collection (Continous)

Accessions	Geographical localisation	HMW-GS	LMW-GS	Morphological characters ^a
13. 'Lencurum' IG 14320	***	2***, 6-8	1-3-5-14-18	with low compactness, with slightly divergent white beard, a medium white or amber grain, and hollow straw.
14. 'Aegyptiacum' IG16420	Tiarer, Bousaada, Toughourt	Nul, 19	2-4-6-15-19	*Red pubescent ear, compact, pyramid, of prolonged glumelles by little divergent red beard, red grain, elongated and large hump and semi-hollow straw.
15. 'Valenciae' IG16554	Biskra, Bousaada, Toughourt	2*, 17-18	2-4-6-12-15-16	*Same morphological characters as those of 'Lencurum' population.
16. 'Murciense' IG16684	Setif, Guelma, Constantine, bourdjbouarreridj.	1, 7-8	2-4-6-12-15-19	*Ear red, glabrous somewhat loose with glumelles extended by long red beard semi-divergent, red grain, medium hump and half filled straw.
17. 'Hordeiforme' IG16802	Tiarer and Tebessa	2***, 7-8	5-8-9-13-16	*Same morphological characters as those of Murciense population.
18. 'Italicum' IG16893	Batna and Bousaada	Nul, 7-8	2-4-6-12-15-19	*Same morphological characters as those of 'Fastuosum' population.
19. 'Italicum' IG16919	***	Nul, 7-15	2-4-6-10-15-16-18	
20. 'Reichenbachi' IG 17112	Saida and Tebessa	Nul, 20x-20y	2-4-6-12*-15-19	*White hairless ear, loose, straight, narrow, with low divergent black beard, medium sized red grain, humped with hollow, semi hollow or 3/4th widening straw.
21. 'Lencomelan' IG17409	Oran and Annaba	Nul, 28-29	2-4-6-12-15-19	*Same characters as those of 'Reichenbachi' population.

a: according to Boudour, L. (2005)

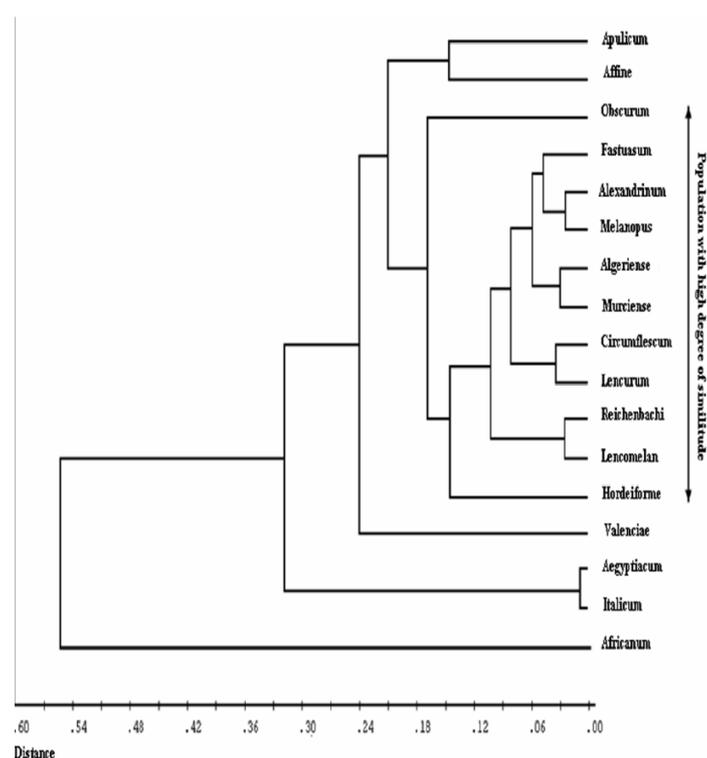


Fig. 2. Cluster analysis based on allele frequency in each local Algerian durum wheat population

'Lencurum', 'Circumflescum', 'Murciense', 'Algeriense', 'Melanopus', 'Alexandrinum', and 'Fastuasum'. The results of cluster analysis (Fig. 2.) showed no relation between allelic variation and the geographical distribution of the populations analyzed. For example, the nine populations in the same cluster at the distance 0.18 do not have the same geographic origins and come from completely different climates: some are distributed throughout the Mediterranean climate and littoral areas ('Lencurum', 'Circumflescum', 'Lencomelan', etc.), others are from the tellian Atlas ('Melanopus' and 'Murciense') or from semi-arid areas ('Fastuasum' and 'Algeriense') and the arid Saharan regions ('Alexandrinum' and 'Rechenbachi'). Another example concerns the two populations 'Africanum' and 'Valenciae', which are very distant based on their HMW-GS and LMW-GS composition, but were collected at the same sites.

Morphological characters

Ten morphological characters were selected to study similarities among populations. These morphological characters were included in this study as a complementary approach to confirm the choice of accessions for the core collection. Cluster analysis (Fig. 3) showed five groups, each composed of two populations that were very close morphologically: 'Lencurum' and 'Valenciae', 'Hordeiforme' and 'Murciense', 'Reichenbachi' and 'Lencomelan', 'Fastuasum' and 'Italicum', and 'Alexandrinum' and 'Algeriense'.

The choice of the accessions in this core collection (Tab. 4) was based on two other factors: some morphological characters and the genetic variability of SG-HPM and FPM. Since no significant correlations were found between these three factors, the choice of the accessions for the core collection was made by selecting accessions covering all the variability of the parameters studied. For this reason, we always chose accessions that were sufficiently distant from one another.

Discussion and conclusions

Nowadays, the genetic variability of wheat cultivars is decreasing as a consequence of the genetic erosion of cultivated wheat. It is thus important to search for new genes for wheat improvement. With this objective, many studies have been performed to evaluate the materials conserved in germplasm banks and core collections (Balfourier *et al.*, 2007) using molecular markers as tools. Previous investigations showed that old varieties and landraces as well as closely related *Triticum* species of cultivated wheat possess considerable allelic variation in HMW and LMW-GS composition (Yan *et al.*, 2003; Pflüger *et al.*, 2001; Vallega and Waines, 1987). These rich genes resources may play an important role in improving wheat quality.

In our study, we detected allelic variation at *Glu-1*, *Glu-3* and *Glu-B2* loci in 856 accessions of durum wheat collected in Algeria and divided *a priori* according to their agronomical and morphological traits into 17 populations to create a core collection. The germoplasm from ICAR-

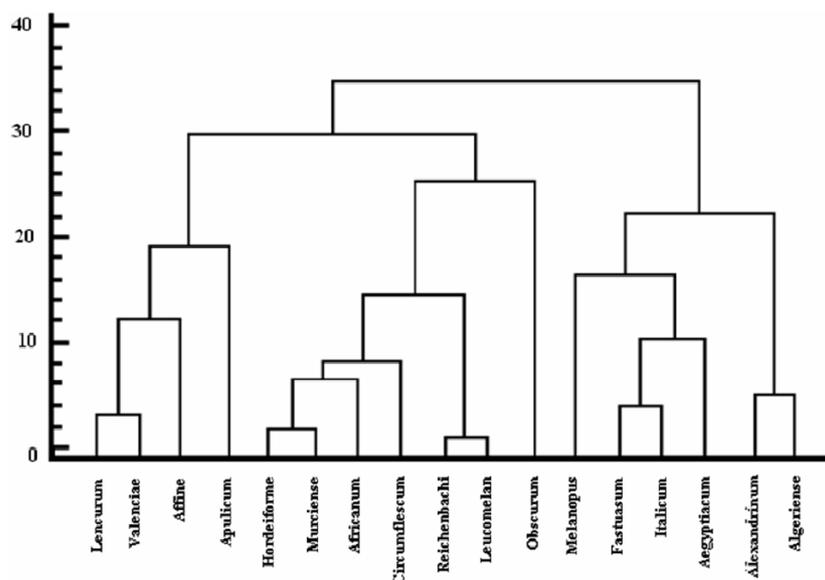


Fig. 3. Cluster analysis based on morphological characters in each botanic durum wheat population

Choice of representative accessions for the core collection

In order to constitute the core collection, the geographic origin of the accessions was used as a priority and at least one representative accession was selected per loca-

tion. DA-GenBank had not been previously investigated for the genetic diversity of their gluten compositions. The results obtained showed rather high polymorphism in HMW-GS and LMW-GS variation, especially for *Glu-B1* and *Glu-*

B3 loci. Altogether, 53 glutenin patterns were detected, including 22 for HMW and 21 for B-LMW glutenin subunits. A total of 35 different alleles were identified for the five glutenin loci studied *Glu-A1* (4), *Glu-B1* (12), *Glu-A3* (6), *Glu-B3* (10) and *Glu-B2* (3). Three new alleles were found, two at *Glu-B1* and one at *Glu-B3*. For the *Glu-B1* locus, some alleles are very frequent: more particularly the alleles *Glu-B1e* and *Glu-B1d* encoding subunit pairs (20x-20y and 6-8) respectively. These results are in agreement with those of Branlard *et al.* (1989), who found that these two alleles occurred in 33.5% and 26.3% of the 502 varieties of durum wheat originating from 23 countries; however, most accessions of durum wheat analyzed do not have subunit 7-8 encoded by *Glu-B1b* (present in only 3.03% of accessions) contrasting with the higher frequency (25.9%) found in the durum wheat of 502 varieties. The alleles *Glu-B1f* (13-16) and *Glu-B1b* (14-15), which were common among the accessions in our study (21.37% and 12.73%, respectively), were rarely expressed in the world collection analyzed by Branlard *et al.* (1989) i.e. in only 5.5% and 0.6%, respectively. Moragues *et al.* (2006) in their study of 63 durum wheat landraces from the Mediterranean basin, reported three alleles in *Glu-A1* and 14 alleles at the *Glu-B1* locus, where *Glu-B1e* and *Glu-B1b* were the most frequent (30.16% and 23.81%, respectively). Similar results were found by Carrillo (1995), who studied 200 varieties of Spanish durum wheat landraces. Conversely Hailu *et al.* (2006) in a collection of 120 Ethiopian tetraploid wheat germplasm analyzed found HMW glutenin subunits 7-8 to be the most frequent and 6+8 to be rare. For the B-LMW glutenins, seven, eleven and three allelic variants were observed at *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-B2* respectively, which is nearly the same genetic variability as that reported by Nieto-Taladriz *et al.*, (1997) in a collection of 88 durum wheat cultivars originating from different areas. The most common allelic composition was *Glu-A3a-Glu-B3a-Glu-B2a* (36%). Comparing the frequencies of glutenin subunits found in Algerian durum wheat landraces (Cherdouh *et al.*, 2005) and those found in durum varieties grown in Algeria (no published results), higher diversity was found in the local durum wheat collection analyzed in the present study. This information could be useful for selecting local varieties with improved quality and also as a source of genes to develop new lines when breeding for quality as shown by the observed high frequencies of alleles related to grain quality: *Glu-B1b* (7+8), *Glu-B1d* (6+8) (Du Cros, 1987) and *Glu-A1a* (subunit 1) (Kaan *et al.*, 1993; Aghai *et al.*, 1996), *Glu-B3a* (2+4+15+19), *Glu-B3c* (2+4+14+15+19), *Glu-A3b* (nul), *Glu-A3a* (6) (Carrillo *et al.*, 2000). The development of the phylogenetic resources requires not only their conservation but also their use. Through this study, which took into account the genetic variability of HMW-GS and LMW-GS and the variability of morphological characters and the geographical location of populations, we were able to reduce the collection of 856 to only 21 accessions. This is the mini-

imum number of accessions and molecular markers that would be needed to undertake a complete evaluation of the representative subsets formed with chosen accessions. Assembling a core collection of accessions is one way of streamlining the process of evaluating genetic diversity. For instance, having a small representative sample of accessions should make it easier to look for allelic variation in genes of interest for quality and thus facilitate their use in breeding programs.

References

- Aghai, J., S. Abd Mishani and N. Kodabandeh (1996). Genetic variation and geographical diversity for seed storage proteins of Iranian durum wheat collection. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 27:105-113.
- Ammar, K., W. E. Kronstad and C. F. Morris (2000). Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition. *Cereal Chemistry* 77:230-236.
- Balfourier, F., V. Roussel, P. Strelchenko, F. Exbrayat-Vinson, P. Sourdille, G. Boutet, J. Koenig, C. Ravel, O. Mitrofanova, M. Beckert and G. Charmet (2007). A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1265-1275.
- Boudour, L. (2005). Etude des ressources phylogénétiques de blés durs algériens: analyse de la diversité génétique et des critères d'adaptation au milieu. Thèse de Docteur d'état en physiologie végétale, option: Amélioration des plantes. Université Mentouri Constantine Algérie 1-142.
- Branlard, G., J. C. Auran and P. Monneveux (1989). High molecular weight glutenin subunits in durum wheat (*T. durum*). *Theoretical and Applied Genetics* 78:353-358.
- Caballero, L., L. M. Martin and J. B. Alvarez (2004). Genetic variability of low-molecular-weight glutenin subunits in spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *Spelta* L. em Thell.). *Theoretical and Applied Genetics* 108:914-919.
- Carrillo, J. M. (1995). Variability for glutenin proteins in Spanish durum wheat landraces. *Options Méditerranéennes. Serie A. Séminaires Méditerranéens* 143-147.
- Carrillo, J. M., M. C. Martinez, C. Moita Brites, M. T. Nieto-Taladriz and J. F. Vasquez (2000). Relationship between endosperm proteins and quality in durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*). In Royo, C., Nachit, M. M., Di Fonzo and Araus, J. L. (eds) *Durum wheat improvement in the Mediterranean Region, New challenges. Options Méditerranéennes* 40:463-467.
- Cecarelli, S., S. Grando and J. G. A. Van Leur (1987). Genetic diversity in barley landraces from Syria and Jordan. *Euphytica* 36:389-405.
- Cherdouh, A., D. Khelifi, M. T. Carrillo and M. T. Nieto-Taladriz (2005). The high and low molecular weight glutenin polymorphism of Algerian durum wheat landraces and old

- cultivar. *Journal of Plant Breeding* 124:338-342.
- Du Cros, D. L. (1987). Glutenin protein and gluten strength in durum wheat. *Journal of Cereal Sciences* 5:3-12.
- Frankel, O. H. and A. H. D. Brown (1984). Plant genetic resources today: A critical appraisal. In: J. H. W. Holden, and J. T. Williams, (eds), *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*. London: Allen and Unwin 249-257.
- Hailu, F., E. Johansson, A. Merker, G. Belay, Harjit-Singh and H. Zeleke (2006). Composition of and variation in high- and low-molecular weight glutenin subunits and omega gliadins in Ethiopian tetraploid wheat germplasm. *Plant Genetic Resources* 4:134-143.
- Harberd, N. P., D. Bartels and R. D. Thompson (1986). DNA restriction-fragment variation in the gene family encoding high molecular weight (HMW) glutenin subunits of wheat. *Biochemical Genetics* 24:579-596.
- Jauhar, P. P. (1993). Alien gene transfer and genetic enrichment of bread wheat. In: A. B. Damania, (ed.), *Biodiversity and Wheat Improvement*. John Wiley and Sons, Chichester England 103-119.
- Kaan, F., G. Branlard, B. Chihaab, C. Borris and P. Monneveux (1993). Relations between genes coding for grain storage protein and two pasta cooking quality criteria among durum wheat (*T. durum* Desf) genetic resources. *Journal of Genetics and Breeding* 47:151-156.
- Lerner, S. E., M. Cogialliti, N. R. Ponzio, M. L. Seghezze, E. R. Molfese and W. J. Rogers (2004). Genetic variation for grain protein components and industrial quality of durum wheat cultivars sown in Argentina. *Journal of Cereal Science* 40:161-166.
- Martinez, M. C., M. Ruitz and G. M. Carrillo (2004). New B low Mr glutenin subunit alleles at the Glu-A3, Glu-B3 and Glu-B2 loci and their relationship with gluten strength in durum wheat. *Journal of Cereal science* 40:101-107.
- McIntosh, R. A., Y. Yamazaki, J. Dubcovsky, J. Rogers, C. Morris, D. J. Somers, R. Appels and K. M. Devos (2008). Catalogue of gene symbols for wheat. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008/>.
- Moraguez, M., J. F. Zarco-Hernandez, M. A. Moralejo and C. Royo (2006). Genetic diversity of glutenin protein subunits composition in durum wheat landraces (*Triticum turgidum* ssp. *Tugidum* convart.durum (Desf.) Mackey from the Mediterranean basin. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:993-1002.
- Nakamura, H. (2001). Genetic diversity of high-molecular-weight glutenin subunit compositions in landraces of hexaploid wheat from Japan. *Euphytica* 120:227-234.
- Nieto-Taladriz, M. T., M. Ruitz, M. C. Martinez, J. F. Vazquez and J. M. Carrillo (1997). Variation and classification of B-low molecular weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 95:1155-1160.
- Payne, P. I., L. M. Holt and C. N. Law (1981). Structural and genetical studies of the high molecular subunits of wheat glutenin. I. Allelic variation in subunits amongst varieties of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 60:229-236.
- Payne, P. I. and G. J. Lawrence (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for High Molecular Weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications* 11:29-35.
- Pflüger, L. A., J. B. Alvarez and L. M. Martín (2001). Variation in the HMW and LMW glutenin subunits from Spanish accessions of emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* Schrank). *Theoretical and Applied Genetics* 102:767-772.
- Pogna, N. E., F. Mellini, A. Bretta and A. DalBelinperuffo (1989). The high-molecular-weight glutenin subunits of common wheat cultivars grown in Italy. *Journal of Genetics and Breeding* 43:17-24.
- Reif, J. C., P. Zhang, S. Dreisigacker, M. L. Warburton, M. Van Ginkel, D. Hoisington, M. Bohn and A. E. Melchinger. Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 110:859-864.
- Rogers, J. S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distances. *Studies in genetics VII*. University of Texas. Publication 7213:145-153.
- Shewry, P. R., N. G. Halford and D. Lafandra (2003). Genetics of Wheat Gluten Proteins Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics* 49:111-184.
- Shewry, P. R., N. G. Halford and A. S. Tatham (1989). The high-molecular-weight subunits of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. In: B. J. Mifflin (ed.) *Oxford Surveys*. *Journal of Molecular Cell Biology* 6:163-219.
- Singh, N. K., K. W. Shepherd and G. B. Cornish (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Sciences* 14:203-208.
- Vallega, V. and J. G. Waines (1987). High molecular weight glutenin subunit variation in *Triticum turgidum* var. *dicoccum*. *Theoretical and Applied Genetics* 74:706-710.
- Yan, Y., S. L. K. Hsam, J. Z. Yu, Y. Jiang, I. Ohtsuka and F. J. Zeller (2003). HMW and LMW glutenin alleles among putative tetraploid and hexaploid European spelt wheat (*Triticum spelta* L.) progenitors. *Theoretical and Applied Genetics* 107:1321-1330.
- VanHintum, J. L. and A. Elings (1991). Assessment of glutenin and phenotypic diversity of Syrian durum wheat landraces in relation to their geographical origin. *Euphytica* 55:209-215.
- Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Chapitre 3

**Etude de la diversité génétique des blés durs
et tendres des oasis algériennes**

Préambule

L'Algérie est reconnue comme étant un centre de diversité non négligeable pour plusieurs espèces céréalières dont le blé dur et le blé tendre ainsi qu'une grande diversité des formes pour les blés sahariens. Les blés sahariens sont restés pendant longtemps mal connus ; plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cette méconnaissance : l'isolement des zones sahariennes, l'autoconsommation des blés produits (la modeste production ne permet pas la constitution de surplus échangeables) et la difficulté de l'étude des blés sahariens hors de leur milieu d'origine du fait en particulier de leurs extrême sensibilités à la rouille jaune (*Puccinia striiformis* Westend) et à la coulure. Les blés des oasis ont été surtout étudiés d'un point de vue botanique, les tentatives d'identification génotypique et de classification et les études de diversité génétique ont été jusqu'ici basées essentiellement sur la morphologie de l'épi et du grain et se donnent pour objectif de classer les différents types rencontrés. Cette approche présente des limites et se heurte à de nombreuses difficultés. Il est nécessaire donc, de simplifier l'identification génotypique et d'aborder l'étude de la diversité génétique des blés sahariens, en faisant appel aux techniques biochimiques et moléculaires. Notre travail s'inscrit dans ce contexte. Il s'agit d'apprécier la diversité génétique des blés sahariens (durs et tendres) par l'analyse de la variabilité des gluténines.

L'analyse des blés sahariens a permis de recenser un total de 32 et 29 allèles pour les blés tendres et durs respectivement et dont la combinaison a donné 36 et 29 diagrammes types différents pour les blés tendres et durs respectivement. Chez les variétés de blé tendre 3, 9 (dont 1 nouveau) et 4 allèles sont observés aux loci *Glu-A1*, *Glu-B1* et *Glu-D1* codant pour les SG-HMW, respectivement. Un polymorphisme similaire a été trouvé pour les SG-FPM avec 4, 9 et 3 allèles identifiés aux loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-D3* respectivement. Dans la collection de blé dur, 3 allèles sont exprimés au locus *Glu-A1* et 9 au *Glu-B1* (dont 1 est nouveau). Au loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-B2* codant pour les SG-FPM, 7, 8, (dont 1 nouveau) et 2 allèles sont identifiés respectivement.

La connaissance de ces allèles constitue un outil important d'une part pour l'estimation de la variabilité génétique et l'identification variétale et d'autre part dans la sélection pour la qualité des céréales.

Genetic Diversity of High and Low Molecular Weight Glutenin Subunits in Saharan Bread and Durum Wheats from Algerian Oases

INES BELLIL¹, MOHAMMED CHEKARA BOUZIANI² and DOUADI KHELIFI¹

¹Laboratory of Genetics Biochemistry and Plant Biotechnologies, Faculty of the Sciences of Nature and Life, Mentouri University, Constantine, Algeria; ²Department of the Sciences of Nature and Life, Faculty of precise Sciences and the Sciences of Nature and Life, Mohamed Khider University, Biskra, Algeria

Abstract: Saharan wheats have been studied particularly from a botanical viewpoint. Genotypic identification, classification and genetic diversity studies to date were essentially based on the morphology of the spike and grain. For this, the allelic variation at the glutenin loci was studied in a set of Saharan bread and durum wheats from Algerian oases where this crop has been traditionally cultivated. The high molecular weight and low molecular weight glutenin subunit composition of 40 Saharan bread and 30 durum wheats was determined by SDS-PAGE. In Saharan bread wheats 32 alleles at the six glutenin loci were detected, which in combination resulted in 36 different patterns including 17 for HMW and 23 for LMW glutenin subunits. For the Saharan durum wheats, 29 different alleles were identified for the five glutenin loci studied. Altogether, 29 glutenin patterns were detected, including 13 for HMW-GS and 20 for LMW-GS. Three new alleles were found in Saharan wheats, two in durum wheat at the *Glu-B1* and *Glu-B3* loci, and one in bread wheat at the *Glu-B1* locus. The mean indices of genetic variation at the six loci in bread wheat and at the five loci in durum wheat were 0.59 and 0.63, respectively, showing that Saharan wheats were more diverse. This information could be useful to select Saharan varieties with improved quality and also as a source of genes to develop new lines when breeding for quality.

Keywords: allelic variation; genetic diversity; glutenin subunits; polymorphism; Saharan wheats

Improving grain quality is a major challenge for many wheat breeding programmes. Wheat storage proteins, namely gliadins and glutenins, are the main components of gluten, which is the main contributor to the rheological and bread-making properties of wheat (BRANLARD *et al.* 2001). Genetic studies have revealed that these proteins are encoded at several, complex and highly polymorphic loci. Glutenin subunits are classified as high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits on the basis of their mobility in SDS-PAGE. The LMW-GS are subdivided into B, C and D (JACKSON *et al.* 1983), with B subunits playing a major role in

gluten quality (RUIZ & CARRILLO 1995; TURCHETTA *et al.* 1995). HMW subunits are encoded at the *Glu-1* loci on the long arm of the group 1 chromosomes (PAYNE *et al.* 1980). B-LMW-GS are inherited as groups controlled at *Glu-3* and *Glu-B2* loci (SINGH & SHEPHERD 1988). The natural variation found for all these protein loci is very important for improving wheat quality. Saharan wheats have remained poorly studied for a long time; several reasons may explain this fact: the isolation of the Saharan areas, the consumption of produced wheat, and the difficulty to study Saharan wheats out of their original environment, particularly because of their

extreme sensitivity to yellow rust. Considerable work of collecting and describing Saharan wheat populations was presented in studies by MIEGE (1924) and ERROUX (1958). These studies were devoted to the morphological variability of ears and grains with the aim of classifying the different types encountered. This approach has limitations, and faced many difficulties due to the heterogeneity of the populations, the abundance of intermediate forms and the vagueness of the nomenclature. In this context, the diversity of Saharan wheat varieties and forms represents an important source of genetic variability and consequently, of valuable traits for wheat improvement. On the other hand, proteins are valuable biochemical markers for genetic analysis, and for the quantification of genetic diversity present in wheat collections (KUDRYAVTSEV *et al.* 1996). The objective of this study was to determine the allelic composition at glutenin loci encoding for high and low molecular weight glutenin subunits within Saharan bread and durum wheat cultivars. The allelic frequencies were used to analyse the genetic diversity of these proteins for both durum and bread Saharan wheats from Algerian oases.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

A total of 70 cultivars of Saharan wheats originating from Algerian oases were analysed for high and low molecular weight glutenin subunits. This collection included 40 Saharan bread wheats and 30 Saharan durum wheats (Tables 1 and 2). These wheats were mostly collected and maintained at the National Institute of Agronomical Research (INRAA-Adrar, Algeria), the Technical Institute of Saharan Agricultural Development (ITDAS-Adrar, Djamaa-EL oued and Biskra, Algeria) and the Centre of Scientific and Technical Research in Dry Areas (CRSTRA-Biskra, Algeria). Ten of these cultivars were provided by farmers (Agini, Beliouni, Guemgoum Erksam1, Jenah Khotafa, Hassi Ben Abdallah, Saba, Ghouff, Ramla, Hedba, and Touatia3).

Protein analysis

Glutenins were extracted following a sequential procedure (SINGH *et al.* 1991). Electrophoresis of glutenin subunits was performed using SDS-PAGE

according to SINGH *et al.* (1991). High molecular weight (HMW) glutenin alleles at *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* loci were identified using the nomenclature of PAYNE and LAWRENCE (1983) completed by BRANLARD *et al.* (2003). B-low molecular weight (B-LMW) glutenin alleles at *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3* and *Glu-B2* loci were designated according to NIETO-TALADRIZ *et al.* (1997) for durum wheats, and according to BRANLARD *et al.* (2003) for bread wheats.

Statistical analysis

Allelic frequencies were calculated at each glutenin locus. The genetic diversity at each locus was calculated as follows: $H = 1 - \sum Pi^2$, with H and Pi denoting the genetic variation index and the frequency of the number of alleles at the locus, respectively (NEI 1973).

RESULTS

Polymorphism for HMW-GS and LMW-GS patterns in Saharan wheats

In Saharan bread wheats, 32 alleles were identified in total at the six loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-D3*. On the basis of genetic diversity found at the six loci, 36 patterns were established among the 40 Saharan bread wheat cultivars analysed (Table 1). Thirty three patterns were specific to one cultivar each. Extensive variability was observed for the HMW glutenins. A total of 16 HMW subunits were revealed from the analysis of different Saharan bread wheats. The majority of the forty cultivars analysed possessed three to five bands and 17 types of patterns were determined (Table 1). Each combination was encountered in one to ten cultivars. Concerning the B-LMW subunits, large variability in patterns was detected and 23 combinations were listed (Table 1). The number of cultivars for each combination of B-LMW subunits varied from one to six. The results showed that the greatest polymorphism of storage proteins in Saharan bread wheats was on chromosome 1B with nine allelic forms at the *Glu-B1* and *Glu-B3* loci.

In Saharan durum wheats, 29 different alleles at the *Glu-1*, *Glu-3* and *Glu-B2* loci were identified resulting

Table 1. Allelic composition at the six HMW and LMW loci found in 40 bread wheats from Algerian oases

No.	Cultivars	Origin	HMW			LMW		
			<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-D3</i>
1	Cheguira	Djanet	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>g</i>	<i>a</i>
2	Bouchouka	Ouargla	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>g</i>	<i>a</i>
3	Bousbiba	Timimoun	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>f</i>	<i>j</i>	<i>c</i>
4	Sebag1	Tidmane, Touat, Adrar	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>a</i>
5	Bent Mbarek	Liada, Tsabit, Touat, Adrar	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>c</i>
6	Saharaoui	Biskra	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>c</i>
7	Belbaida	Timimoun	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
8	Belmabrouk1	Touat, Gourrara	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
9	Belmabrouk2	Ouled El Hadj Mamoun, Touat	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>c</i>
10	Chater1	Tidmane, Touat, Adrar	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>j</i>	<i>c</i>
11	Ben Salem	Hiba, Tsabit, Adrar	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
	Mansouri	Touat, Adrar	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
12	Eskandaria 1	Aougrou, Gourrara, Adrar	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>c</i>
13	Touatia3	Mekkid, Touat, Adrar	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>c</i>
14	Chetla	Taghit	<i>b</i>	<i>i</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
15	Fritas	M'rara, El oued	<i>b</i>	<i>new3</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
16	El Menea	El Habla, Tsabit, Adrar	<i>b</i>	<i>o</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>i</i>	<i>c</i>
17	Bakli	Aougrou, Gourrara, Adrar	<i>b</i>	<i>o</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
	Manga	Touat, Adrar	<i>b</i>	<i>o</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
	Oum Rokba1	Ouled El Hadj, Zaouiat Kounta, Adrar	<i>b</i>	<i>o</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
18	Sebag2	Tiouililine, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>a</i>
19	Moumena	Ouled Rached, Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
20	Hamra	Aguril, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>j</i>	<i>b</i>
21	Touatia2	Touat, Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
22	Tafertat	Touat, Gourrara	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
23	Hassi Ben Abdallah	Hassi Ben Abdallah, Ouargla	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
24	Oum Rokba2	Tittaouine E'chorfa, Aoulef, Adrar	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
25	Tabelballa	Benni-Abbès	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>g</i>	<i>c</i>
26	Boukarnafa	Benni-Abbès	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>c</i>
	Yahia	Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>c</i>
27	Bahamoud	Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>i</i>	<i>b</i>
28	Oum Zhira	El Ksar Ain Zeghlouf-Reggane, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>c</i>
29	Kedoura	Tiouililine, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>j</i>	<i>b</i>
30	Chater2	Tamantit, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>c</i>
31	El Farh	Tittaouine E'chorfa, Aoulef, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b'</i>	<i>b</i>
32	Zaghloul	Tsabit, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
33	Masraf	Tsabi, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
34	Chouitar	Tamantit, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
35	Touatia1	Ouled Rached, Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
36	Mekaouia	Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>b</i>

Czech J. Genet. Plant Breed., 48, 2012 (1): 23–32

Table 2. Allelic composition at the five HMW and LMW loci found in 30 Saharan durum wheats from Algerian oases

No.	Cultivars	Origin	HMW		LMW		
			<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-A3</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Glu-B2</i>
1	Kahla	Touat	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
2	Merouani	El Oued	<i>b</i>	<i>e</i>	<i>j</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
3	M'zirâa	M'zirâa, Biskra	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>new2</i>	<i>a</i>
4	Beds	Beds, Biskra	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
5	Chegga	Chegga, Biskra	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
6	Tazzi	Aougrou, Gourrara, Adrar	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
7	Ouled Khoudir	Bechar	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>new2</i>	<i>a</i>
	El Ksor	El Ksor, Lioua, Biskra	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>new2</i>	<i>a</i>
8	Agini	Adrar	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
9	Beliouni	Adrar	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
10	Saba	Mekkid, Touat, Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
11	Jenah Khotaifa	Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
12	Ghouff	Ahaggar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
13	Bidi2	Ain Ennaga, Biskra	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
14	Guemgoum Erksam2	Adrar	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
15	Romani	El Fid, Biskra	<i>c</i>	<i>e</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
16	Megarine	Megarine, Djamaa	<i>c</i>	<i>f</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
17	Biskri	Biskra	<i>c</i>	<i>f</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
18	Kahlaya	Doucen, Biskra	<i>c</i>	<i>f</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
19	Amakawia	Ahaggar	<i>c</i>	<i>f</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
20	Hedba	Megarine, Djamaa	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
21	Djebli	Sidi Okba, Biskra	<i>c</i>	<i>new1</i>	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
22	Guemgoum Erksam1	Marmoutha, Lioua, Biskra	<i>c</i>	<i>new1</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
23	Khangat Sidi Naji	Khangat Sidi Naji, Biskra	<i>c</i>	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
24	Zribet El Oued	Zribet El Oued, Biskra	<i>c</i>	<i>o</i>	<i>e</i>	<i>h</i>	<i>b</i>
25	Souda	Timimoun	<i>c</i>	<i>u</i>	<i>b</i>	<i>i</i>	<i>a</i>
26	Ahaggar	Ahaggar	<i>c</i>	<i>VI</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
27	Ain Zaatout	Ain Zaatout, Biskra	<i>c</i>	<i>VI</i>	<i>c</i>	<i>h</i>	<i>a</i>
28	El Waha	Adrar	<i>VI</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
29	Ramla	Adrar	<i>VI</i>	<i>d</i>	<i>b</i>	<i>h</i>	<i>b</i>

in twenty-nine patterns in this collection. Twenty eight patterns were specific of one cultivar each as shown in Table 2. Three and nine HMW glutenin subunits alleles were identified at the *Glu-A1* and *Glu-B1* loci, respectively. 17 alleles encoding LMW glutenin subunits were observed in the collection. Seven, eight and two alleles corresponded to the *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-B2* loci. Combinations of these alleles gave thirteen HMW-GS patterns and twenty LMW-GS patterns (Table 2). The highest allelic variability for

HMW and LMW glutenin subunits was found for chromosome 1B with nine and eight allelic forms at the *Glu-B1* and *Glu-B3* loci, respectively.

Allelic diversity of glutenins in Saharan wheats

The HMW-GS composition and allele frequencies in the 40 Saharan bread cultivars are shown in Table 3.

Table 3. Allele frequencies of HMW and LMW glutenin and genetic index diversity at the *Glu-1* and *Glu-3* loci of Saharan bread wheats

Locus	Allele	Subunit	Frequency (%)
<i>Glu-A1</i>	<i>a</i>	1	7.50
	<i>b</i>	2*	42.50
	<i>c</i>	null	50.00
	H index		0.56
<i>Glu-B1</i>	<i>a</i>	7	22.50
	<i>b</i>	7+8	2.50
	<i>c</i>	7+9	7.50
	<i>d</i>	6+8	10.00
	<i>e</i>	20	40.00
	<i>g</i>	13+19	2.50
	<i>i</i>	17+18	2.50
	<i>o</i>	6+22	10.00
	<i>new3</i>		2.50
H index		0.76	
<i>Glu-D1</i>	<i>a</i>	2+12	85.00
	<i>b</i>	3+12	2.50
	<i>d</i>	5+10	10.00
	<i>e</i>	2+11	2.50
H index		0.27	
<i>Glu-A3</i>	<i>a</i>		60.00
	<i>b</i>		7.50
	<i>d</i>		30.00
	<i>f</i>		2.50
H index		0.54	
<i>Glu-B3</i>	<i>b</i>		5.00
	<i>b'</i>		2.50
	<i>c</i>		5.00
	<i>d</i>		27.50
	<i>f</i>		7.50
	<i>g</i>		27.50
	<i>h</i>		10.00
	<i>i</i>		5.00
	<i>j</i>		10.00
	H index		0.81
<i>Glu-D3</i>	<i>a</i>		12.50
	<i>b</i>		52.50
	<i>c</i>		35.00
	H index		0.59

Table 4. Allele frequencies of HMW and LMW glutenin and genetic index diversity at the *Glu-1*, *Glu-3* and *Glu-B2* loci of Saharan durum wheats

Locus	Allele	Subunit	Frequency (%)
<i>Glu-A1</i>	<i>b</i>	2*	6.67
	<i>VI</i>	2***	6.67
	<i>c</i>	null	86.67
	H index		0.24
<i>Glu-B1</i>	<i>b</i>	7+8	26.67
	<i>d</i>	6+8	10.00
	<i>e</i>	20	23.33
	<i>f</i>	13+16	13.33
	<i>h</i>	14+15	3.33
	<i>u</i>	7*+8	3.33
	<i>o</i>	6+22	6.67
	<i>VI</i>	19	6.67
	<i>new1</i>		6.67
	H index		0.83
<i>Glu-A3</i>	<i>a</i>	6	16.67
	<i>b</i>	5	23.33
	<i>c</i>	6+10	26.67
	<i>d</i>	6+11	13.33
	<i>e</i>	11	6.67
	<i>h</i>	null	10.00
	<i>j</i>	8+	3.33
H index		0.81	
<i>Glu-B3</i>	<i>a</i>	2+4+15+19	20.00
	<i>b</i>	8+9+13+16	20.00
	<i>c</i>	2+4+14+15+19	16.67
	<i>d</i>	2+4+14+17+19	3.33
	<i>f</i>	2+4+15+19	3.33
	<i>h</i>	1+3+14+18	23.33
	<i>i</i>	7+8+14+18	3.33
	<i>new2</i>		10.00
H index		0.82	
<i>Glu-B2</i>	<i>a</i>	12	36.67
	<i>b</i>	null	63.33
H index		0.46	

Sixteen different *Glu-1* alleles were found, three at *Glu-A1*, nine at *Glu-B1* and four at the *Glu-D1* locus, included one allele at the *Glu-B1* locus which had not previously been described in bread

wheat. This novel allele encoded a subunit with slightly faster mobility than subunit 7 encoded by the *Glu-B1a* allele. This new subunit, designated *new3*, was present in the cultivar Fritas. TAHIR *et al.* (1996) reported subunit 7f in bread wheat landraces from Pakistan and FANG *et al.* (2009) identified subunit 7** in Chinese endemic wheats with faster mobility than subunit 7. However, without making a direct comparison, it is not possible to decide whether subunit 7 detected in the study is identical or not to subunit 7f or 7**. At the *Glu-A1* locus, allelic distribution among the 40 cultivars was 50% and 42.5% for the two alleles *c* and *b*, respectively, and lower for allele *a* with 7.5%. At the *Glu-B1* locus, alleles *b* encoding for subunits 7+8, *g* encoding for subunits 13+19, *i* for subunits 17+18, and the new one were rare at 2.5%. Otherwise, the most frequent alleles were *Glu-B1e* and *Glu-B1a* encoding for subunits 20 and 7 with 40% and 22.5%, respectively. At the *Glu-D1* locus, subunits 2+12 encoded by *Glu-D1a* were predominant (85%). The less frequent alleles were *Glu-D1d* (5+10), observed only in four cultivars, *Glu-D1b* (3+12) and *Glu-D1e* (2+11) were found only in one cultivar each. Using the bread

wheat nomenclature proposed by BRANLARD *et al.* (2003) for LMW glutenin subunits, we were able to identify 16 LMW subunits among the 40 cultivars. The *Glu-B3d* and *Glu-B3g* alleles were frequent in the collection (27.5%). Otherwise, the less frequent alleles were the allele *b'* (2.5%), allele *b*, *c* and *i* (5%) and alleles *f*, *h* and *j* (7.5% and 10%), respectively. Concerning the *Glu-A3* locus, 90% of the collection analysed can be characterized by two alleles only: *Glu-A3a* and *Glu-A3d* found in 60% and 30% of the cultivars, respectively. The two other alleles *b* and *f* were less common. For the *Glu-D3* locus, we observed one allele at a low frequency: *Glu-D3a* encoded only in five cultivars (12.5%). The most frequently observed allele was *Glu-D3b* (52.5%). Moreover *Glu-D3c* was found in fourteen cultivars (35%).

In Saharan durum wheats up to 12 allelic forms were detected at the *Glu-1* loci encoded for HMW-GS (Table 4). Three different alleles were detected at *Glu-A1* and nine at *Glu-B1*. Although three alleles were observed at the *Glu-A1* locus, the null allele (*Glu-B1c*) was found in most cultivars studied (86.67%). The *Glu-A1b* and *Glu-A1VI* alleles (encoding the 2* and 2*** subunits, respectively)

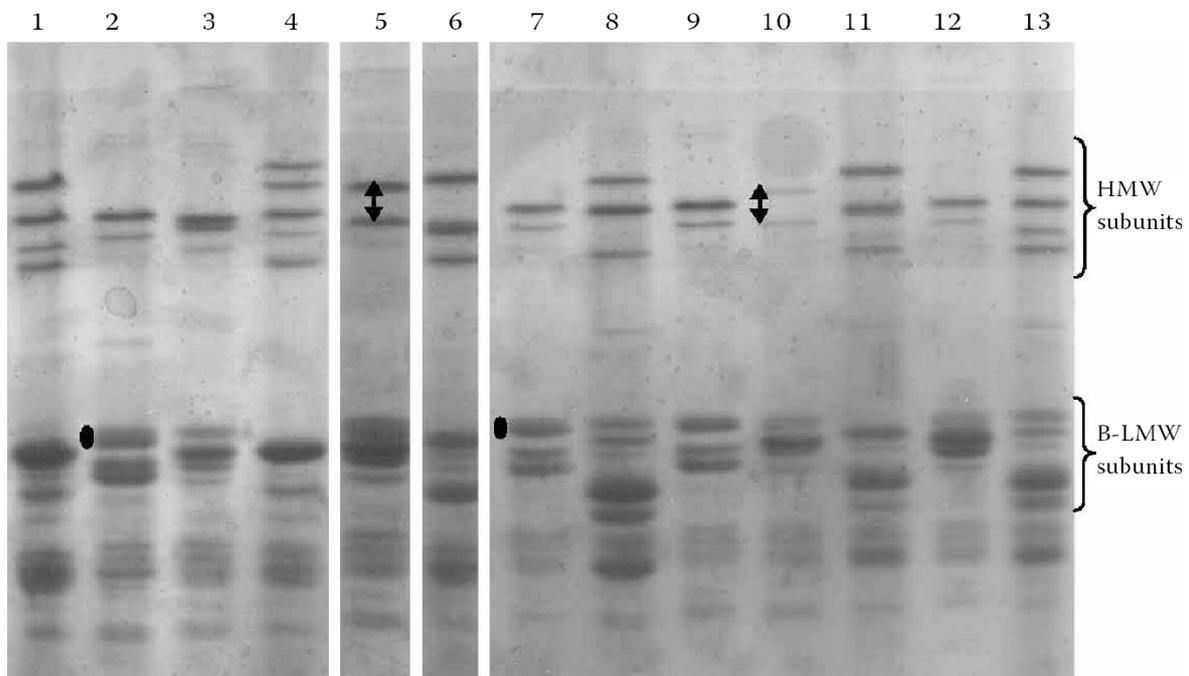


Figure 1. SDS-PAGE patterns of high molecular weight and low molecular weight glutenin subunits of Saharan durum wheat from Algerian oases; 1 – Democrat; 2 – M'zirâa; 3 – Kahlaya; 4 – Rempart; 5 – Djebli; 6 – Gabo; 7 – Ouled Khoudir; 8 – Vilmorin 53; 9 – El Ksor; 10 – Guemgoum Erksam1; 11 – Atlass 66; 12 – Chegga; 13 – Recital (lanes 1, 4, 6, 8, 11 and 13 wheat checks); ↑ – *Glu-B1new1*, ● – *Glu-B3new2*

appeared at a lower frequency (6.67%), as each was present only in two cultivars among the 30 cultivars analysed. At the *Glu-B1* locus, a total of 9 alleles were detected, of which one allele and two subunits were not described previously. The *Glu-B1b* allele (encoding the subunit pair 7+8) and *Glu-B1e* (subunit 20) were the most frequent at a frequency of 26.67% and 23.33%, respectively. Other alleles occurring at a relatively high frequency (13.33% and 10%) were *Glu-B1f* (encoding subunit pairs 13+16) and *Glu-B1d* (encoding subunit pairs 6+8). The alleles *Glu-B1h*, encoding for subunit 14+15, and *Glu-B1u* encoding for 7*+8, were rare (3.33%). The new allele was found in two cultivars only: Djebli and Guemgoum Erksam1. This allele encodes two subunits, of which one had a slightly lower mobility than that of band 6 of pair 6+8 encoded by the *Glu-B1d* allele, the other new subunit moved slightly slower than subunit 18 (Figure 1). This set of Saharan durum wheat germplasm displays abundant allelic variation for LMW-GS. A total of 17 alleles were identified (Table 4). The identified low molecular weight glutenin subunits were those previously described by NIETO-TALADRIZ *et al.* (1997), except subunit 8+ encoded by the allele *Glu-A3j*, which was identified by CHERDOUH *et al.* (2005). The most common allele at *Glu-A3* was *Glu-A3c* encoding subunits 6+10 with a frequency of 26.67%, followed by *Glu-A3b* encoding subunit 5 at 23.33%. The allele classified as rare was *Glu-B3j* (subunit 8+) detected at a lower frequency of 3.33%. At the *Glu-B3* locus, the frequency of *Glu-B3h* allele was 23.33%, and it was the most frequent followed by *Glu-B3a* and *Glu-B3b* with 20% each. Two other alleles, *Glu-B3c* and the new allele were considered relatively abundant at 16.67% and 10% respectively. At the *Glu-B2* locus, 36.66% of the collection was characterized as carrying the *Glu-B2a* allele. The null allele (*Glu-B2b*) was present in 63.33% of the collection.

DISCUSSION

Saharan bread wheats

The genetic diversity index of 0.59 was higher than the value 0.40 obtained in winter wheat cultivars from the Czech Republic (BRADOVÁ & ŠTOČKOVÁ 2010). All the loci, except *Glu-D1*, displayed a genetic variability higher than 0.50, *Glu-B3* being the most polymorphic (Table 3). The

number of alleles detected at the *Glu-1* and *Glu-3* loci was higher than that in other collections. The HMW-GS composition had been widely used to assess the genetic diversity and grain quality of wheat. The frequency of a number of subunits in the Saharan bread wheats differed considerably from that noted in the previous study. Subunit 1 at *Glu-A1*, subunits 7+8, 7+9, 6+8, 13+19, 17+18, 6+22 and the new allele at *Glu-B1* and subunits 3+12 and 2+11 at *Glu-D1* appeared less frequently in this study while subunits 20 and 7 at *Glu-B1* were observed more frequently. A total of 16 alleles encoding for HMW-GS were present in only 40 cultivars of Saharan bread wheat and this high level of diversity agrees with the results of FANG *et al.* (2009) and with the results of WEI *et al.* (2001). Major differences between Saharan wheats and other collections were observed in the frequency of subunit 7 although Saharan wheats had subunit pair 6+22 (4 varieties) controlled by *Glu-B1o*. The effect of these subunits on wheat quality still remains unclear. No Saharan varieties possessed subunit pair 14+15 controlled by *Glu-B1h*, which was in the other collections. The forty Saharan bread wheats had a somewhat rare subunit pair; 17+18 (Chetla), subunit 20 (16 varieties), and subunit 13+19 (Touatia3). It is thus clear that allelic variation among the Saharan bread wheats is considerable at the *Glu-B1* locus. Subunit pair 5+10 at the *Glu-D1* allele is seen more frequently in European (PAYNE *et al.* 1984) than in Saharan wheat cultivars, possibly owing to their correlation with good bread-making quality. The mean genetic variation index at *Glu1* was 0.53. It was higher than that reported for other collections, showing that Saharan hexaploid wheats have relatively high genetic diversity. High diversity was found in the Saharan wheats for LMW-GS. The *Glu-A3a* allele was the most frequent as it was in French cultivars (BRANLARD *et al.* 2003) and winter wheats from the Czech Republic (BRADOVÁ & ŠTOČKOVÁ 2010). The number of alleles detected at *Glu-B3* (9 alleles) was the same as that found by DARBANDI *et al.* (2010) in Iranian cultivars and seven of them were present in both collections. The most frequent alleles were *Glu-B3d* and *Glu-B3g*. The same results were observed in French cultivars and winter wheat cultivars from the Czech Republic for *Glu-B3g* allele, but *Glu-B3d* was less frequent in both collections. The allele *b* was the most frequent at the *Glu-D3* locus in Saharan cultivars as it was in Iranian cultivars.

Conversely, BRANLARD *et al.* (2003) and BRADOVÁ and ŠTOČKOVÁ (2010) found that *Glu-D3c* was the predominant allele.

Saharan durum wheats

The results obtained showed rather a high polymorphism in HMW-GS and LMW-GS variation, especially for the *Glu-B1* and *Glu-B3* loci. A total of 29 different alleles were identified for the five glutenin loci studied. Two new alleles were found, one at *Glu-B1* and the other at *Glu-B3*. For the *Glu-B1* locus, some alleles are very frequent: more particularly the alleles *Glu-B1b* and *Glu-B1e* encoding subunits 7+8 and 20, respectively. These results are in agreement with those of MORAGUES *et al.* (2006), three alleles at *Glu-A1* and 14 alleles at the *Glu-B1* locus, where *Glu-B1e* and *Glu-B1b* were the most frequent. They agreed also with the results reported by CARRILLO (1995). However, most cultivars of Saharan durum wheat analysed do not have subunit 6+8 encoded by *Glu-B1d*. Conversely, HAMDÍ *et al.* (2010) found that *Glu-B1e* and *Glu-B1d* were predominant in 856 accessions of durum wheat collected in Algeria. Similar results were obtained by CHERDOUH *et al.* (2005), who studied genetic diversity in a set of 45 Algerian durum wheat landraces and old cultivars and observed that *Glu-B1e* and *Glu-B1d* alleles were predominant. For the B-LMW glutenins, seven, eight and two were observed at *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-B2*, respectively, in Saharan wheats. Six of the seven alleles detected at the *Glu-A3* locus were the same as those found by HAMDÍ *et al.* (2010). The *Glu-A3c* allele was the most frequent in our study. Most of the glutenin alleles found among modern cultivars (NIETO-TALADRIZ *et al.* 1997, 2000; IGREJAS *et al.* 1999) are present in the analysed Saharan durum wheat collection. On the other hand, rare LMW glutenin alleles have only been found in old Spanish and Portuguese cultivars (NIETO-TALADRIZ *et al.* 1997; BRITES & CARRILLO 2000). Among those rare alleles (*Glu-A3e, f, g, i, Glu-B3d, e, f, g, h, i, j, k*), *Glu-A3e*, *Glu-B3d*, *Glu-B3f*, *Glu-B3h*, *Glu-B3i* were present in Saharan durum wheats. The genetic variability at 0.63 was higher than 0.36, which was obtained in cultivars from Portugal (IGREJAS *et al.* 1999), contrary, it was lower than 0.72 found in durum wheat landraces from Spain (AGUIRIANO *et al.* 2008), and 0.67 obtained in Mediterranean landraces (MOR-

AGUES *et al.* 2006). From the quality point of view, Saharan durum wheats from Algeria have a high percentage of HMW and B-LMW glutenin alleles related to grain quality such as *Glu-A1a* (KAAN *et al.* 1993; AGHAI *et al.* 1996), *GluB1a* and *Glu-B1d*, but the HMW glutenin subunits appear to play a much less important role in the end-use quality of durum wheat (DU CROS 1987), and only *Glu-B1e* has been related with poor quality (CARRILLO *et al.* 1990; NIETO-TALADRIZ *et al.* 2000). B-LMW glutenin alleles related to high gluten strength were observed such as *Glu-A3a*, *Glu-A3c*, *Glu-A3d*, *Glu-A3h* and *Glu-B3a*, *Glu-B3c* (CARRILLO *et al.* 2000). It would be interesting to make a quality evaluation of these lines, mainly to determine the effect on quality of the alleles and allele combinations for which no data are available. This information could be useful to select local varieties with improved quality, and also to use them as a source of genes to develop new lines when breeding for quality.

In conclusion, this work shows that Saharan wheats from Algerian oases have extensive allelic variation in HMW-GS and LMW-GS, including new alleles. This indicates that Saharan wheats have a potential value in wheat breeding, and that further studies of their diversity are warranted.

References

- AGHAI J., ABD-MISHANI S., KHODABANDEH N. (1996): Genetic variation and geographical diversity for seed storage proteins of Iranian durum wheat collection. Iranian Journal of Agricultural Sciences, 27: 105–113.
- AGUIRIANO E., RUIZ M., FITÉ R., CARRILLO J.M. (2008): Genetic variation for glutenin and gliadins associated with quality in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *turgidum*) landraces from Spain. Spanish Journal of Agricultural Research, 6: 599–609.
- BRADOVÁ J., ŠTOČKOVÁ L. (2010): Evaluation of winter wheat collection in terms of HMW- and LMW-glutenin subunits. Czech Journal of Genetic and Plant Breeding, 46 (Special Issue): S96–S99.
- BRANLARD G., DARDEVET M., SACCOMANO R., LAGOUTTE F., GOURDON J. (2001): Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. Euphytica, 119: 59–67.
- BRANLARD G., DARDEVET M., AMIOUR N., IGREJAS G. (2003): Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 50: 669–679.

- BRITES C., CARRILLO J.M. (2000): Inheritance of gliadin and glutenin proteins in four durum wheat crosses. *Cereal Research Communication*, **28**: 239–246.
- CARRILLO J.M. (1995): Variability for glutenin proteins in Spanish durum wheat landraces. *CIHEAM – Options Méditerranéennes Serie A, Seminars Méditerranéennes*, 143–147.
- CARRILLO J.M., VAZQUEZ J.F., ORELLANA J. (1990): Relationship between gluten strength and glutenin proteins in durum wheat cultivars. *Plant Breeding*, **104**: 325–333.
- CARRILLO J.M., MARTÍNEZ M.C., MOITA BRITES C., NIETO-TALADRIZ M.T., VÁSQUEZ J.F. (2000): Relationship between endosperm proteins and quality in durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum*). *CIHEAM – Options Méditerranéennes Serie A/40*, 463–467.
- CHERDOUH A., KHELIFI D., CARRILLO J.M., NIETO-TALADRIZ M.T. (2005): The high and low molecular weight glutenin polymorphism of Algerian durum wheat landraces and old cultivars. *Plant Breeding*, **124**: 338–342.
- DARBANDI A.I., SAMADI B.Y., BOUSHEHRI A.A.S., MOHAMMADI M. (2010): Allelic variations in *Glu-1* and *Glu3* loci of historical and modern Iranian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of Genetics*, **89**: 193–199.
- DU CROS D.L. (1987): Glutenin protein and gluten strength in durum wheat. *Journal of Cereal Sciences*, **5**: 3–12.
- ERROUX J. (1958): Note sur les blés des oasis du Sahara algérien. *Bulletin de la Société des Histoires de la Nature de l'Afrique du Nord*, **49**: 56.
- FANG J., LIU Y., LUO J., WANG Y., SHEWRY P.R., HE G. (2009): Allelic variation and genetic diversity of high molecular weight glutenin subunit in Chinese endemic wheats (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, **166**: 177–182.
- HAMDI W., BELLIL I., BRANLARD G., KHELIFI D. (2010): Genetic variation and geographical diversity for seed storage proteins of seventeen durum wheat populations collected in Algeria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **38**: 22–32.
- IGREJAS G., GUEDES-PINTO H., CARNIDE V., BRANLARD G. (1999): The high and low molecular weight glutenin subunits and ω -gliadin composition of bread and durum wheats commonly grown in Portugal. *Plant Breeding*, **118**: 297–302.
- JACKSON E.A., HOLT L.M., PAYNE P.I. (1983): Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal location of their controlling genes. *Theoretical and Applied Genetics*, **66**: 29–37.
- KAAN F., BRANLARD G., CHIHAAB B., BORRIS C., MONNEVEUX P. (1993): Relations between genes coding for grain storage protein and two pasta cooking quality criteria among durum wheat (*T. durum* Desf.) genetic resources. *Journal of Genetics and Breeding*, **47**: 151–156.
- KUDRYAVTSEV A.M., BOGGINI G., BENEDETTELLI S., ILLICHEVSKII N.N. (1996): Gliadins polymorphism and genetic diversity of modern Italian durum wheat. *Journal of Genetics and Breeding*, **50**: 239–248.
- MIEGE E. (1924): Sur les divers *Triticum* cultivés au Maroc. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles du Maroc*, **4**: 5–6.
- MORAGUES M., ZARCO-HERNANDEZ J.F., MORALEJO M.A., ROYO C. (2006): Genetic diversity of glutenin protein subunits composition in durum wheat landraces (*Triticum turgidum* ssp. *Tugidum* convar. *durum* (Desf.) Mackey) from the Mediterranean basin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**: 993–1002.
- NEI M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**: 3321–3323.
- NIETO-TALADRIZ M.T., RUIZ M., MARTÍNEZ M.C., VÁSQUEZ J.F., CARRILLO J.M. (1997): Variation and classification of B low-molecular-weight glutenin subunit alleles in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **95**: 1155–1160.
- NIETO-TALADRIZ M.T., RODRIGUEZ-QUIJANO M., CARRILLO J.M. (2000): Glutenin proteins as markers for durum wheat quality selection. In: *Actes du 1^{er} Symposium International sur la Filière Blé, Office Algérien Interprofessionnel des céréales*, 267–270.
- PAYNE P.I., LAWRENCE G.J. (1983): Catalogues of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communication*, **11**: 29–35.
- PAYNE P.I., LAW C.N., MUDD E.E. (1980): Control of homoeologous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, **58**: 113–120.
- PAYNE P.I., HOLT L.M., JACKSON E.A., LAW C.N., DAMANIA A.B. (1984): Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **304**: 359–371.
- RUIZ M., CARRILLO J.M. (1995): Relationships between different prolamins and some quality properties in durum wheat. *Plant Breeding*, **114**: 40–44.
- SINGH N.K., SHEPHERD K.W. (1988): Linkage mapping of the genes controlling endosperm storage proteins in

Czech J. Genet. Plant Breed., 48, 2012 (1): 23–32

- wheat. 1. Genes on the short arms of group-1 chromosome. Theoretical and Applied Genetics, **75**: 642–650.
- SINGH N.K., SHEPHERD K.W., CORNISH G.B. (1991): A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. Journal of Cereal Science, **14**: 203–208.
- TAHIR M., TURCHETTA T., ANWAR R., LAFIANDRA D. (1996): Assessment of genetic variability in hexaploid wheat landraces of Pakistan based on polymorphism for HMW glutenin subunits. Genetic Resources and Crop Evolution, **43**: 211–220.
- TURCHETTA T., CIAFFI M., PORCEDDU E., LAFIANDRA D. (1995): Relationship between electrophoretic pattern of storage proteins and gluten strength in durum wheat landraces from Turkey. Plant Breeding, **114**: 406–412.
- WEI Y.M., ZHENG Y.L., ZHOU Y.H., LIU D.C., LAN X.J., YAN Z.H. et al (2001): Genetic diversity of *Gli-1*, *Gli-2* and *Glu-1* alleles among Chinese endemic wheats. Acta Botanica Sinica, **43**: 834–839.

Received for publication August 22, 2011
Accepted after corrections January 10, 2012

Corresponding author:

Prof. DOUADI KHELIFI, Université Mentouri, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, 25 000 Constantine, Algérie
e-mail: dkhelifi@yahoo.fr

Partie II

Recherche et caractérisation des allergènes

*La meilleure gymnastique matinale pour un
Scientifique est de jeter sa théorie préférée par-
Dessus bord.*

Konrad Lorenz

I. Préambule

Les premiers objectifs de cette deuxième partie de la thèse visent à caractériser les principaux allergènes de blé et/ou de céréales, à décomposer la réponse IgE spécifiques afin d'évaluer la part des différentes familles protéiques dans l'allergénicité du blé. L'extraction et l'identification des allergènes ont été réalisées par des méthodes biochimiques d'extraction et de séparation des protéines à partir de la graine. Une telle démarche devrait permettre d'obtenir la représentation la plus fidèle possible des allergènes du blé en tenant compte de leurs existences sous de multiples formes notamment dégradées et associées.

Ce chapitre se décompose en deux parties successives. Une première partie, pierre angulaire de l'étude, rapporte l'extraction et l'identification de nombreuses protéines du blé. Une deuxième partie évalue l'immunoréactivité des entités protéiques identifiées à l'aide de tests *in vitro*.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Sérums de patients

Huit sérums de patients algériens provenant du service d'allergologie du CHU de Constantine et six sérums de patients français provenant du service d'allergologie du CHU de Nancy atteints d'une allergie à la farine de blé certaine, déterminée par les symptômes cliniques et les tests de dépistage ont été étudiés. Parmi les 14 sérums, 3 enfants et 11 adultes ont été recensés.

1.2. Variétés de céréale

La première partie de la thèse se rapportant à l'analyse de la diversité génétique des céréales nous a permis de choisir les variétés de blé et de triticales génétiquement éloignées pour la recherche et la caractérisation de leurs allergènes. Un total de dix variétés a été retenu. Trois variétés de triticales : Chelia, Fahd, Pollmer ; cinq variétés de blé : deux variétés de blé botanique : Affine1 et Africa2 et trois variétés de blé saharien : Kahlaya, Beds et Tazzi. Deux variétés de seigle : Local et Petka ont été rajoutées.

1.3. Antigènes utilisés en ELISA

Les différentes fractions α , β , γ et ω gliadines, les gliadines totales et les sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire (SU-FPM et SU-HPM), un mélange des

Albumines/globulines ainsi qu'une protéine de transfert de lipides du blé (LTP) et une serpine de blé sont utilisés comme antigènes pour les tests immunochimiques (ELISA).

1.4. Anticorps dirigés contre différentes protéines de blé

Des anticorps monoclonaux de souris et polyclonaux de lapin sont utilisés pour rechercher la présence de certains épitopes allergènes dans les différentes fractions gliadines, gluténines et albumines/globulines des 10 variétés étudiées. Les anticorps utilisés sont dirigés contre :

- AC polyclonal anti : N-terminal des γ gliadines : NIQVDPSGY
- AC polyclonal anti : N-terminal des ω_2 gliadines : ARELNPSNKELGC
- AC polyclonal anti : Domaine répétitif des gluténines HPM : GYYPTSPQQPGC
- AC polyclonal anti : C-terminal des gluténines FPM : CVGTGVGAY
- AC polyclonal anti : LTP
- AC polyclonal anti : Puroindoline
- AC polyclonal anti : Serpine
- AC monoclonal anti : N-terminal des ω_5 gliadines : SRLSPRGKELGC
- AC monoclonal anti : C-terminal des α/β gliadines : CTIARFGIFGTN
- AC monoclonal anti : N-terminal des gluténines FPM : SHIPGLERPSGC

Il est à noter que ces anticorps détectent spécifiquement les protéines contre lesquelles ils sont dirigés

2. Méthodes

2.1. Extraction séquentielle des protéines de la farine de blé

Le « fractionnement d'Osborne » a constitué très rapidement la référence des méthodes d'extraction et de purification des protéines des plantes. Cette procédure, décrite par Osborne en 1924, assemble différentes méthodes d'extraction en un fractionnement séquentiel. Elle s'applique à tout matériel de graines broyées et s'appuie sur les différentes propriétés de solubilité des familles de protéines de plantes. Les albumines sont extraites uniquement dans l'eau, les globulines dans des solutions salines de concentration en NaCl de 0,5 à 1 M et les prolamines dans une solution d'alcool, généralement de l'éthanol à 60-70%, enfin, les glutélines dans des solutions diluées d'acides ou de bases. Seule une très faible proportion des protéines totales reste dans le résidu. Cette procédure a souvent été modifiée, notamment en remplaçant l'éthanol par d'autres alcools comme le propanol-1 (50%, v/v), en incluant des agents réducteurs pour séparer les sous-unités des polymères associées par des ponts

disulfures présentes dans les extraits de prolamines, ou encore en extrayant les glutélines avec des détergents (comme le SDS, le CHAPS) et/ou des agents chaotropiques (comme l'urée, le thiourée) à la place d'acides ou de bases qui peuvent provoquer des dégradations partielles.

2.1.1. Extraction des Albumines/Globulines et des Prolamines

Les extractions des protéines de céréales tout en s'appuyant sur les propriétés précédemment décrites, ont mis en jeu des méthodologies propres à ces céréales.

Les protéines sont extraites à partir de différentes farines de blé, de triticale et de seigle. 3g de chaque farine des différentes variétés sont solubilisés dans 100 ml de tampon phosphate/NaCl 0,05 M pH 7,8. Après agitation pendant 2 heures à 4°C, l'extrait est centrifugé à 12 000 t/min pendant 20 minutes à 4°C. Les surnageants récupérés contenant les albumines/globulines, sont alors dialysés contre de l'eau (cut-off 6000 Da) à 4°C pendant 4 jours, pour finalement être congelés et lyophilisés. Les culots restants sont lavés deux fois avec le tampon phosphate/NaCl 0,05 M et centrifugés à chaque fois à 12 000 t/min pendant 20 minutes à 4°C.

Les culots sont repris dans 100 ml d'éthanol 50 %. Après agitation pendant une heure à température ambiante, les extraits sont centrifugés à 12 000 t/min, 20 minutes à température ambiante. Les surnageants contenant les gliadines sont récupérés et dialysés contre de l'acide acétique 1N dilué au 1/100^{ème} à 4°C pendant 3 jours (cut-off 14000 Da), pour finalement être congelés et lyophilisés.

L'extraction des gluténines est réalisée selon la méthode de SINGH *et al.*, 1991. Les culots sont rincés trois fois à l'éthanol 50 %, centrifugés à chaque fois à 12 000 t/min pendant 20 minutes à température ambiante, puis repris dans 15 ml de tampon contenant 1 % (p/v) de DTT 1 M, 0,1 M de Tris/HCl pH 8,5, 50 % de propanol. Après agitation à 60 °C pendant 1 heure, 15 ml de tampon contenant 1.4 % de 4-vinylpyridine, 1 % (p/v) de DTT 1 M, 50 % de propanol, 0,1 M de Tris/HCl pH 8,5 sont ajoutés. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, les extraits sont centrifugés à 12 000 t/min pendant 20 minutes à température ambiante. Les surnageants contenant les gluténines sont récupérés et dialysés contre une solution d'acide acétique 1N dilué au 1/100^{ème} à 4°C pendant 4 jours (cut-off 14000 Da), pour finalement être congelés et lyophilisés.

2.1.2. Extraction des fractions Métaboliques et CM-Like

Pour avoir une extraction complète des différentes protéines de la fraction soluble, une extraction selon William *et al.* (2004) est réalisée. Les protéines sont séparées en deux

fractions, la fraction des protéines métaboliques et la fraction des protéines solubles dans le Chloroforme/Méthanol ou CM-Like, basée sur leur solubilité dans le KCl et le méthanol.

2g de chaque farine des dix variétés de blé, de triticale et de seigle sont mis en suspension dans 6 ml de tampon KCl froid contenant 50mM Tris/HCl, 100mM KCl, 5mM EDTA pH 7.8. La suspension est incubée dans la glace pendant 2 heures avec une agitation intermédiaire tous les 20 minutes, puis centrifugée à 8500 t/min pendant 40 minutes à 4°C. Les surnageants ou fractions des protéines solubles dans le KCl sont récupérés et 5 fois le volume d'Acétate d'ammonium 0.1M dans le Méthanol sont rajoutés à température ambiante. Après incubation pendant une nuit à -20°C, les fractions des protéines insolubles dans le méthanol sont obtenues par centrifugation à 8500t/min pendant 45 minutes à 4°C. Les culots ou les fractions métaboliques sont ensuite lavés avec de l'acétone froid. Les surnageants ou les fractions solubles dans le méthanol sont précipités avec de l'acétone froid (1V/5V) toute la nuit à -20°C. Les fractions CM-Like sont obtenues par centrifugation à 8500 t/min pendant 45 minutes à 4°C puis lavées trois fois avec l'acétone froid.

2.2. Caractérisation des fractions protéiques extraites

2.2.1. Dosage des protéines par la méthode BCA (Bicinchonic Acid Pierce) sur microplaques

C'est un dosage qui permet la quantification des protéines solubles. Le BC Assay est basé sur une réaction colorimétrique, il consiste en la réduction des ions Cu^{++} en Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines. Le BCA (acide bicinchonique) chélate les ions Cu^+ avec une très forte spécificité pour former un complexe soluble coloré en violet. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu^+ final à une longueur d'onde de 450 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique. Celle-ci peut être calculée à l'aide de la courbe obtenue avec une gamme protéique de référence.

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) à 2mg/ml . La BSA est diluée dans le tampon Carbonate 0,05M pH 9.6 à des concentrations variant de 20 à 200 $\mu\text{g/ml}$ pour le dosage des Albumines/Globulines, des fractions métaboliques et CM-Like ; dans l'éthanol 50% pour le dosage des gliadines et dans du Carbonate 0,05M pH 9.6 / SDS 0.1% pour le dosage des gluténines.

Les fractions protéiques sont utilisées pures, au $\frac{1}{2}$ et au $\frac{1}{4}$ dans le tampon approprié. La solution de travail est préparée en diluant au $\frac{1}{50}^{\text{ème}}$ le réactif B (CuSO_4) dans le réactif A (BCA). 10 μl de solution étalon ou d'échantillon et 200 μl de solution de travail sont déposés dans chaque puits. La plaque est couverte et incubée sous agitation une heure à 60°C. Après

avoir laissé refroidir 30 minutes à température ambiante, la densité optique (DO) et lue à 540 nm.

2.2.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

Aux différentes étapes d'extraction, la composition protéique des différentes fractions est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS) et réductrices (présence de β -mercaptoéthanol) avec un système vertical Midgel (Pharmacia). L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Le gel de séparation contient 12% ou 15% de polyacrylamide et le gel d'alignement 6%.

Les échantillons sont dénaturés par chauffage à 100°C en bain-marie pendant 1 minute 30 secondes avec un tampon de solubilisation (Tris 0,62M pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01%).

Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 KDa à 250 KDa. Les échantillons sont déposés à raison de 5 à 10 μ l pour une concentration de 5 à 10 μ g/ml et de 5 à 8 μ l pour le kit de calibration pour une concentration de 6 à 8 μ g.

La migration est effectuée à 20 mA pour le gel d'alignement et 40 mA pour le gel de séparation dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 0,192 M de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie. Les gels sont tout d'abord traités dans une solution de fixation correspondant à l'acide trichloracétique à 10% pendant 10 min, puis colorés toute la nuit avec une solution de Bleu de Coomassie G250 à 0,4%, et enfin décolorés dans une solution d'acide acétique 5%.

2.2.3. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse 2D permet une séparation résolutive des protéines qui permet de séparer les protéines en deux temps : d'abord suivant leur point isoélectrique puis en fonction leur masse moléculaire.

Un milligramme d'un mélange de protéines (extrait brut) est repris dans 1 ml de tampon de réhydratation (Urée 8 M, 2% CHAPS (m/v), Thiourée 2 M, bleu de bromophénol) contenant 0,5% ampholytes ou IPG-buffer 3-10 (v/v) et 0,28% DTT (m/v). Cette solution est mise en incubation avec une bandelette de gel de polyacrylamide ou strip de gradient linéaire de pH 3 à 10 qui est recouvert d'huile (Dry Strip Cover fluid) pour éviter toute déshydratation dans un sarcophage approprié pendant 12 heures 50 minutes à 30 V à température ambiante.

L'isoélectrofocalisation, réalisée à l'aide du système IPG Runner, est menée à 100 V pendant 1 heure, puis à 500 V pendant 1 heure, à 1000 V pendant 1 heure, à 5000 V pendant une heure et enfin à 8000 V pendant 2 heures. Les strips peuvent être conservés individuellement à -80°C ou utilisées immédiatement pour la séparation en gel de polyacrylamide après une étape d'équilibration.

Les strips sont rééquilibrés en deux étapes:

- dans 6 ml de tampon d'équilibration réducteur (Tris-HCl pH 8.8 50 mM, Urée 50 mM glycérol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), bleu de bromophénol) contenant 1% DTT (m/v), sous agitation pendant 10 min à température ambiante.
- puis dans 6 ml de tampon d'équilibration et d'alkylation contenant 2,5% Iodoacétamide (m/v), sous agitation pendant 10 min à température ambiante.

Les strips sont ensuite déposés dans le puits unique du gel de polyacrylamide, et la séparation selon la masse moléculaire est réalisée avec des gels de polyacrylamide à 15%. Les marqueurs de taille utilisés couvrent une gamme de masse moléculaire de 10kDa à 250 KDa. La migration est menée à 20 mA par gel pendant 5 heures 30 minutes dans un tampon de migration TGS (Tris base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1% (m/v)).

Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie colloïdal. Les gels sont tout d'abord traités dans une solution de fixation correspondant à un mélange de 2% acide phosphorique et 50% éthanol pendant 2 heures avec un changement intermédiaire du bain. Après un lavage avec de l'acide phosphorique à 2% pendant 1 heure, les gels sont incubés dans une solution de sensibilisation contenant 17% éthanol, 15% sulfate d'ammonium (m/v) et 2% acide phosphorique, pendant 20 minutes puis colorés avec une solution de bleu de Coomassie G250 à 0,1% (m/v) dans le bain précédent pour être à la fin rincés à l'eau puis à l'éthanol pendant 10 minutes.

2.2.4. Analyse d'image

Afin de comparer les différents gels entre eux, le logiciel Image Master 2D Platinum (GE healthcare) a été utilisé. La première étape consiste à détecter automatiquement les spots, pour cela on dispose de trois paramètres réglables afin d'affiner la détection par le logiciel. Ces paramètres sont le lissage, la surface minimale du spot et la saillance. Ensuite un travail manuel de réduction, suppression, ajout de spots est nécessaire afin d'améliorer la détection

automatique. Une fois ce travail effectué sur l'ensemble des gels, il peut être nécessaire d'ajouter des repères sur chaque image pour aider la reconnaissance des spots communs entre deux ou plusieurs images. Le logiciel effectue ensuite la comparaison automatiquement et identifie les spots communs.

2.3. Détection des allergènes par immunoempreinte

2.3.1. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Afin d'identifier les protéines allergènes par immunodétection, un transfert sur une membrane de nitrocellulose des protéines séparées par électrophorèse est indispensable. Ainsi les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sous l'action d'un champ électrique et en présence de SDS sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane servira de support à la révélation par les anticorps.

Le transfert a lieu dans un tampon Tris 25mM, SDS 0,1 % (p/v), glycine 192 mM, éthanol 20 %. Il s'agit d'un transfert en milieu liquide à une intensité de 250 mA, pendant 1 heure pour les albumines/globulines, 45minutes pour les fractions CM-Like et Métaboliques et 2 h 30 pour les gluténines et gliadines. Après transfert, une partie de la membrane est découpée et colorée au noir amide (noir amide 0,1 %, isopropanol 25 %, acide acétique 10 %), décolorée après 30 minutes dans un mélange isopropanol 25 %, acide acétique 10%, rincée à l'eau puis séchée. Le gel après transfert est coloré au bleu de Coomassie G 250 une nuit pour contrôler le transfert complet des protéines sur la membrane, puis décoloré dans l'acide acétique à 5 %. La membrane est rincée dans du PBS (NaCl 0,136 M, KCl 2,68 mM, KH₂ PO₄ 1,46 mM, Na₂ HPO₄ 81 Mm) puis séchée.

2.3.2. Immunoblotting sur les membranes de nitrocellulose

La révélation par chimioluminescence est une des techniques utilisées pour détecter la présence d'IgE dirigées contre une ou plusieurs allergènes contenus dans un extrait protéique. Le substrat luminescent permet d'augmenter la sensibilité de la détection des IgE qui sont présentes en faible quantité dans le sérum et plus encore quand elles liées à l'allergène isolé dans le cas des membranes de transfert. Suite au transfert la membrane est incubée avec le sérum du patient. L'ajout d'un anticorps anti IgE humaine couplé à une enzyme et l'utilisation d'un substrat de l'enzyme luminescent permet de révéler la liaison des IgE avec un ou plusieurs protéines.

Une première étape de saturation est nécessaire afin de bloquer tous les sites de fixation non utilisés de la membrane. Elle se réalise en trempant la membrane pendant 4 heures dans la solution de saturation (PBS/Tween 20 à 0,1% (v/v), Polyvenylpyrrolidone (PVP) 4% (m/v)). Trois rinçage de 10 minutes avec la solution de lavage (PBS/Tween 20 0,1% (v/v), PVP 2% (m/v)) sont effectués. Puis le sérum du patient allergique est incubé avec la membrane pendant une nuit (environ 15 heures) dilué au 1/20^{ème} dans la solution de lavage. A la fin de l'incubation, la membrane est de nouveau rincée 4 fois dans la solution de lavage. Le complexe antigène-IgE formé lors de l'incubation avec le sérum est détecté par l'utilisation d'un anticorps secondaire. Pour cela, un anticorps polyclonal de lapin anti IgE humaine conjugué à la peroxydase a été utilisé. Cet anticorps est dilué au 1/100000^{ème} dans la solution de lavage puis incubé avec la membrane pendant 1 heure. La membrane est ensuite rincée 4 fois dans la solution de lavage, puis 2 fois dans le PBS seul. Pour la révélation, un kit « Super Signal^R West Dura Extended Duration Substrate » contenant une deux solutions distinctes, une solution peroxyde stable et Luminol/Enhancer solution est utilisé. Un volume égal de chacune des deux solutions est mis en incubation pendant 5 minutes à 37°C. Les deux volumes sont ensuite mélangé puis incubés avec la membrane pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. L'excès du substrat est éliminé, la membrane est séchée entre deux buvards, puis placée entre deux feuilles de transparent. Ensuite, la caméra « Fujifilm Intelligent Dark Box » est utilisée pour révéler les bandes ayant réagies, par chéniluminescence. Les paramètres de révélation, que l'on peut ajuster selon besoins sont les suivants : type d'exposition : par incrément, intervalle : 1 minute, résolution/sensibilité : super ou standard.

2.4. Tests immunochimiques, ELISA indirect

L'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) désigne un groupe de techniques qui permet de doser en phase solide soit l'antigène (Ag) soit l'Ac en utilisant un réactif couplé de façon covalente à une enzyme. Le test ELISA utilisé est simple, l'antigène est fixé sur les plaques de microtitration puis incubé avec le sérum à tester. Les molécules non fixées sont éliminées par simple lavage. La réaction Ag-Ac est révélée par l'ajout d'un deuxième Ac couplé à une enzyme (test indirect) dont le substrat est transformé en un produit coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'Ac liés à l'Ag (Butler, 1992).

2.4.1. Détection de certaines protéines dans les variétés par ELISA indirect avec des Ac polyclonaux de lapins ou monoclonaux de souris

Les gliadines de 8 variétés de blé et de triticale sont solubilisées à 1 mg/ml dans de l'éthanol 50 %, les gluténines dans du tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 contenant 0,1 % de SDS et 0,2 % de 2-mercaptoéthanol et les albumines/globulines dans du tampon carbonate 0,05 M pH 9. 100 µl/puits sont déposés et les plaques sont mises à incuber toute la nuit à température ambiante, afin de fixer les Ag au support plastique. Entre chaque étape, 3 lavages au PBS/Tween 20 0,05 % (v/v) sont effectués afin d'éliminer les molécules non liées pendant les incubations. Les sites restés libres sont saturés par 200 µl d'une solution de lait en poudre à 2 % (p/v) dans du PBS, pendant 1 heure à 37°C. Les Ac polyclonaux et monoclonaux sont dilués dans du PBS selon leurs dilutions optimales. 100 µl/puits sont distribués et mis à incuber 1 heure à 37°C. La réaction Ag/Ac est révélée par l'ajout d'un second Ac (anti-Ig) couplé à la peroxydase. Il s'agit d'une fraction IgG de chèvre anti-Ig de lapin pour les Ac polyclonaux ou d'une fraction IgG de chèvre anti-Ig de souris pour les Ac monoclonaux, dilués au 1/3000. 100 µl/puits sont déposés et mis à incuber pendant 1 heure à 37°C. La révélation est effectuée par l'addition de 100 µl/puits du substrat chromogène de l'enzyme, l'OPD (O-Phenylenediaminedihydrochloride) à 0,4 mg/ml dans du tampon Citrate 0,05 M pH 5.5. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la réaction enzyme-substrat est arrêtée par 50 µl/puits d'acide sulfurique 4N, puis la DO est lue à double longueur d'onde à 490 nm et 630 nm.

2.4.2. Dosage des IgE spécifiques des patients par ELISA indirect

Le protocole est similaire à celui décrit dans le chapitre précédent avec les différences suivantes. Les Ag sont mis à incuber à 37°C pendant 2 heures. Les sites restés libres sont saturés par 200 µl d'une solution de PBS/Tween 20 0,05 % (v/v) contenant de la gélatine, pendant une heure, à 37°C. Pour la recherche des IgE, les sérums sont dilués au 1/2 dans la solution de PBS/Tween/Gélatine. 100 µl/puits sont distribués et incubés à 37°C, pendant une nuit. L'Ac secondaire est un anticorps de chèvre anti-IgE humaines couplé à la phosphatase alcaline (ϵ -chaîne spécifique, Sigma). 100 µl/puits sont distribués et incubés à 37°C, pendant 2 heures. La révélation est effectuée par l'addition de 150 µl/puits du substrat fluorescent de l'enzyme, le 4-MUP (4-methylumbellifery phosphate, Sigma) dilué au 1/5^{ème} dans du tampon Tris/HCl 1 M pH 9.8. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la fluorescence est mesurée à 440 nm (excitation à 360 nm). La concentration des

IgE spécifiques liées aux différents antigènes est calculée à partir de la courbe de référence des IgE humaines qui montre que la fluorescence est supérieure à la limite de quantification.

Le bruit de fond est déterminé pour chaque sérum avec un puits sans Ag. La DO du puits sans Ag est retiré de la DO des sérums. Un sérum est considéré comme positif quand la réponse est deux fois supérieure à la réponse du sérum contrôle ou à la moyenne des sérums contrôles.

2.5. Identification des allergènes par spectrométrie de masse : Analyse protéomique

L'analyse protéomique associe la séparation des mélanges protéiques par électrophorèse mono ou bidimensionnelle en gel de polyacrylamide et l'analyse de la composition peptidique de chaque spot protéique à l'aide d'un spectromètre de masse.

2.5.1. Digestion trypsique « en gel »

Les bandes protéiques d'intérêt sont soigneusement excisées du gel à l'aide d'un scalpel après la coloration au bleu de coomassie G250 et découpées en petits cubes. Les différents cubes sont lavés pendant 1 heure sous agitation à température ambiante avec une solution de bicarbonate d'ammonium 25 mM puis déshydratés avec du tampon contenant 50% bicarbonate d'ammonium 25 mM et 50% d'acétonitrile. Les cubes sont par la suite réduits à 57°C dans du tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM contenant 10 mM de dithiothreitol (DTT) pendant 1 heure puis le tampon est éliminé et remplacé par du tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant 50% d'acétonitrile pendant 6 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite incubés dans une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM pH contenant 55 mM d'iodoacétamide pendant 45 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après ces étapes de réduction et de carbamidométhylation, les morceaux de gels sont lavés dans du tampon bicarbonate d'ammonium 25 mM contenant 50% d'acétonitrile puis déshydratés avec de l'acétonitrile et digérés par la trypsine à 15 µg.ml⁻¹ pendant une nuit à 37°C. La réaction est arrêtée par 1% d'acide formique, après centrifugation les digestats sont conservés à -20°C jusqu'à analyse par spectrométrie de masse.

2.5.2. Analyse de la carte peptidique massique par spectrométrie de masse LC MS-MS

Dans le cadre d'une analyse en LC MS/MS, on obtient un spectre de masse qui correspond à une liste de masse des peptides qui étaient présents dans l'échantillon mais également, pour chacun des peptides à une sous liste de masse qui correspond à la fragmentation de ce peptide et à partir de laquelle, la séquence du peptide peut être déduite. 8 µl du digestat sont récupérés et injectés en chromatographie liquide sur une colonne de phase inverse permettant la

séparation des peptides du digestat. Les analyses par spectrométrie en tandem (LC MS/MS) ont été réalisées sur Switchos Ultimate Capillary LC systems (LC Packings/Dionex, Amsterdam, the Netherlands) couplé à un hybride quadripôle orthogonal/temps de vol (Q-TOF Global Micromass/Waters, Manchester, UK). La séparation des peptides a été réalisée par chromatographie en phase inverse (Pepmap C18, 75- μ m.i.d., 15 cm length, LC Packings) avec un débit de 200 nl.min⁻¹ (gradient linéaire de 2% à 50% d'acétonitrile pendant 5 minutes puis augmentation rapide à 60% d'acétonitrile en 10 minutes). L'acquisition des données est effectuée par utilisation du logiciel Mass Lynx (Micromass/Waters) en mode « data dependent acquisition ». Les données ont été enregistrées pendant 1 seconde (m/z entre 400 et 1500) puis l'ion le plus intense est sélectionné et fragmenté dans la cellule de collision pendant 8 secondes. Les données MS/MS sont enregistrées pour des rapports m/z compris entre 50 et 1500. Les données de spectrométrie de masse ont été traitées par utilisation du logiciel « Protein Lynx Global Server (Micromass/Waters) version 2.2.

L'identification des protéines a été réalisée après recherche sur les banques de données UniProt restreinte à Viridiplante dans la banque Institute of Genomic Research (TIGR) expressed sequence tag (EST) (Blé). Chacune des protéines répertoriées dans ces banques peut être « digérée » artificiellement aboutissant à autant de spectres de masse théorique. La liste de masse obtenue expérimentalement est comparée par l'intermédiaire d'un logiciel à l'ensemble des listes de masses théoriques. La protéine d'intérêt est alors identifiée comme étant la protéine dans la liste de peptides théoriques présente le plus grand nombre de peptides comme avec la liste expérimentale. Les résultats d'identification des deux banques ont été confrontés afin d'obtenir l'identification finale.

III. Résultats et discussion

1. Caractérisation des sérums

1.1. Caractéristiques cliniques de patients allergiques

L'ensemble des travaux décrits dans ce chapitre repose sur un échantillon composé essentiellement de sérums de patients dont l'allergie au blé a été confirmée par des tests cliniques positifs. Les patients sont répartis en fonction de leur type d'allergie au blé et symptomatologie. Les caractéristiques cliniques sont détaillées dans le tableau 31.

Tableau 31 : profils cliniques des patients algériens allergiques à la farine de blé et concentration (ng/ml) de leurs IgE spécifiques sur différentes fractions protéiques testées en ELISA. EC : Eczéma de contact, ASTB : Asthme du boulanger, DA : Dermatite atopique, Urt : Urticaire, AIE : Anaphylaxie induite par l'effort, TD : Troubles digestifs, nd: non déterminé.

Type d'allergie	N° sérum	Age	symptômes	IgE spécifiques aux A/G					IgE spécifiques aux gliadines				IgE spécifiques aux gluténines		
				A/G	CM-like	Méta	LTP	serpine	α	$\omega_{1,2}$	ω_5	totales	HPM	FPM	Gluten désamidé
Respiratoire	5/ dz	38	ASTB	8	nd	nd	0	4	0	0	0	0	0	0	4
	6/ dz	39	ASTB	0	nd	nd	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	458/ fr	70	ASTB	14	nd	nd	4	nd	0	0	0	0	0	0	0
	633/ fr	71	ASTB	27	nd	nd	29	nd	3	0	0	2	2	4	6
Alimentaire	3/ dz	6ms	DA	0	4	4	4	0	4	4	0	13	13	4	4
	7/ dz	45	Urt+AIE	nd	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
	58/ fr	?	AIE	0	nd	nd	0	nd	0	4	112	41	0	7	0
	703/ fr	59	AIE	0	nd	nd	0	nd	0	22	55	13	0	37	0
	1026/fr	13	DA	164	nd	nd	26	nd	157	0	0	96	0	0	46
Cutanée	2/ dz	28	EC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	4/ fr	68	Urt	0	nd	nd	4	nd	4	4	34	35	0	4	4
Mixte	1/ dz	17	ASTM+EC+TD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	4/ dz	25	ASTM+EC+TD	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	8/dz	3	ASTM+DA+TD	nd	12	4	0	0	4	16	0	4	0	4	0

Huit sérums de patients algériens allergiques au blé, 2 enfants et 6 adultes, et six sérums de patients français allergiques au blé, 5 adultes et 1 enfant ont été retenus pour ce travail sur la base des symptômes cliniques décrits par les médecins et les résultats des prick tests. Ces patients présentent des symptômes variés pour l'allergie: 4 sérums avec de l'asthme associé à une rhinite dans l'allergie respiratoire, 2 patients avec une dermatite atopique, un patient avec de l'urticaire, 2 patients avec une anaphylaxie induite par l'effort et un patient urticaire chronique et anaphylaxie induite par l'effort pour l'allergie alimentaire. Un seul patient avec de l'eczéma de contact pour l'allergie cutanée. Pour l'allergie mixte, un patient avec une

dermatite atopique associée à de l'asthme et des troubles digestifs et 2 patients avec de l'eczéma de contact lié à de l'asthme. Les sérums sont analysés par deux techniques complémentaires : ELISA et immunoempreinte après SDS/PAGE.

Quelque soit la protéine testée ou le type d'allergie étudié, les réponses sont presque systématiquement supérieures à 20 ng/ml pour les patients français et inférieures à 20 ng/ml pour les patients algériens. Les seules exceptions pour les patients sont observées avec les prolamines qui engendrent une reconnaissance par les IgE assez faible, particulièrement dans le groupe d'allergie respiratoire avec des réponses inférieures à 6 ng/ml, et avec les albumines/ globulines qui engendrent une reconnaissance par les IgE assez faible dans le groupe d'allergie alimentaire où les réponses sont à 4 ng/ml et dans le groupe d'allergie cutanée où les réponses sont nulles.

En dépit de ces biais potentiels, nous pouvons tout de même remarquer des différences importantes entre les patients algériens et français en termes d'intensité de réponse. Ces différences entre les patients sont conservées pour les prolamines et les albumines/globulines. Aucune protéine n'engendre une réponse particulière, orientée vers un groupe de symptomatologie.

Il est aussi intéressant d'observer que les réponses estimées peuvent permettre de distinguer les différents types d'allergie.

1.2. Dosage des IgE spécifiques des patients par ELISA indirect

L'analyse par ELISA des sérums a pour but tout d'abord de quantifier les IgE des sérums dirigés contre différentes fractions protéiques du blé, immobilisées sur les plaques multipuits. Cette technique quantitative va permettre de comparer la réponse IgE des patients et enfin des sérums seront sélectionnés pour réaliser la suite du travail.

De plus les quantités de sérums disponibles étant assez limitées, il est important de tenir compte de ce paramètre lors de la sélection afin de pouvoir faire des répétitions.

Il est aussi important de noter que la répétabilité de l'ELISA n'est pas optimale. Un même sérum testé plusieurs fois peut présenter des différences dans les valeurs de concentrations et/ou de signal/bruit de fond.

Le test a été fait en utilisant comme antigènes différentes protéines purifiées à partir de la variété de blé Récital, les fractions α , γ et ω gliadines, les gliadines totales et les sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire (SU-HPM et SU-FPM), un mélange des Albumines/Globulines ainsi qu'une protéine de transfert de lipide du blé (LTP) et une serpine de blé. Il faut souligner que chacune des protéines testées est reconnue par les IgE de patients allergiques.

Selon le type d'allergie, nous pouvons observer que dans l'ensemble, les patients avec une allergie respiratoire réagissent vis à vis des albumines/globulines. Néanmoins un sérum (633) réagissant assez fortement sur les albumines/globulines et la LTP, réagit également sur les prolamines mais avec de très faibles réponses (Tableau 31). Dans l'allergie alimentaire, les patients réagissent plutôt vis à vis des prolamines avec des exceptions pour deux sérums qui reconnaissent aussi une ou deux protéines de la fraction soluble (sérum 4fr et 1026) (Tableau 31). Les sérums réagissent sur les deux fractions des albumines/globulines et prolamines dans l'allergie mixte.

Dans le groupe d'allergie respiratoire, deux sérums sur quatre sont positifs à la fraction albumines/globulines, deux sur la LTP et deux sur la serpine (Figure 26).

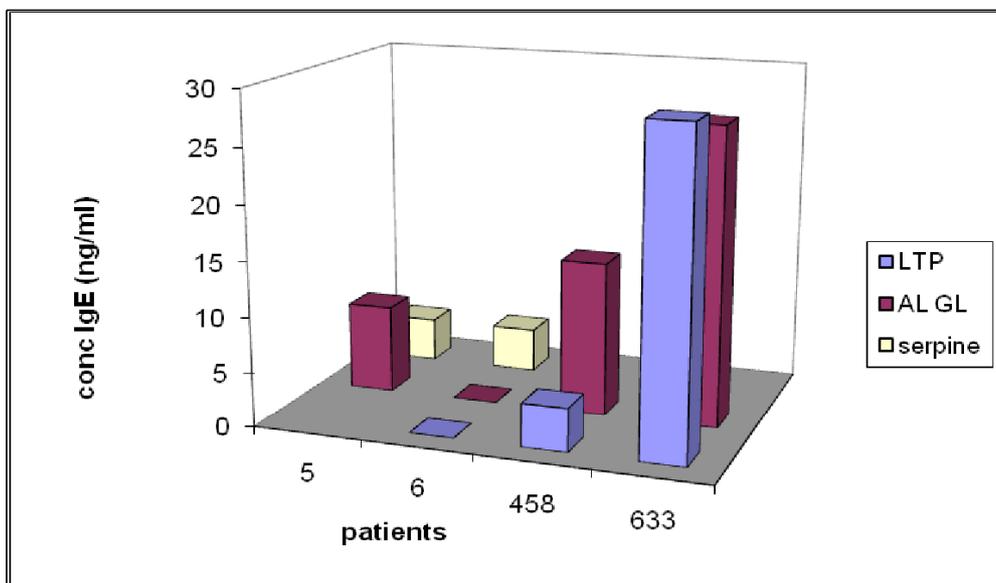


Figure 26 : exemple de la réponse IgE spécifique dans le groupe de l'allergie respiratoire sur la fraction soluble.

Dans le groupe d'allergie alimentaire, les six sérums réagissent sur les gliadines totales et spécifiquement sur une ou plusieurs classes de gliadines présentées. Trois sérums sur six réagissent vis à vis des α gliadines, 4 positifs aux $\omega_{1,2}$ gliadines, 3 aux ω_5 gliadines et 3 aux γ gliadines. Concernant les gluténines, quatre sérums réagissent vis à vis des sous unités gluténines de faible poids moléculaire et un seul sérum sur les sous unités gluténines de haut poids moléculaire (Figure 27).

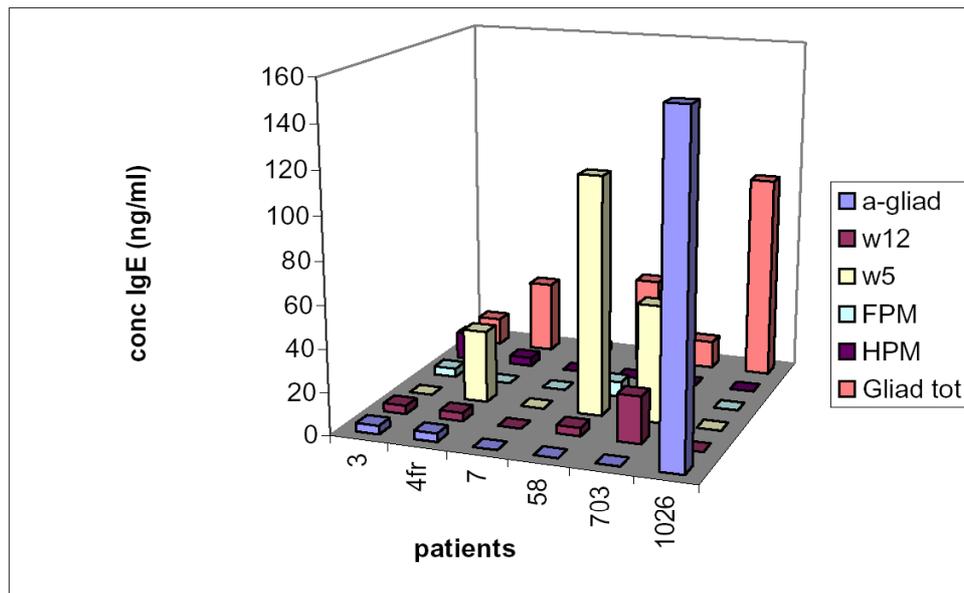


Figure 27 : exemple de la réponse IgE spécifique dans le groupe de l'allergie alimentaire sur les prolamines.

Toutes les classes de gliadines, les deux types de sous unités gluténines et les protéines de la fraction soluble sont reconnues. Les sous unités gluténines de faible poids moléculaire sont toutefois plus souvent reconnues que les sous unités gluténines de haut poids moléculaire. Cette faible reconnaissance des sous unités gluténines de haut poids moléculaire semble montrer que cet antigène est un antigène mineur pour cette pathologie et donc que les patients y sont peu sensibilisés. Aussi les γ et ω_5 gliadines qui ne sont pas reconnues par les patients algériens et reconnues par les patients français semblent être des allergènes mineurs pour les patients algériens.

2. Caractérisation des variétés

2.1. Caractérisation des fractions protéiques extraites

Les rendements de l'extraction séquentielle des fractions albumines/globulines, gliadines et gluténines à partir des farines des variétés de blé, triticales et seigle sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 32 : quantité protéique obtenue après extraction séquentielle

	Variétés	Masse traitée	Masse protéique extraite		
			Albumines/Globulines	Gliadines	Gluténines
Blés	Affine1	3g	114.5 mg	79.8 mg	69.65 mg
	Africa2	3g	106.5 mg	125.7 mg	71.96 mg
	Kahlaya	3g	127 mg	144.74 mg	92.75 mg
	Beds	3g	168 mg	66.4 mg	61.31 mg
	Tazzi	3g	103.33 mg	97.4 mg	118.41 mg
Triticales	Chelia	3g	200.2 mg	46 mg	39.92 mg
	Fahd	3g	141 mg	49.3 mg	56.95 mg
	Pollmer	3g	185.21 mg	48 mg	55.93 mg
Seigles	Local	3g	179.3 mg	50.2 mg	45.5 mg
	Petka	3g	172.1 mg	43.6 mg	61.1 mg

Les rendements d'extraction les plus importants sont obtenus avec la fraction albumines/globulines pour toutes les variétés des trois espèces de blé, triticales et seigle par rapport aux deux autres fractions de gliadines et gluténines.

Après chaque étape d'extraction séquentielle, le pourcentage des trois fractions extraites est déterminé dans chaque variété de blé, triticales et seigle. Le pourcentage en albumines/globulines, gliadines et gluténines dans les dix variétés de blé, triticales et seigle est représenté dans la figure 28.

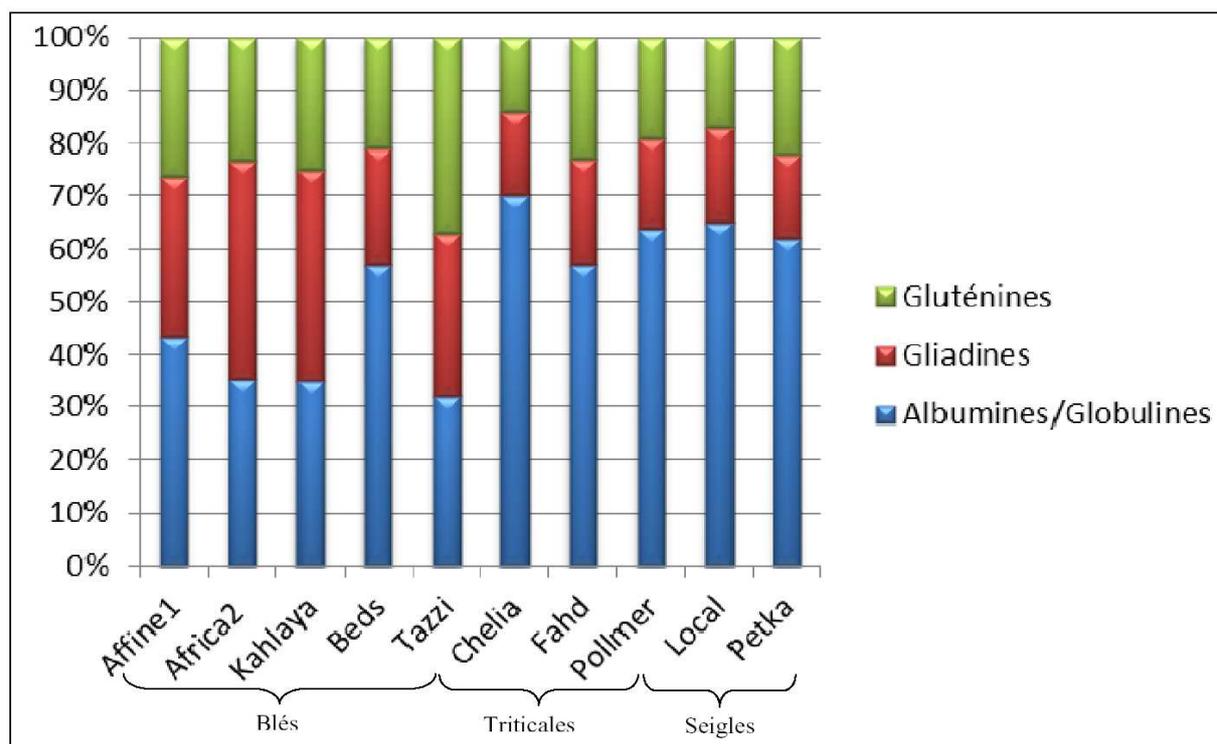


Figure 28 : pourcentage des trois fractions albumines/globulines, gliadines et gluténines dans chaque variété de blé, triticales et seigle après extraction séquentielle.

La teneur de la fraction soluble dans toutes les variétés varie de 30 à 70 % où la plus faible teneur en albumines/globulines est dans la variété de blé saharien Tazzi et la plus importante est dans la variété de triticales Chelia. Elle varie de 30 à 60 % dans les variétés de blé, de 60 à 70 % dans les variétés de triticales et elle est de 60 % dans les variétés de seigle. Il est à noter que la teneur en albumines/globulines est faible dans les blés par rapport aux triticales et seigles.

Concernant les prolamines, le pourcentage en gliadines dans les toutes les variétés varie de 16 à 41 %. La variété de triticales Chelia et de seigle Petka présentent le plus faible pourcentage contrairement à la variété de blé ancien Africa2. Le pourcentage en gliadines varie de 22 à 41 % dans les variétés de blé, de 16 à 20 % dans les variétés de triticales et de 16 à 18% dans les variétés de seigle. Pour les gluténines, la teneur varie de 14 à 37 % dans toutes les variétés avec une faible teneur dans la variété de triticales Chelia et la plus importante dans la variété de blé saharien Tazzi. La teneur en gluténines varie de 21 à 37 % dans les blés, de 14 à 23 % dans les triticales et de 17 à 22 % dans les seigles. On peut noter que les triticales et les seigles sont plus pauvres en prolamines par rapport aux blés. De plus aucune différence

significative de la teneur en prolamines n'a été observée pour les extraits gliadines et gluténines entre les variétés de blé, triticales et seigle.

Une étude électrophorétique des différentes fractions obtenues après extraction séquentielle a été menée. Les électrophorèses ont été réalisées en conditions dénaturantes et réductrices afin de comparer la composition protéique des différents extraits et d'obtenir la meilleure présentation des protéines des différentes variétés de blé, triticales et seigle.

Les profils diffèrent autant dans leur composition que dans l'intensité relative des différentes bandes mises en évidence. Il apparaît de plus que certaines variétés présentent des similarités dans leur composition protéique. (Figure 29).

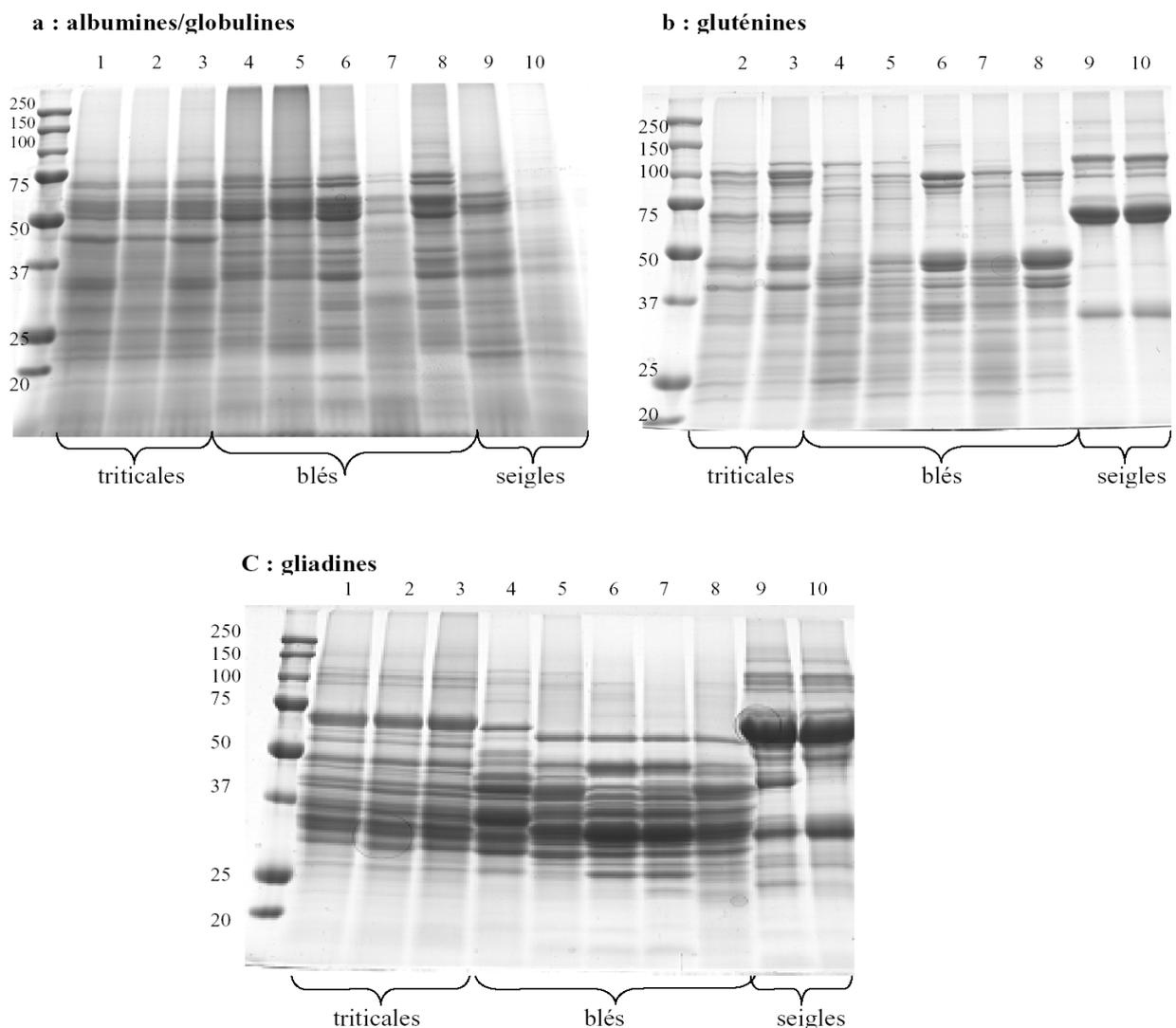


Figure 29 : profils électrophorétique des fractions issues de l'extraction séquentielle. 1 : chelia, 2 : Fahd, 3 : Pollmer, 4 : Affine1, 5 : Africa2, 6 : Kahlaya, 7 : Beds, 8 : Tazzi, 9 : Local, 10: Petka.

Les gels colorés au bleu de coomassie montrent les différents composants pour chaque fraction protéique.

Les profils électrophorétiques donnés pour la fraction soluble (albumines/globulines) présentent des similarités entre certaines variétés de blé, triticales et seigle. Un nombre plus important de bandes protéiques migrant entre 20 et 75 KDa est observé avec plusieurs bandes majeures fortement colorées vers 50 KDa (Figure 29a). Des différences d'intensité de différentes bandes protéiques au-dessous de 50 KDa et de 35 KDa aussi sont observées.

Les gluténines (Figure 29b) se caractérisent essentiellement par trois groupes de protéines, les gluténines de haut poids moléculaire de 80 à 120 KDa, les gluténines de faible poids moléculaire de type B de 40 à 50 KDa et les gluténines de faible poids moléculaire de type C de 30 à 40 KDa. Peu de sécamines de faible poids moléculaire sont observées pour les variétés de seigle.

Pour les gliadines et par ordre de mobilité croissante sont observées, les ω gliadines de masse moléculaire de 45 à 70 KDa, les γ gliadines et les α/β gliadines de masse moléculaire de 35 à 45 KDa. Les gliadines se distinguent par une forte représentation des protéines de masse moléculaire de 30 à 40 KDa (Figure 29c). Moins de bandes d' α/β gliadines sont observées pour les variétés de seigle.

En conclusion, l'ensemble de ces informations électrophorétiques nous ont permis de caractériser les différentes protéines extraites et d'estimer les différences dans la composition protéique des dix variétés de blé, triticales et seigle.

2.2. Cartographie des protéines solubles du blé, triticales et seigle

Afin de mieux caractériser le contenu de l'extrait protéique ainsi obtenu après extraction séquentielle à partir des farines de blé, triticales et seigle, et éventuellement comparer la composition de protéines et peptides le constituant, une électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée. Une variété par espèce est utilisée.

Un nombre assez important de spots correspondant à des entités protéiques bien distinctes peut être observé. Les profils bidimensionnels ainsi obtenus avec l'extrait albumines/globulines soulignent que les protéines sélectionnées sont bien représentatives des protéines du blé, seigle et triticales. Ces entités constituent le répertoire de protéines de ces céréales. L'image électrophorétique montre une multitude de spots dispersés sur une grande zone de masse moléculaire et de pH. La majorité des spots s'échelonne entre les masses de 10

et 70 KDa et les pH isoélectriques entre 4 et 8. Toutefois, nous retrouvons des protéines aux pHi acides (Figure 30).

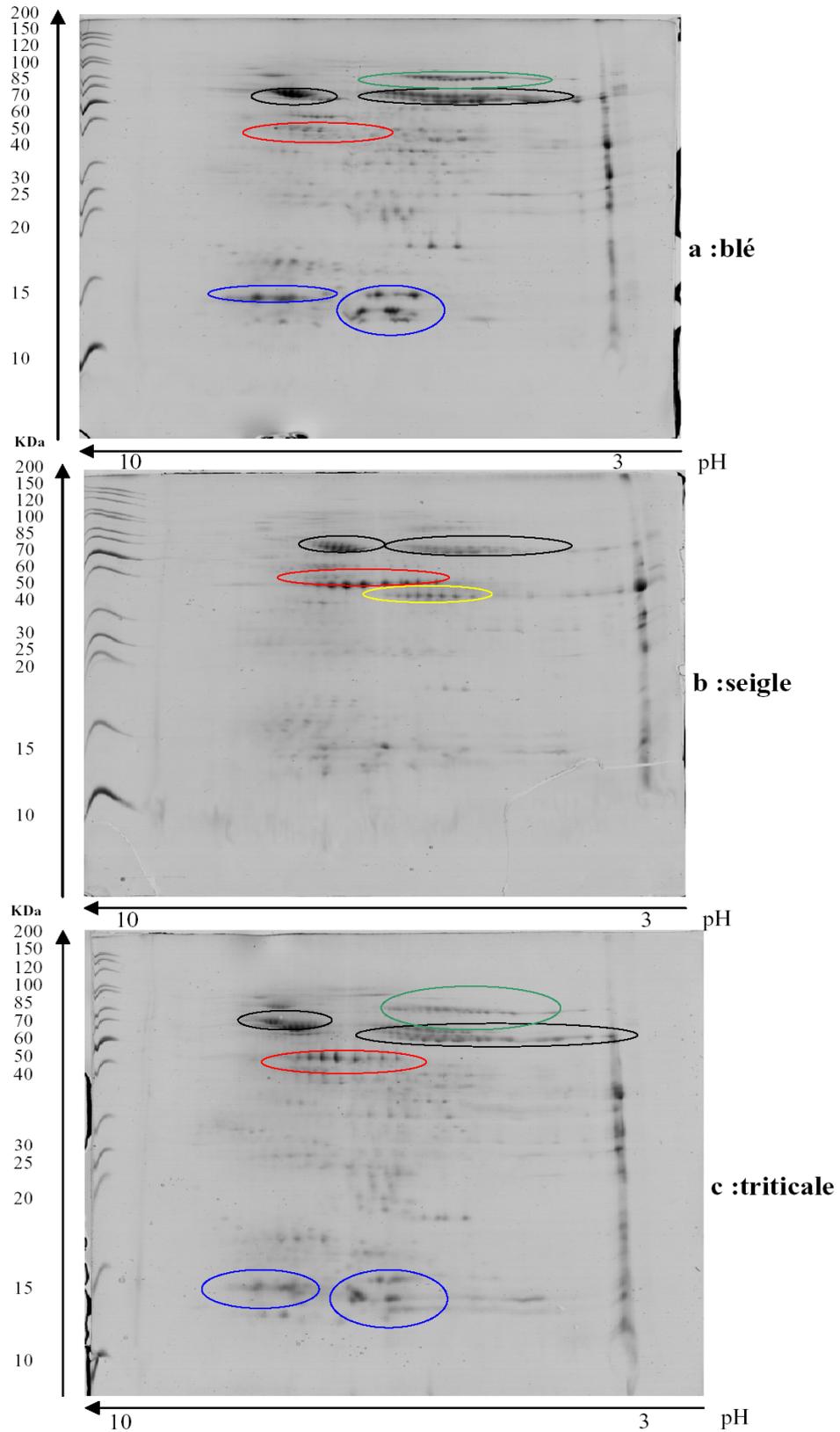


Figure 30 : Exemple d'électrophorèse bidimensionnelle de l'extrait albumines/globulines. a : Kahlaya, b : Petka, c : Fahd

Le total de spots détecté sur le gel de la variété de blé est de 229 pour l'extrait albumines/globulines. Pour la variété de seigle, un total de 119 est détecté pour les fractions albumines/globulines. 248 spots ont été détectés sur le gel de la variété de triticale pour l'extrait des albumines/globulines.

A titre d'exemple, pour la variété de blé (Figure 30 a), cinq groupes de protéines majoritaires sont observées pour l'extrait albumines/globulines :

- Un groupe aux environs de 70 KDa
- Deux groupes à 60 KDa avec des pI différents (un groupe à 4-6 et l'autre à 7-8).
- Un groupe aux environs de 40 KDa.
- Un groupe à 15 KDa.
- Un groupe à 13-15 KDa.

Selon les travaux de Larré et al., 2011, les deux groupes de 70 KDa et 60 KDa correspondent à des globulines, le groupe de 40 KDa sont des serpinines et les deux groupes de faible poids moléculaire de 13 KDa et 15 KDa sont des inhibiteurs d' α -amylase

Moins de protéines sont observées pour la variété de seigle (Figure 30 b), où trois groupes de protéines majoritaires pour l'extrait albumines/globulines sont observés :

- Deux groupes à 60 KDa avec des pI différents (un groupe à 5-6 et l'autre à 7-8)
- Un groupe aux environs de 40 KDa.
- Un groupe aux environs de 35 KDa.

Pour la variété de triticale, les groupes de protéines majoritaires des deux parents blé et seigle sont observés (Figure 30 c) :

- Un groupe aux environs de 70 KDa
- Deux groupes à 60 KDa avec des pI différents (un groupe à 4-6 et l'autre à 7-8).
- Un groupe aux environs de 40 KDa.
- Un groupe à 15 KDa.
- Un groupe à 13-15 KDa.

Les groupes des globulines à 60 KDa avec des pI différents (cercles noirs) et le groupe des serpinines à 40 KDa (cercle rouge) semblent être communs aux trois variétés de blé, seigle et triticale. Le groupe des globulines à 70 KDa (cercle vert) et les deux groupes d'inhibiteurs d' α -amylase à 15 KDa et 13-15KDa (cercles bleus) ne sont pas observés chez le seigle, semblent être communs aux deux variétés de blé et triticale.

2.3. Comparaison de la composition des variétés de blé et de triticales en certaines protéines dans les fractions albumines/globulines, gliadines et gluténines

De nombreux allergènes sont présents dans la fraction soluble et dans la fraction des prolamines également. De plus des différences quantitatives de ces fractions ont été observées entre les variétés de blé, triticales et seigle (Figure 31). Pour cela, une caractérisation de leur composition en certaines protéines de ces fractions est réalisée par ELISA indirect dans le but d'estimer les différences semi-quantitatives entre les variétés.

Des anticorps monoclonaux de souris et polyclonaux de lapin sont utilisés en ELISA indirect et qui sont dirigés contre des peptides correspondant à des fragments ou à un domaine répétitif des gliadines : α/β , γ , ω_2 , ω_5 gliadines, des gluténines : gluténines de haut et faible poids moléculaire et contre des protéines de la fraction des albumines/globulines: LTP, serpine te puroindoline. Ces anticorps assurent une détection spécifique de chacune de ces fractions protéiques.

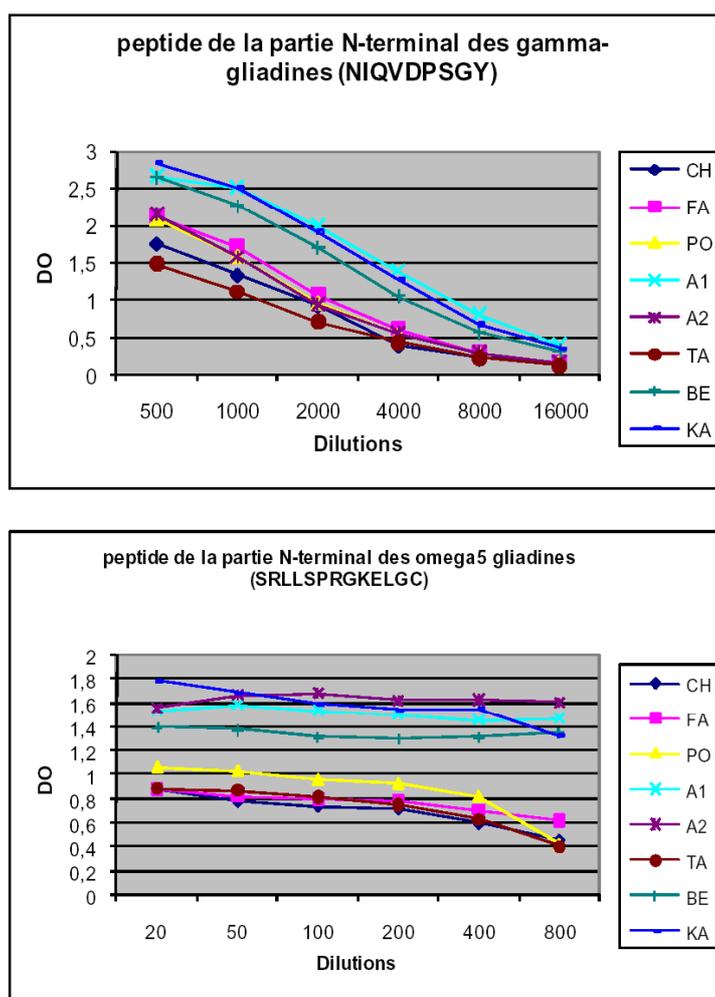


Figure 31 : Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des peptides spécifiques des différentes classes de gliadines : γ et ω_5 gliadines. Triticales : CH, FA, PO ; Blés : A1, A2, TA, BE, KA.

Concernant les gliadines, aucune différence de détection des ω_2 gliadines entre les variétés de blé et de triticale n'est observée (annexe VI). De faibles réponses ont été observées pour les α/β gliadines pour les triticales par rapport aux blés (annexe VI). Pour les ω_5 et γ gliadines, deux groupes distincts de triticales et de blés sont observés avec des différences de détection où les réponses sont faibles pour les triticales et une ou deux variétés de blé (Figure 31).

Le même signal est obtenu pour les gluténines de haut poids moléculaire pour les variétés de blé et de triticale (Figure 32). Pour les gluténines de faible poids moléculaire, de faibles réponses sont observées pour deux variétés de triticale et une variété de blé par rapport aux blés (Figure 32).

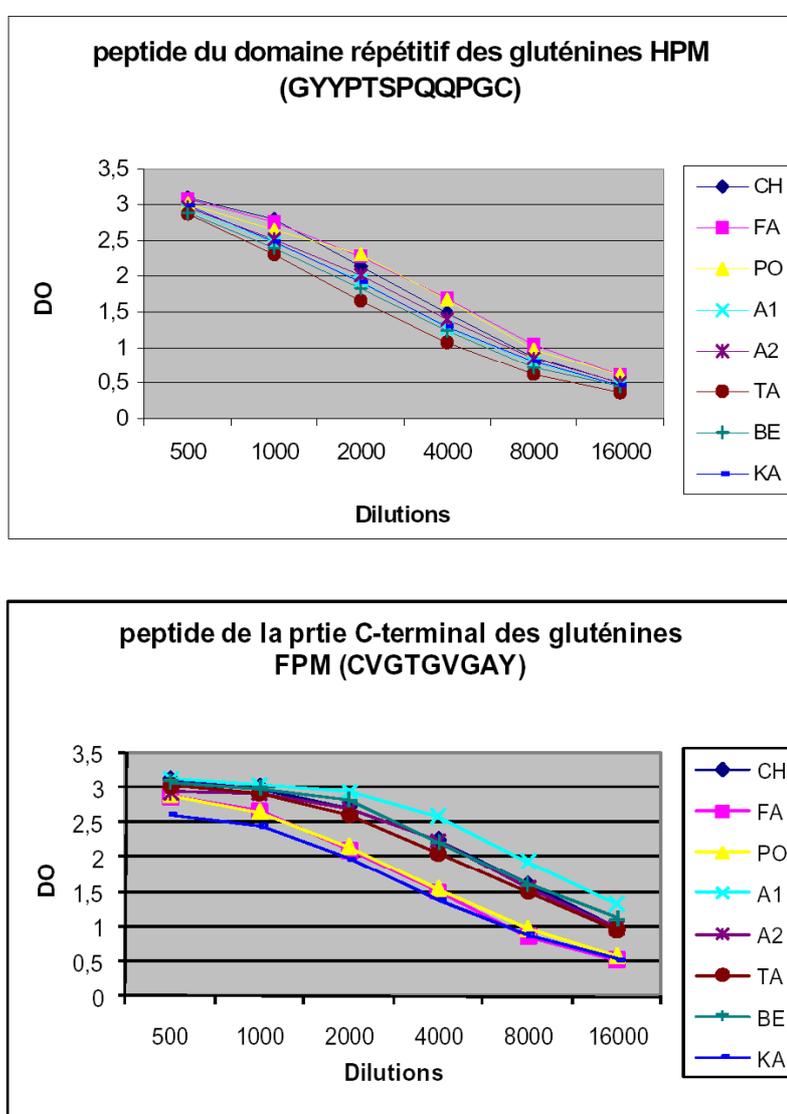


Figure 32 : Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des peptides spécifiques des gluténines HPM et FPM. Triticales : CH, FA, PO ; Blés : A1, A2, TA, BE, KA.

Pour la fraction soluble, des anticorps contre trois protéines de cette fraction ont été testés. Aucune différence de détection n'est observée entre les variétés de blé et de triticale pour la serpine (Figure 8). Une variété de blé ancien semble avoir plus de puroindoline par rapport aux autres variétés de blé et de triticale (annexe VI).

De fortes inhibitions sont observées pour la LTP en ELISA compétitif pour toutes les variétés ce qui traduit une importante teneur en LTP dans les variétés de blé et de triticale (Figure 33).

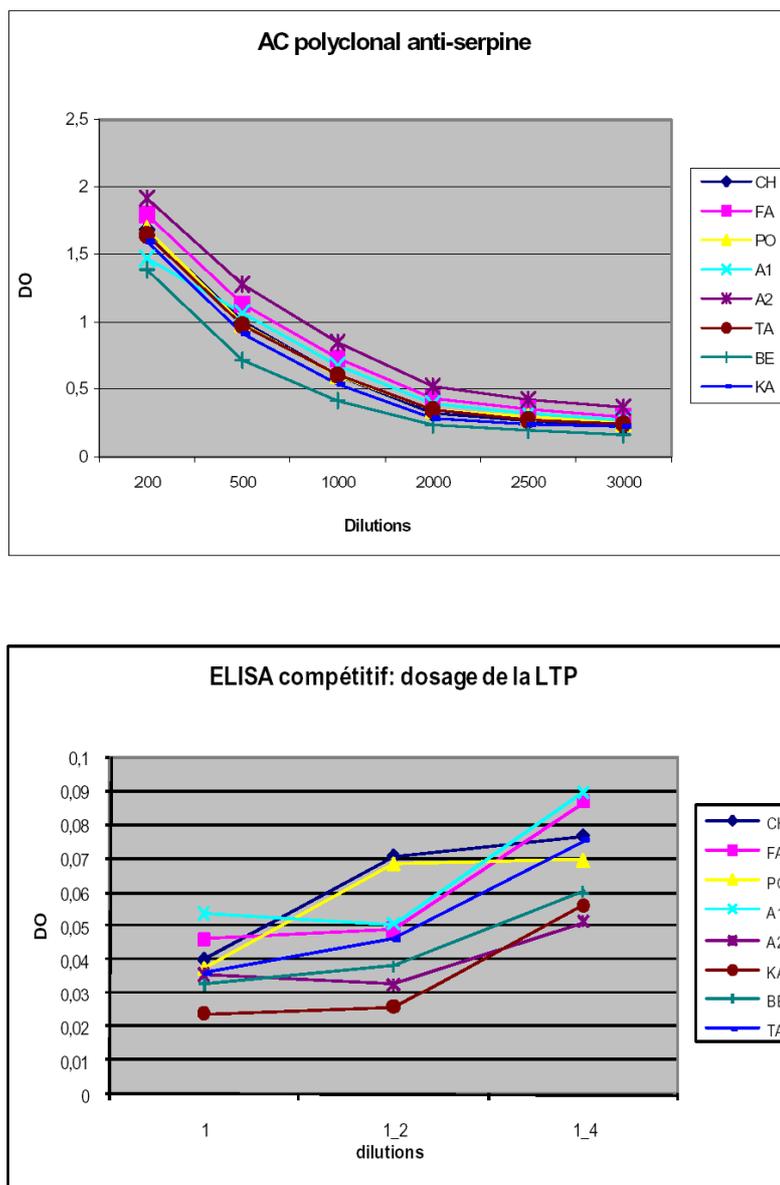


Figure 33 : Elisa indirect réalisé avec des anticorps contre des protéines de la fraction soluble : LTP, Puroindoline et serpine. Triticales : CH, FA, PO ; Blés : A1, A2, TA, BE, KA.

2.4. Caractérisation des protéines reconnues par les IgE de patients allergiques dans les différents génotypes

Les 8 sérums de patients algériens allergiques à la farine de blé et quelques sérums de références de patients français allergiques à la farine de blé ont été testés en immunoblotting vis à vis des différentes fractions prolamines, Albumines/Globulines et métaboliques de la farine de blé, de triticales et du seigle. Cet autre support permet d'identifier précisément les composants reconnus dans les différentes fractions protéiques et d'observer pour une même classe de protéine si un ou plusieurs composants sont reconnus contrairement au test ELISA. Les figures suivantes montrent un exemple pour chaque fraction protéique avec le gel monodimensionnel et la membrane correspondante après révélation.

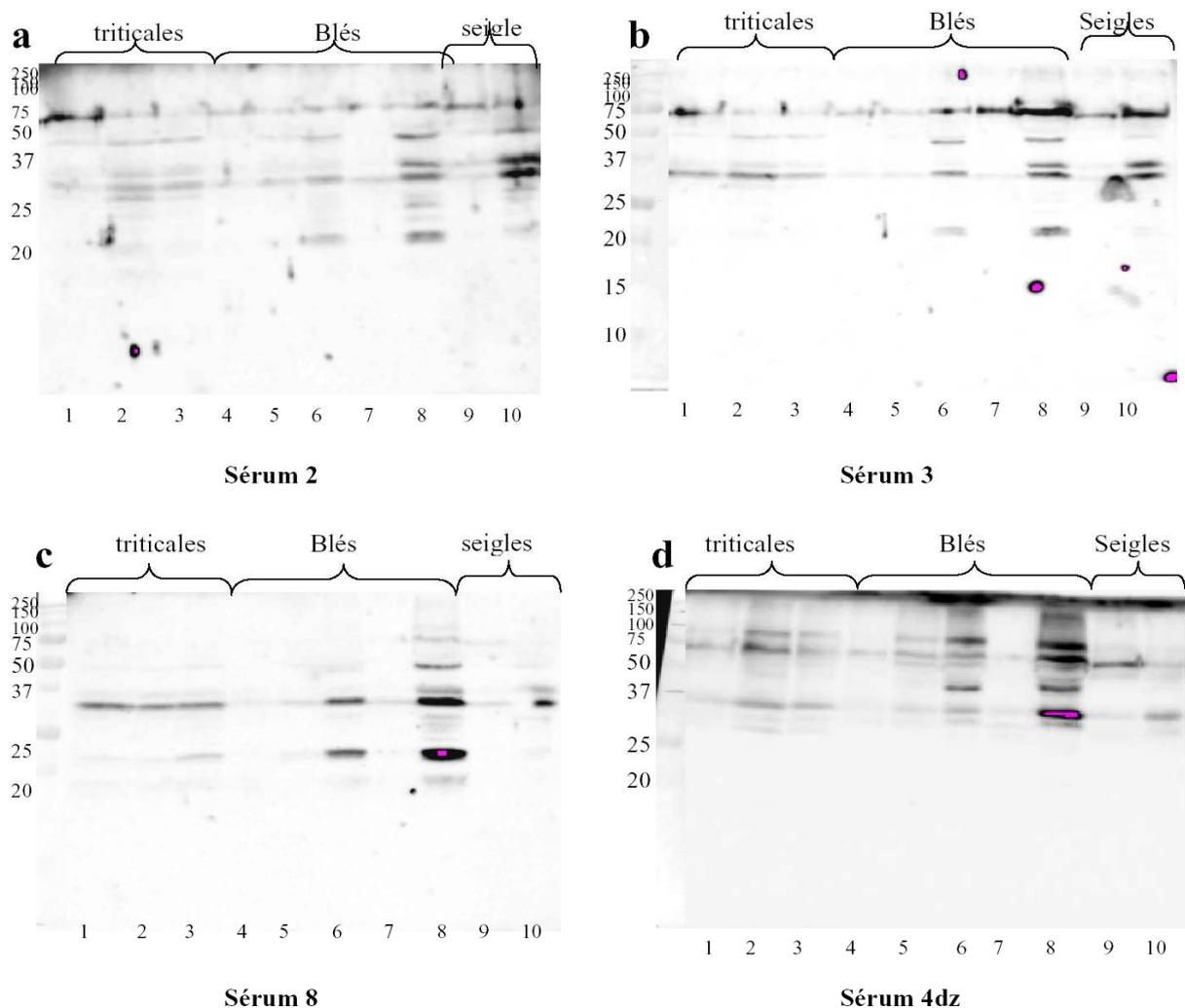


Figure 34 : Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction Métabolique de différentes variétés de blé, triticales et seigle. 1 : Chelia, 2 : Fahd, 3 : Pollmer, 4 : Africa2, 5 : Affine1, 6 : Kahlaya, 7 : Beds, 8 : Tazzi, 9 : Local, 10 : Petka. a : sérum n°2, b : sérum n°3, c : sérum n°8, d : sérum n°4

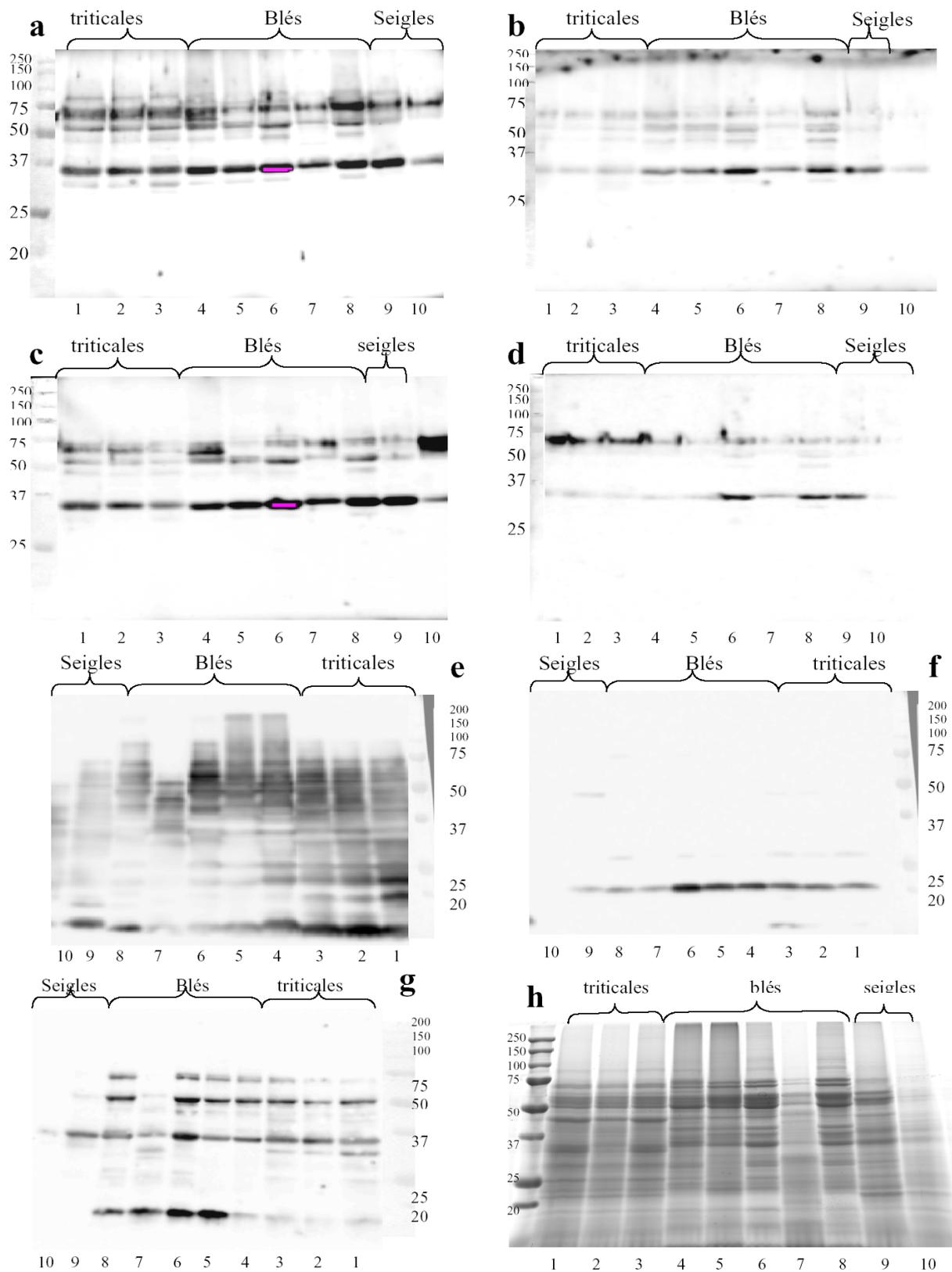


Figure 35 : Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction Albumines/Globulines de différentes variétés de blé, triticale et seigle. 1 : Chelia, 2 : Fahd, 3 : Pollmer, 4 : Africa2, 5 : Affine1, 6 : Kahlaya, 7 : Beds, 8 : Tazzi, 9 : Local, 10 : Petka. a : sérum n°4, b : sérum n°3, c : sérum n°8, d : sérum n°1, e : sérum n°458, f : sérum n°633, g : sérum n°1026, h : gel correspondant.

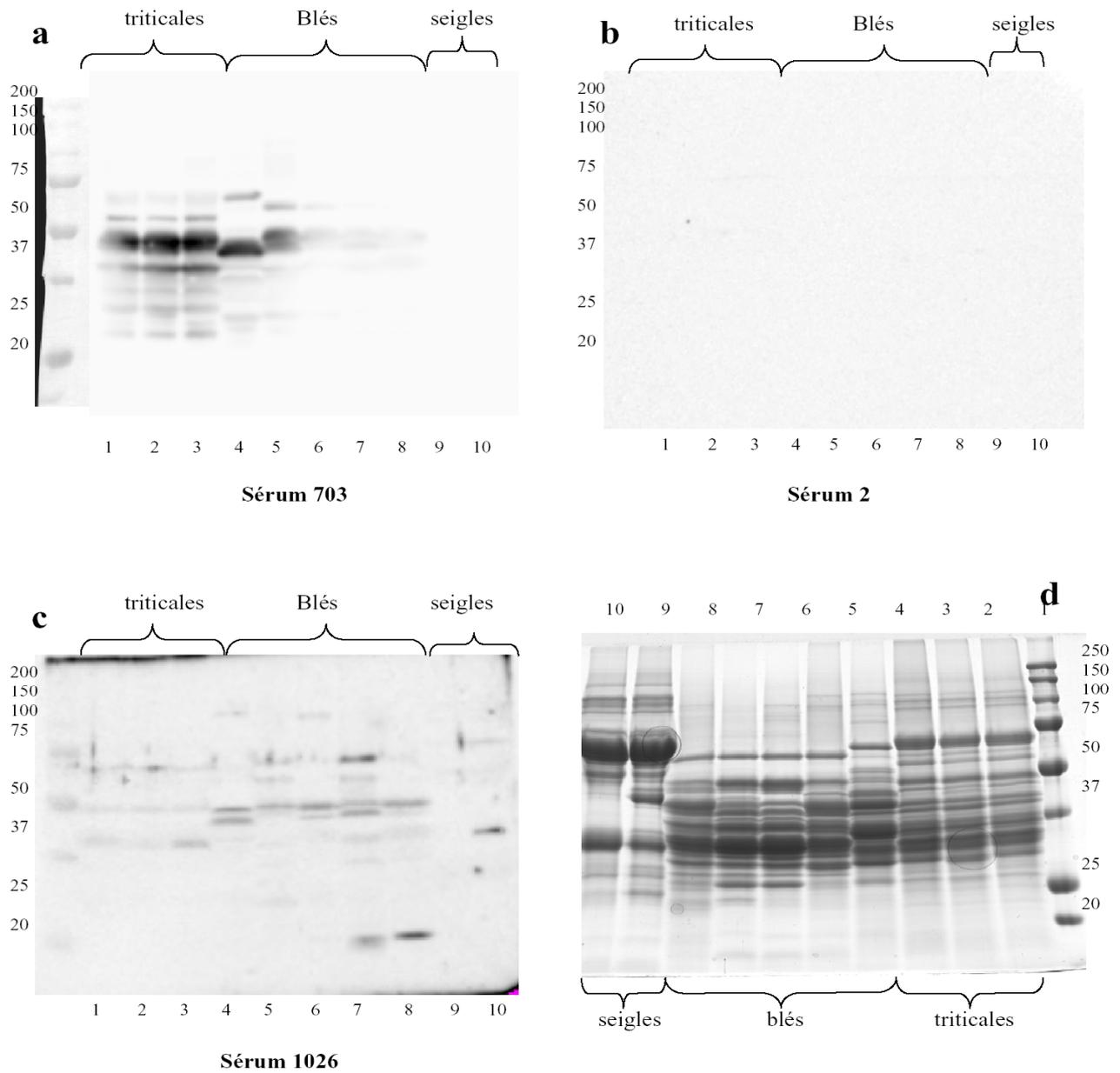


Figure 36 : Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens et français allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction des gliadines de différentes variétés de blé, triticale et seigle. 1 : Chelia, 2 : Fahd, 3 : Pollmer, 4 : Africa2, 5 : Affine1, 6 : Kahlaya, 7 : Beds, 8 : Tazzi, 9 : Local, 10 : Petka. a : sérum n°703, b : sérum n°2, c : sérum n°1026, d : gel correspondant coloré au bleu de coomassie.

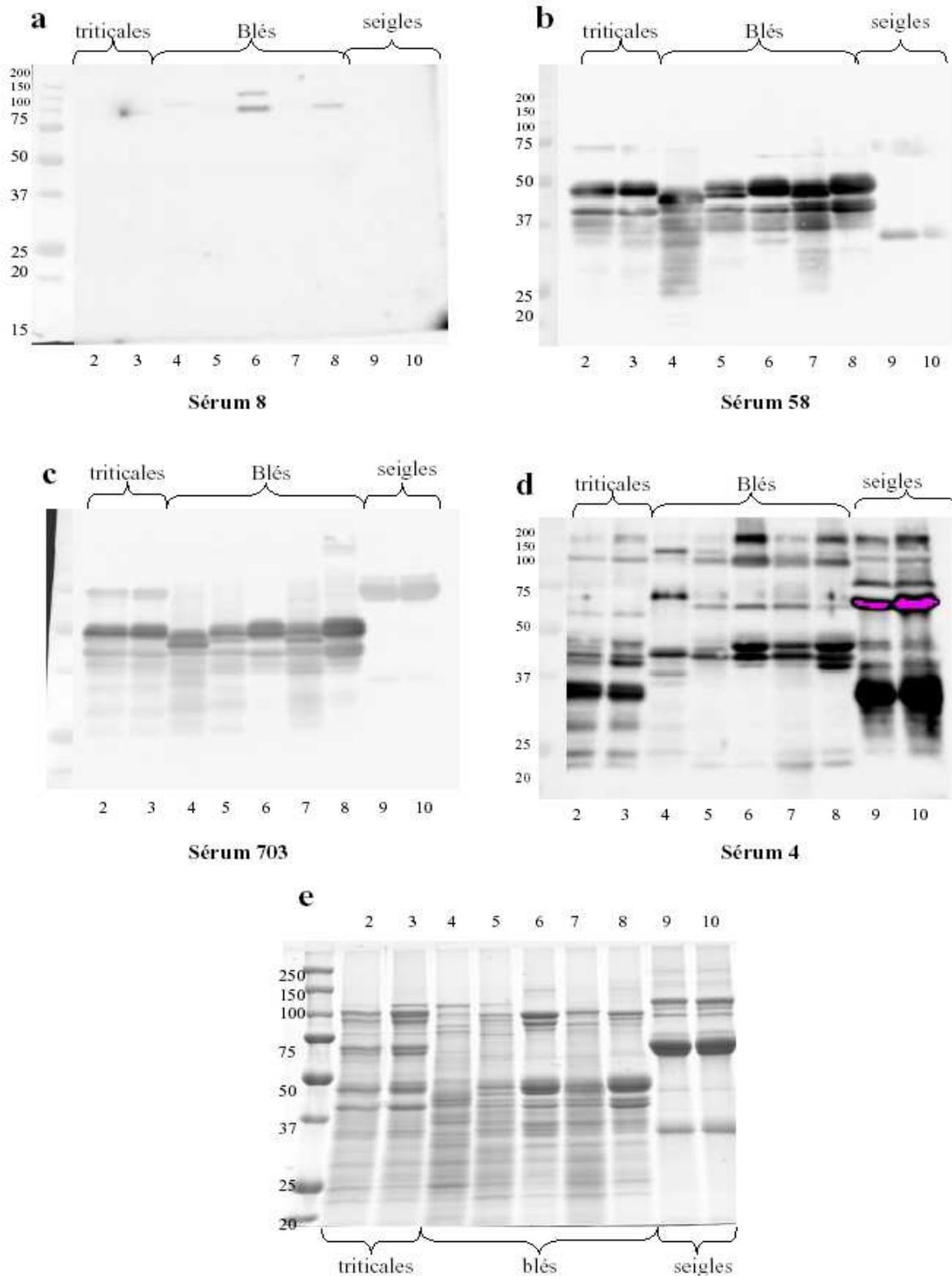


Figure 37 : Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens et français allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction des gluténines de différentes variétés de blé, triticales et seigle. 2 : Fahd, 3 : Pollmer, 4 : Africa2, 5 : Affine1, 6 : Kahlaya, 7 : Beds, 8 : Tazzi, 9 : Local, 10 : Petka. a : sérum n°8, b : sérum n°58, c : sérum n°703, d : sérum n°4F, e : gel correspondant coloré au bleu de coomassie.

Les résultats des immunoblots effectués sur ces sérums (au 1/20) sont représentés par le tableau suivant.

Tableau 33 : Tableau récapitulatif des résultats d'immunoblotting sur les sérums des patients allergiques à la farine de blé

	DIL	Résultats immunoblots																	
		Gliadines			A/G			HPM			FPM			CM-like			métaboliques		
		B	T	S	B	T	S	B	T	S	B	T	S	B	T	S	B	T	S
1	1/20	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+
2	1/20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	++
3	1/20	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++
4A	1/20	-	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+
5	1/20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	?
6	1/20	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?	?
7	1/20	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
8	1/20	-	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	+	+	+	++	+	+
4F	1/20	?	?	?	?	?	?	+++	++	++	++	+++	+++	?	?	?	?	?	?
58	1/20	?	?	?	?	?	?	-	-	+	++	++	+	?	?	?	?	?	?
458	1/20	?	?	?	+++	+++	+++	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
633	1/20	?	?	?	++	++	++	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
703	1/20	+	++	-	?	?	?	-	-	+	++	++	-	?	?	?	?	?	?
1026	1/20	+	+	+	++	++	+	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

Tous les sérums sont positifs vis à vis de la fraction Albumines/Globulines et la fraction métabolique de la farine de blé, triticale et seigle. 5, 1 et 3 sérums sur 11 sont positifs vis à vis des sous unités gluténines de haut poids moléculaire de la farine de blé, triticale et seigle respectivement. 3 et 2 sérums sur 11 sont positifs vis à vis des sous unités gluténines de faible poids moléculaire. Pour le blé et le triticale, 2 sérums sont positifs vis à vis des gliadines contre 1 sérum pour le seigle. Il est à noter que les IgE de patients algériens ne reconnaissent pas les prolamines.

Il semblait important et intéressant de tester des sérums différents selon plusieurs critères : pathologie du patient, âge du patient, poids moléculaire des protéines réagissant, différence de réactivité entre les variétés de blé, de triticale et de seigle.

La plupart des sérums de patients algériens reconnaissent des bandes dans une zone de 30 à 90 KDa des fractions Albumines/Globulines et métaboliques et un petit nombre (4 sérums) réagit avec des bandes de faible poids moléculaire des fractions métaboliques. Les mêmes bandes protéiques dans la fraction albumines/globulines reconnues par les sérums de patients algériens sont également reconnues par les sérums de patients français en plus des protéines de la zone de faible poids moléculaire de 10 à 25 KDa qui n'est pas le cas pour les patients

algériens. Les protéines du blé sont reconnues de façon plus intense que celle du triticale et du seigle quel que soit le sérum pour les patients algériens contrairement aux patients français qui reconnaissent les protéines des trois espèces de blé, triticale et seigle de la même intensité (Figure 35).

Les sérums 3, 4 et 8 réagissent de façon intense avec les extraits Albumines/Globulines des différentes variétés de blé, triticale et seigle essentiellement dans la région 30-90 KDa, et plus fortement avec une protéine de 37 KDa (Figure 35). Les sérums 458 et 1026 réagissent avec toutes les protéines de la fraction albumines/globulines des différents génotypes et plus fortement vis à vis d'une protéine de 15 KDa. Le sérum 633 réagit uniquement avec une protéine de 20 KDa (Figure 35).

Les sérums 1, 2, 3, 4 et 8 réagissent avec les extraits métaboliques des différentes variétés essentiellement vis à vis du blé et du seigle dans la région 30-90 KDa. Ils reconnaissent également quelques bandes aux alentours des 20 KDa sur 2 variétés de blés sahariens mais pas sur les autres variétés de blé, triticale et seigle. Pour les autres sérums, on observe une réactivité inférieure vis à vis des différents extraits. Les sérums 1, 2, 3 et 8 sont les seuls sérums de patients algériens à présenter des bandes dans la zone des faibles poids moléculaires (20-25 KDa) pour 2 variétés de blés sahariens (Figure 34).

Concernant les prolamines, les sérums de patients français reconnaissent quelques bandes protéiques dans les différentes classes des gliadines contrairement aux sérums algériens qui ne les reconnaissent pas (Figure 36). Ils reconnaissent également les gluténines et sécalines de haut et de faible poids moléculaire des trois espèces de blé, triticale et seigle et uniquement deux sérums algériens reconnaissent deux bandes protéiques de gluténines de haut poids moléculaire de blé (Figure 37).

Le sérum 58 réagit fortement avec les sous unités gluténines de faible poids moléculaire de type B des variétés de blé et de triticale. Une sécaline aux environs de 35 KDa d'une variété de seigle semble être reconnue aussi.

Le sérum 703 réagit faiblement avec les gluténines de faible poids moléculaire de type B des variétés de blé et de triticale en plus des 75K sécalines des deux variétés de seigle.

Le sérum 4 réagit de façon intense avec les gluténines et sécalines de haut et de faible poids moléculaire de tous les génotypes. Il reconnaît les sécalines de haut et de faible poids moléculaire du seigle et du triticale et il réagit spécifiquement sur les gluténines de haut et de faible poids moléculaire de type B.

En conclusion, les protéines de la zone de faible poids moléculaire de la fraction soluble et les prolamines ne semblent pas représenter une part importante de l'immunoréactivité globale du blé pour les patients algériens. De plus, l'analyse de la réponse IgE a montré peu de différences d'immunoréactivité entre les variétés en ce qui concerne les extraits albumines/globulines mais a montré un polymorphisme de l'immunoréactivité en fonction de la diversité allélique intra et interspécifiques des différentes variétés étudiées pour les gluténines. De ce fait, les différences qualitatives et quantitatives de composition protéique entre variétés et espèces peuvent avoir une répercussion sur la réactivité des IgE de patients.

2.5. Comparaison entre le test ELISA et l'immunoblotting

Le test ELISA pour la recherche des anticorps IgE est moins sensible que l'immunoblotting pour certains sérums. Il y a moins de sérums positifs en ELISA. Parfois une seule classe de protéines est reconnue en ELISA pour un sérum tandis qu'en immunoblotting la grande majorité des sérums positifs reconnaissent plusieurs classes de prolamines ou plusieurs protéines de la fraction soluble. Nous n'avons pas observé une similitude entre le test ELISA et l'immunoblotting pour les sérums identifiés comme positifs ou négatifs contre les fractions prolamines ou contre la fraction albumines/globulines.

On peut noter que les sérums 1, 2, 4, 6 et 7 négatifs en ELISA sur les Albumines/Globulines (Tableau 31) reconnaissent les bandes de l'extrait Albumines/Globulines en immunoempreinte.

Les sérums 1, 2, 4, 5, 6 et 7 négatifs en ELISA sur les fractions métaboliques, reconnaissent les bandes de l'extrait métabolique en immunoempreinte.

Les sérums 4, 7 et 8 négatifs en ELISA sur les sous unités gluténines de haut poids moléculaire reconnaissent quelques sous unités HPM d'une variété de blé ancien en immunoempreinte.

Il est possible que la dénaturation subie par les protéines dans cette technique soit nécessaire à leur reconnaissance par les IgE de ces sérums, ou bien que les IgE soient dirigées contre des composants de l'extrait trop minoritaire pour être détectés en ELISA.

Au contraire, les 1 et 2 faiblement positifs en ELISA sur les sous unités gluténines de haut poids moléculaire et les sérums 3 et 8 faiblement positifs en ELISA sur les sous unités gluténines de faible poids moléculaire et les sérums 3, 7 et 8 faiblement positifs en ELISA sur les gliadines, ne les reconnaissent pas en immunoempreinte.

Il est possible que la dénaturation et notamment la réduction de ces protéines dans cette technique défavorisent leur reconnaissance par les IgE de ces sérums.

L'immunoblotting semble être plus sensible; il permet d'observer quels constituants sont reconnus par les anticorps et pour chaque classe de protéines le nombre de constituants reconnus. Les différences obtenues entre le test ELISA et l'immunoblotting peuvent s'expliquer également par la différence de présentation des antigènes. En ELISA, les antigènes sont fixés sur le support en plastique par phénomène d'adsorption alors qu'en immunoblotting les antigènes sont dans une conformation plus libre et plus dénaturée ce qui permet peut être un meilleur accès des antigènes pour les anticorps. Mais les deux techniques restent comme même complémentaires pour tester et caractériser les sérums.

3. Identification par spectrométrie de masse

Les bandes protéiques séparées par électrophorèse monodimensionnelle (Figure 38), les plus fréquemment reconnues par les sérums des patients allergiques au blé pour l'extrait métabolique de la variété de blé saharien Kahlaya et/ ou ayant les intensités les plus importantes ont été prélevées sur le gel correspondant et identifiées par analyse protéomique.

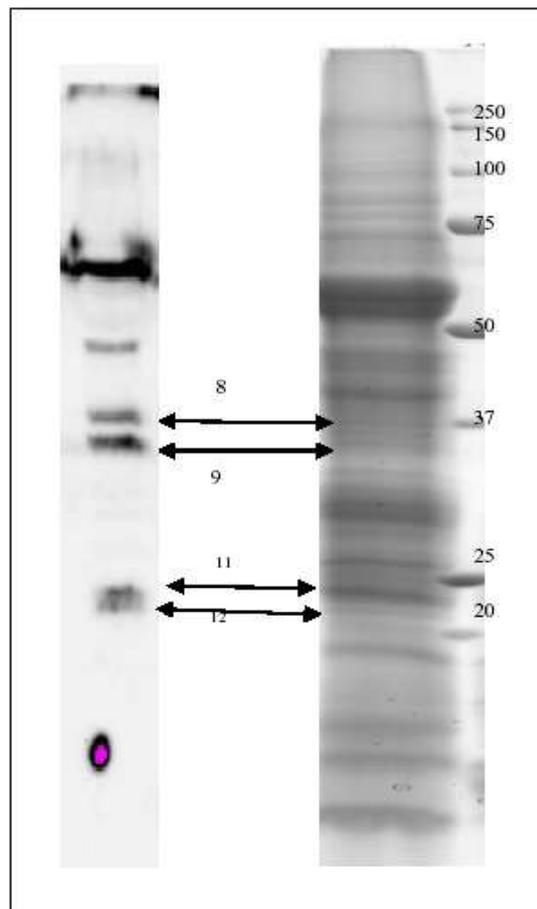


Figure 38 : électrophorèse monodimensionnelle de l'extrait métabolique d'une variété de blé saharien. les différentes bandes protéiques analysées et identifiées sont numérotées de 7, 8 , 11 et 12.

Chaque protéine, ainsi hydrolysée par la trypsine engendre une carte peptidique analysée par spectrométrie de masse LC-MS/MS dont les masses sont confrontées à la base de données protéiques de Uniprot viridiplantae.

La démarche est détaillée à titre d'exemple, pour la bande 11 qui est aux environs de 24 KDa la carte peptidique obtenue après acquisition au spectromètre de masse est représentée en Figure 39.

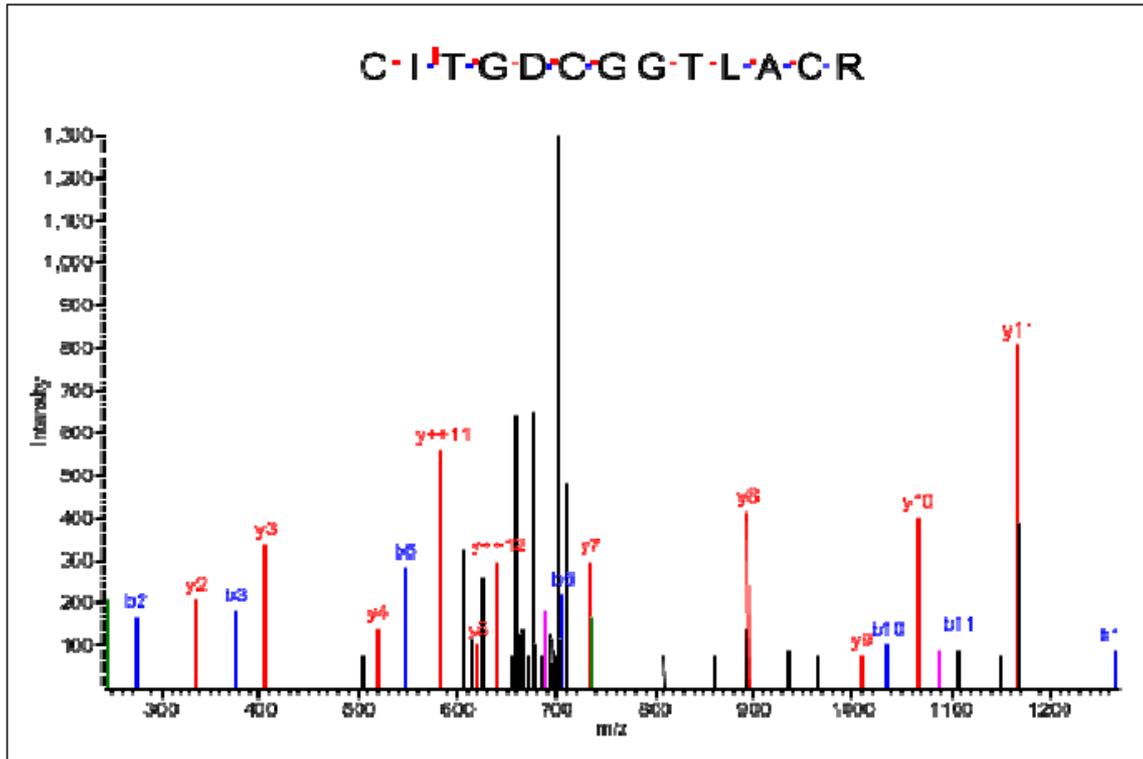


Figure 39 : profil peptidique en spectrométrie de masse LC-MS/MS du digestat trypsique de la bande 11

Les résultats des données peptidiques de la bande 11 analysés par le logiciel Xtandem se présentent sous forme de tableau telle qu'en tableau 34.

Tableau 34 : résultats donnés par le logiciel Xtandem lors de la confrontation de la carte peptidique obtenue après digestion trypsique et analyse du spectromètre de masse LC-MS/MS pour la bande 11 de l'électrophorèse monodimensionnelle du blé

Protein number	Sub-group	description	Log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Uniques
B11=OB03122	1.01	tr Q8S4P7 Q8S4P7_WHEA T Thaumatin-like protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	-29,680763	45	23,5	9	3	7

La première information donnée est l'identité de la protéine analysée, à savoir la thaumatin-like protein du blé tr|Q8S4P7|Q8S4P7. Les peptides analysés recouvrent 45 % de la séquence de la protéine.

Pour la bande 11, le logiciel a pu identifier trois protéines parmi les masses analysées : la thaumatin-like protein, la serpine Z1A du blé et la Glutathione transférase du blé. Les zones de recouvrement sont 45 %, 24 % et 19 % respectivement.

Les peptides générés lors de l'hydrolyse trypsique de la bande 11, sont retrouvés dans la séquence de ces protéines (Figure 40).

```

>tr|Q8S4P7|Q8S4P7_WHEAT
  Thaumatin-like protein
  OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1:
MASTRVLHLIALVLAVATAADAATIIVVNRCSYTVVWPGALPGG
GVRLDPQSWALNMPAGTAGARVWPRTGCTFDGSGRGRCITGD
CGGTLACRVSGQQPTTLAEYTLGQGGNKDFDLSVIDGFNVPM
NFEPVGGSCRAARCATDITKECLKELQVPGGCASACGKFGGDT
YCCRQFEHNCPPTNYSKFFKGKCPDAYSYAKDDQTSTFTCPA
GTNYQIVLCP

>tr|Q8RW03|Q8RW03_WHEAT Glutathione
  transferase OS=Triticum aestivum
  GN=gstulB PE=2 SV=1 :
MAGEKGLVLLDFWVSPFGQVRVIALAEKGLPYEYVEEDLMAGK
SDRLLRSNPVHKKI PVLLHDGRPVNESLIILQYLEDAFPDA
LLPSDPYARAQARFWADYVDKVKYDCGSRLWKLKGEPQAQARA
EMLEILKTLTGALGDKPFFGGDKFGLVDAAFAPFTAWFHSYER
YGEFSLAEVAPKIAAWAKRCGERESVAKSLYSPDKVYDFIGLL
KKKGIE

>sp|Q41593|SPZ1A_WHEAT Serpin-Z1A
  OS=Triticum aestivum GN=WZCI PE=1
  SV=1 :
MATTLATDVRLSIAHQTRFALRLASTISSNPKSAASNAAFSPV
SLYSALSLLAAGAGSATRDQLVATLGTGKVEGLHALAEQVVQF
VLADASSTGGSACRFANGVFVDASLLLKPSFQEIAVCKYKAET
QSVDFQTKAAEVTTQVNSWVEKVTSGRIKDILPPGSIDNTTKL
VLANALYFKGAWTEQFDSYGTKNDFYLLDGSSVQTPFMSSMD
DQYLLSSDGLKVLKLPYKQGGDNRQFFMYILLPEAPGGLSSLA
EKLSAEPDFLERHI PRQRVALRQFKLPKFKISFGIEASDLLKC
LGLQLPFGDEADSEMVDSLMPQGLRVSVVFHQAFVEVNEQGT
EAAASTAIKMVLQQARPPSVMDFIADHPFLFLVREDISGVVLF
MGHVVNPLLSS

```

Figure 40 : alignement des séquences protéiques de la thaumatin-like protein (tr|Q8S4P7), la glutathione transférase (tr|Q8RW03|Q8RW03) et serpine Z1A (sp|Q41593|SPZ1A) avec le format FASTA .

Nous avons procédé aux mêmes analyses avec toutes les bandes numérotées sur le gel monodimensionnel (Figure 38) dont les résultats sont répertoriés dans le tableau 35.

Tableau 35 : identification des bandes protéiques du gel monodimensionnel de la figure 38

N° de bande protéique	Protéine identifiée	Séquences peptidiques	% de recouvrement de la protéine par les peptides
8	WHEAT Malate dehydrogenase	KKMDATAQELSEEK AQASALEAHAAPNCK MDATAQELSEEK NAIIWGNHSSSQYPDVNHATVK KKMDATAQELSEEKALAYSCLA LGVQVSDVKNIIWGNHSSSQYPDVNHATVK KMDATAQELSEEKALAYSCLA VLVVANPANTNALILK MDATAQELSEEKALAYSCLA TPSGEKPVRELVQDDEWLNGEFIATVQQR GVKMELIDAAFLLK VLVTGAAGQIGYALVPMIAR ELVQDDEWLNGEFIATVQQR GVVATTDVVEACTGVNVAVMVGGFPR GVMLGADQPVLHMLDIEFAAEALKGVK GVMLGADQPVLHMLDIEFAAEALK	59
	WHEAT Fructose-bisphosphate aldolase	CKANSEATLGTYK GILAADESTGTIGKR YKDELIKNAAYIGTPGK GILAADESTGTIGK ALNDQHVLLEGTLLKPNMVTSGSDSK CAYVTEIVLAACYK TVPAAVPAIVFLSGGQSEEEATLNLNAMNKLQTK YAIICQENGLVPIVEPEILVDGPHDIDR TVPAAVPAIVFLSGGQSEEEATLNLNAMNK ELLFCTPGALQYLSGVILFEETLYQSTK	55
	WHEAT ATP synthase subunit beta	CALVYGQMNEPPGAR IINVIGEPIDHKGDIK AHGGFSVFAGVGER IGLFGGAGVGK LVLEVAQHLGENVVR FTQANSEVSALLGR IPSAVGYQPTLATDLGGLQER EAPAFVEQATEQQILVTGIK QISELGIYPAVDPLDSTSR VGLTGLTVAEHFRDAEGQDVLLFIDNIFR DAEGQDVLLFIDNIFR	31
	WHEAT Cysteine synthase	GTGGKIDGLVSGIGTGGTITGTGK IDGLVSGIGTGGTITGTGK IGYSMITDAEEKGFIVPGK SVLIEPTSGNTGIGLAFMAAAK TPNSYILQQFENAANPK AFGAELILDPLLGMK DVTELIGNTPLVYLNK IQGIGAGFIPGVLDVDIIDETIQVSSDESIEMAK	45
	WHEAT Beta amylase	VPSHAAEITAGYYNLHDR HGDKILDEANKVFLGHR AAAAMVGHPEWEFPR TRFFVDNGTYLTEQGR FFVDNGTYLTEQGR FFLAWYSNNLIK YPSYPQSHGWSFPGIGEFICYDKYLQADFK DSEQSSQAMSAPEELVQQVLSAGWR	50

	WHEAT Serpin-Z2A	YKAEAQSVDFQTK VTTGLIKDILPAGSISNTTR HLGLQLPFSDEADLSEMVDSPMPQGLR EDTSGVVLFIGHVVNPLR QFSMYILLPEAPSGIWSLAEK LHALAEQVVQFVLADASYADSPR SDYFYLLDGSSIQTPFMYSSEEQYISSSDGLK DQLVATLGEGEAERLHALAEQVVQFVLADASYADSPR	42
9	WHEAT Adenosylhomocysteinase	LVGVSEETTTGVKR SGKVPDPESTDNPEFK VPDPESTDNPEFK GETLEEYWWCTER LELELAEVEMPGLMACR CLDWGVGGGPDIVDDGGDATLLIHEGVK DLSQADFGRLLELELAEVEMPGLMACR CLDWGAGGGPDIVDDGGDATLLIHEGVKAEEEFEK CLDWGVGGGPDIVDDGGDATLLIHEGVKAEEEFEK	19
	WHEAT Globulin 3	SFHALAQHDVR AKDQQDEGFVAGPEQQEHER ILHTISVPGK QGKEEEKSISIVR QGDVIVAPAGSIMHLANTDGR QASEGDQGHHWPLPPFR AFVVPGLTDADGVGYVAQGEGLTVIENGEK	21
	WHEAT HSP70	YKAEDEEHKKK MYQGAAPDMGGGMGMDMEDMPAGGGGAGPK ATAGDTHLGGEDFDNR NQVAMNPTNTVFDK VQQLLQDFFNGK SINPDEAVAYGASVQAAILSGEGNEK	16
11	WHEAT Thaumatin-like protein	TGCTFDGSGR GQFEHNCPTNYSK CPDAYSYAK CITGDCGGTLACR ECLKELQVPGGCASACGK VSGQQPTTLAEYTLGQGGNK LDPGQSWALNMPAGTAGAR LDPGQSWALNMPAGTAGAR	45
	WHEAT Serpin-Z1A	YKAETQSVDFQTK IKDILPPGSIDNTTK AAEVTTQVNSWVEK VSSVFHQAFVEVNEQGTEAAASTAIK SAASNAAFSPVSLYSALSLLAAGAGSATR	24
	WHEAT Glutathione transferase	YGEFSLAEVAPK GLPYEYVEEDLMAGK SLYSPDKVYDFIGLLK	19
12	WHEAT rRNA N-glycosidase	TSPASTGLTLATR QQMADAVTALYGR	9

Toutes les données obtenues lors de l'analyse et conduisant aux résultats présentés dans le tableau 10 sont répertoriées dans l'annexe VIII. Toutes les séquences des peptides sont données par rapport à la séquence protéique de la base de données Uniprot vridiplantae.

Le pourcentage de recouvrement est exprimé par rapport à la protéine entière. Plusieurs protéines ont été identifiées dans la bande protéique 8 (Figure 38). Parmi ces protéines une Beta amylase qui constitue seulement un fragment de la protéine entière. Koppelman et al. (2003) a décrit ce phénomène d'hydrolyse naturelle pour les globulines de l'arachide. Il est donc normal d'observer des taux de recouvrement de la protéine entière puisque les peptides générés proviennent uniquement d'un fragment de la Beta amylase.

Par ailleurs, l'absence de pourcentage de recouvrement très important (> 90 %) peut résulter aussi des différences de capacité d'ionisation des peptides générés par l'hydrolyse enzymatique lors de l'ionisation au spectromètre de masse.

La réalisation de la carte protéique des quatre bandes du blé analysées nous amène à discuter de plusieurs points. Il a été possible d'identifier treize protéines du blé appartenant à quatre bandes protéiques différentes de blé qui ont été reconnues par les IgE de patients allergiques (Tableau 36). Aucun inhibiteur d'alpha amylase n'a pu être retrouvé dans la zone de masse moléculaire entre 20 et 25 KDa (bandes 11 et 12).

L'analyse des bandes protéiques séparées par électrophorèse monodimensionnelle permet de souligner la forte teneur en protéines et donc l'hétérogénéité dans leur composition.

Parmi les six protéines identifiées dans la bande protéique 8 qui se situe dans la zone de masse moléculaire aux environs de 37 KDa, trois protéines ; une WHEAT Fructose-bisphosphate aldolase, une WHEAT Beta amylase et une WHEAT Serpin-Z2A ; ont été déjà décrites comme allergènes.

Les travaux de Weiss et al. (1997) ont identifié une Fructose-bisphosphate aldolase comme un des allergènes impliqués dans l'asthme du boulanger. Baur et Posch. (1998) ont également identifié une Fructose-bisphosphate aldolase comme allergène de la fraction albumines/globulines.

Conformément aux travaux de Sandiford et al. (1994) ; Baur et al. (1994) ; Sotkovský et al. (2008) et Larré et al. (2011), nous avons identifié une Beta amylase comme allergène.

Aussi les travaux de Sander et al. (2001), Akagawa et al. (2007), Sotkovský et al. (2008), Sander et al. (2011) et Larré et al. (2011) montrent que la serpine est un allergène.

Un groupe de trois protéines a été identifié dans la bande protéique 9 dont l'un des membres est une WHEAT Globulin 3. Larré et al. (2011) décrivent aussi cette protéine comme allergène.

Dans la bande protéique 11, les trois protéines identifiées : WHEAT Thaumatin-like protein, WHEAT Serpin-Z1A et WHEAT Glutathione transférase sont des allergènes.

Les travaux récents de Lehto et al. (2010) ; Sotkovský et al. (2011) et Salcedo et al. (2011) montrent que la thaumatin like protein est un des allergènes de la farine de blé impliqués dans l'asthme du boulanger. Il a été également mis en évidence par Pahr et al. (2012) que la Glutathione transférase du blé comme étant un allergène reconnu par les patients souffrant d'une allergie respiratoire au blé.

IV. Conclusion

Cette première analyse de la réactivité IgE d'allergènes des différentes familles de protéines de céréale a montré que toutes les protéines sont reconnues par les patients quelque soit la classe clinique observée. Des différences de comportement en termes d'intensité de réponse ont été observées par rapport à l'origine des patients allergique au blé.

Dans notre étude, la fraction albumines/globulines peut être décrite comme un allergène majeur car plus de 90% des sérums réagissent en immunoblotting. Les IgE de tous les sérums reconnaissent plus d'une seule protéine de blé et les résultats permettent d'observer que l'immunoréactivité varie en fonction des génotypes.

Les discordances de résultats d'immunoréactivité observées pour le même test biochimique sont d'une part dues aux différences entre les patients (âge, clinique, sensibilisation et origine...) et d'autre part à la nature même du génotype (espèce, identité allélique, composition protéique...). Aucune spécificité de la réponse IgE ne semble réellement se détacher parmi notre échantillon d'étude. L'établissement d'une réelle corrélation entre le profil de réponse et la clinique du patient allergique n'a pas pu être possible, ce qui souligne la complexité du problème de l'allergie au blé. Néanmoins, nous avons pu montrer que l'intensité de réponse IgE spécifique est significativement plus importante pour les patients français. Ainsi le profil antigénique qui ressort de ces résultats est composé de cinq antigènes majeurs, les albumines/globulines, les α/β , γ et ω gliadines et les sous unités gluténines de faible poids moléculaire et d'un antigène mineur les sous unités gluténines de haut poids moléculaire pour les patients français et algériens. Il est donc difficile de conclure sur le type de sensibilisation à un ou plusieurs épitopes communs de ces patients.

Plusieurs bandes protéiques reconnues par les IgE de patients allergiques sont observées pour la fraction métabolique du blé sous fraction des albumines/globulines, ce qui met en évidence un nombre important d'allergènes potentiels dans cette fraction du blé. Quatre bandes protéiques ont été identifiées par analyse protéomique. Confronté par l'analyse en spectrométrie de masse LC-MS/MS, nous pouvons suggérer l'existence de treize allergènes du blé dans les quatre groupes analysés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les problèmes appellent des solutions. Les solutions apportent de nouveaux problèmes.

Le travail de thèse a pour fil conducteur la diversité génétique des céréales et l'allergie à ces céréales.

Dans la première partie de ce travail se rapportant à l'analyse de la diversité génétique des céréales, nous avons engagé un programme d'identification des protéines de réserve de trois collections : une collection de triticales et deux collections de blés constituant une base des ressources génétiques des blés cultivés en Algérie. Dans les paragraphes suivants sont synthétisés les résultats obtenus:

1- L'analyse des diagrammes électrophorétiques des 69 triticales hexaploïdes nous a permis de recenser 36 allèles exprimés aux sept loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Gli-R2*, *Glu-B2*, *Glu-A3*, *Glu-B3*. Cette diversité a fait ressortir deux grands groupes de triticales cultivés : les triticales du Nord et les triticales du Sud.

2- La collection de blés botaniques représente un échantillon important de ressources génétiques de blé dur ancien collecté en Algérie. Ce blé a été cultivé extensivement pendant plusieurs centaines d'années. Durant cette longue période, ces espèces ont acquis une considérable diversification encouragée par la diversité des climats et les croisements spontanés menant à une vaste diversité génétique des variétés. En 1930, Ducellier a décrit toutes les espèces cultivées en Algérie. A son époque, il a pu identifier 29 variétés locales. Certaines de ces variétés ont été perdues, et un total de 22 variétés locales est confirmé.

Dans ce travail, 17 variétés sur les 22 existantes sont analysées. Les analyses électrophorétiques ont permis de montrer une grande variabilité allélique. Un total de 35 différents allèles est identifié au niveau des cinq loci étudiés. Trois nouveaux allèles sont détectés, 2 au *Glu-B1* codant pour 4 nouvelles sous unités de HPM et un au *Glu-B3* codant pour des sous unités de FPM.

La combinaison entre la variabilité allélique des gluténines détectée et certains caractères morphologiques et géographiques des accessions nous ont permis de réduire la collection composée de 856 accessions à seulement 21 accessions composant une core collection représentative de toute la variabilité. Rassembler une core collection est l'un des moyens les plus efficaces dans les processus d'évaluation de la diversité génétique. Avoir des échantillons représentatifs de grandes collections est un moyen pour réduire les coûts des recherches et faciliter la mise en valeur des allèles d'intérêt qui pourraient être utilisés dans les différents programmes de sélection.

3- Les blés durs et tendres des oasis algériennes ont montré une importante variabilité génétique. Chez les variétés de blé tendre 3, 9 (dont 1 nouveau) et 4 allèles sont observés aux loci *Glu-A1*, *Glu-B1* et *Glu-D1* codant pour les SG-HMW, respectivement. Un polymorphisme similaire a été trouvé pour les SG-FPM avec 4, 9 et 3 allèles identifiés aux loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-D3* respectivement. Dans la collection de blé dur, 3 allèles sont exprimés au locus *Glu-A1* et 9 au *Glu-B1* (dont 1 est nouveau). Au loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-B2* codant pour les SG-FPM, 7, 8, (dont 1 nouveau) et 2 allèles sont identifiés respectivement.

Du point de vue qualité, les blés durs algériens ont un pourcentage élevé d'allèles codant pour les SG-FPM reliés à la qualité du gluten comme *Glu-A3a*, *c*, *d*, *h* et *Glu-B3a* et *c*. Les SG-HPM, apparaissent jouer un rôle beaucoup moins important que les SG-FPM dans la qualité des produits finis à base de blé dur.

L'identification de ce grand polymorphisme de déterminants génétiques intervenant dans l'expression des sous unités gluténines que présentent ces collections pourrait être utilisé dans :

- L'identification des accessions ayant un rapport avec la qualité, en s'appuyant sur les données du polymorphisme moléculaire.
- La mise en place d'une stratégie de conservation afin de limiter les risques de perte de la diversité génétique.
- L'identification variétale par l'utilisation des techniques d'électrophorèse comme moyens de classification taxonomique de diverses espèces végétales.
- La réalisation des croisements entre les blés cultivés et leurs apparentés pour améliorer la qualité. La plupart de ces protéines correspondent à des gènes à effets majeurs qui peuvent avantageusement être utilisés dans la sélection pour la qualité des blés. Cette information peut être utilisée pour sélectionner des variétés locales pour l'amélioration de la qualité et aussi pour les utiliser comme source de gènes pour développer de nouvelles lignées de meilleure qualité.
- L'étude et l'estimation de la valeur génétique des nouveaux allèles détectées dans les collections de blé durs. Il serait nécessaire d'étudier leurs effets comme marqueurs de qualité et la possibilité de leur utilisation dans les programmes de sélection des blés.

- L'étude de l'effet des allèles et des combinaisons alléliques pour lesquels il n'y a pas de données valables sur la qualité.

La création de variétés homogènes et reproductives dans l'agriculture moderne a imposé un rétrécissement de la diversité génétique pour de nombreux caractères. Cette érosion génétique exige d'être composée par un retour vers le patrimoine maintenu dans des variétés traditionnelles et des formes spontanées. Il serait intéressant de :

- Etablir un programme de sélection pour les variétés et accessions qui présentent des caractéristiques biochimiques d'intérêt.
- Réaliser l'inventaire des collections de blé qui existent dans toutes les régions du pays.
- Evaluer ces germplasm pour d'autres caractères d'intérêt tels que la résistance aux stress biotiques et abiotiques.
- Etudier les descendants des croisements entre les variétés les plus distantes pour mieux comprendre le déterminisme génétique des protéines de réserve en particulier.

Dans la deuxième partie de ce travail se rapportant à la recherche et la caractérisation des allergènes, nous avons extraits et caractérisé une partie du répertoire allergénique du blé. La caractérisation et l'identification des allergènes sont essentielles pour la compréhension de la réponse IgE spécifiques des patients allergiques au blé. La connaissance des entités mises en cause dans l'allergénicité d'un aliment pourra conduire au développement de tests de diagnostic *in vivo* et *in vitro* à la fois sensibles et spécifiques pour la discrimination des aliments ou protéines responsables de l'allergie. Les résultats obtenus sont très prometteurs autant dans l'analyse nouvelle de l'immunoréactivité d'allergènes déjà décrits dans la littérature que dans la découverte de nouvelles structures d'allergènes. Les résultats présentés illustrent bien, s'il en était besoin, la complexité du problème de l'allergie au blé. La multiplicité des allergènes, observée durant les différentes étapes de fractionnement ne représente qu'une partie du problème. En effet, l'implication de structures linéaires est évidente pour certaines protéines insensibles à la dénaturation et/ou renaturation tandis que l'existence de structures tridimensionnelles est démontrée par la discordance des résultats obtenus après de tels traitements pour d'autres entités. Il ne faut pas non plus occulter le potentiel de reconnaissance par les IgE de complexes macromoléculaires résultant de l'association de plusieurs protéines. L'intérêt de cette étude est donc d'aborder cette caractérisation par différentes techniques susceptibles de fournir des résultats

complémentaires et parfois discordants. La fréquence de réponse dirigée contre les différents allergènes est importante et non spécifique d'une famille de protéines donnée ou d'une classe clinique de patients. Il a pu être remarqué que les albumines/Globulines sont les plus fortement reconnues. Les allergènes caractérisés de manière non exhaustive par ces travaux sont relativement nombreux et ne sont pas spécifiques d'un sérum donné.

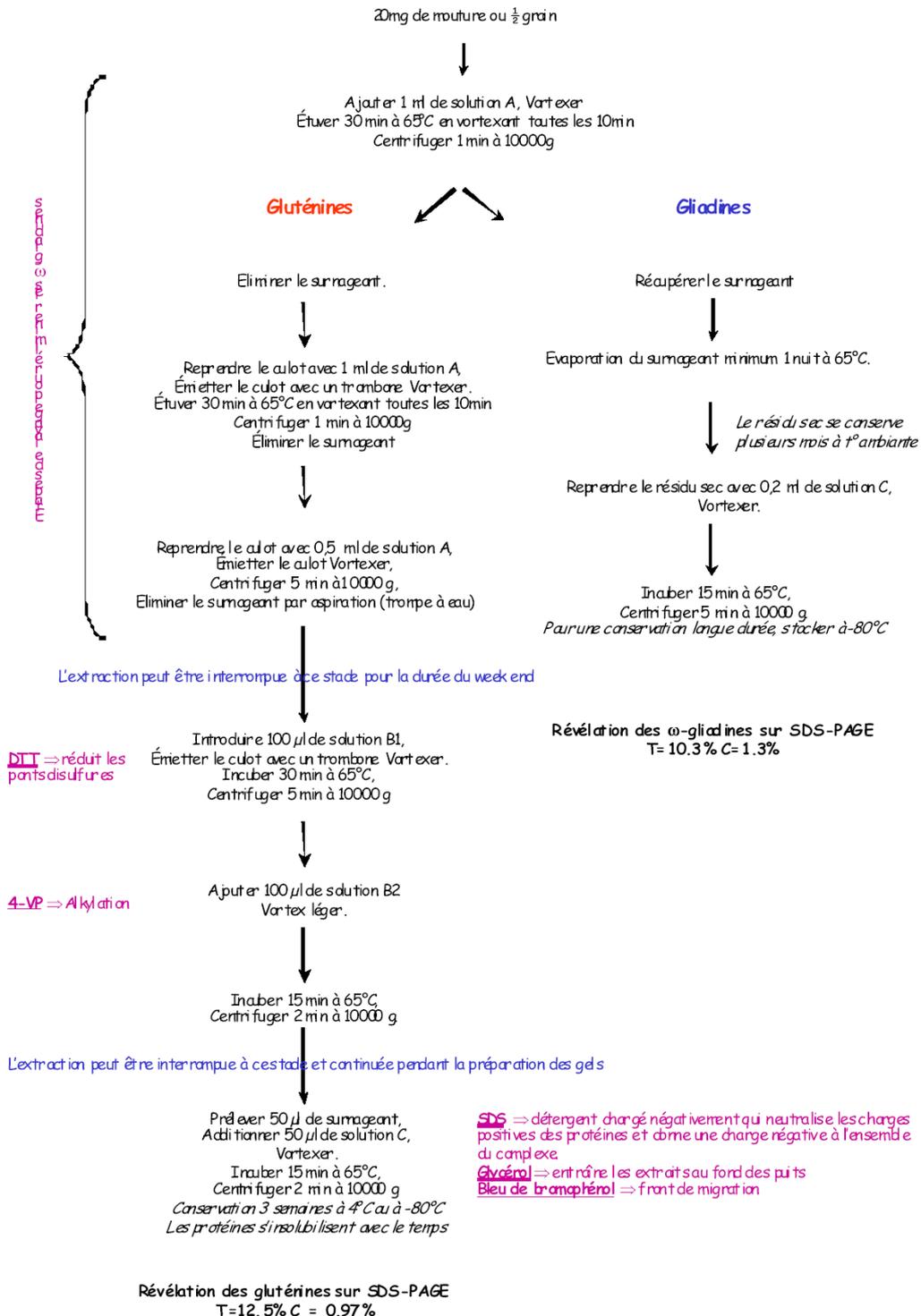
Plusieurs points suscitent de nouvelles interrogations, et ouvre donc la voie à des études futures. Dans la suite, il serait intéressant de :

- Etudier l'influence de la dégradation enzymatique sur l'immunoréactivité ce qui conduit à l'identification des régions préférentiellement reconnues par les IgE et de chercher à caractériser les épitopes conservés lors d'hydrolyses contrôlées ce qui permettrait de souligner certaines caractéristiques de ces allergènes et de proposer des explications quant à la complexité et l'hétérogénéité de la réponse IgE.
- Analyser de façon plus globale la résistance des allergènes de blé lors des traitements thermiques et des processus digestifs. Ces différences de résistance aux dégradations pourraient permettre de préciser le potentiel allergénique du blé.
- Etablir des liens éventuels entre spécificité et affinité de la réponse IgE et symptomatologie et rechercher une corrélation entre réponse immunitaire et état allergique du patient.
- Employer une sérothèque importante ou un panel plus large d'échantillon pour permettre d'étudier la diversité des réponses immunologiques chez des sujets atopiques.
- Utiliser des allergènes purifiés lors d'un test cutané pour permettre d'asseoir la réalité clinique de leur reconnaissance par les IgE.
- Traiter les patients de manière plus adaptée que par un régime d'éviction strict par la possibilité de sélectionner des variétés moins allergéniques, de produire des protéines recombinantes et l'on peut espérer des progrès permettant un jour d'aboutir à la production de vaccin pour les patients allergiques.

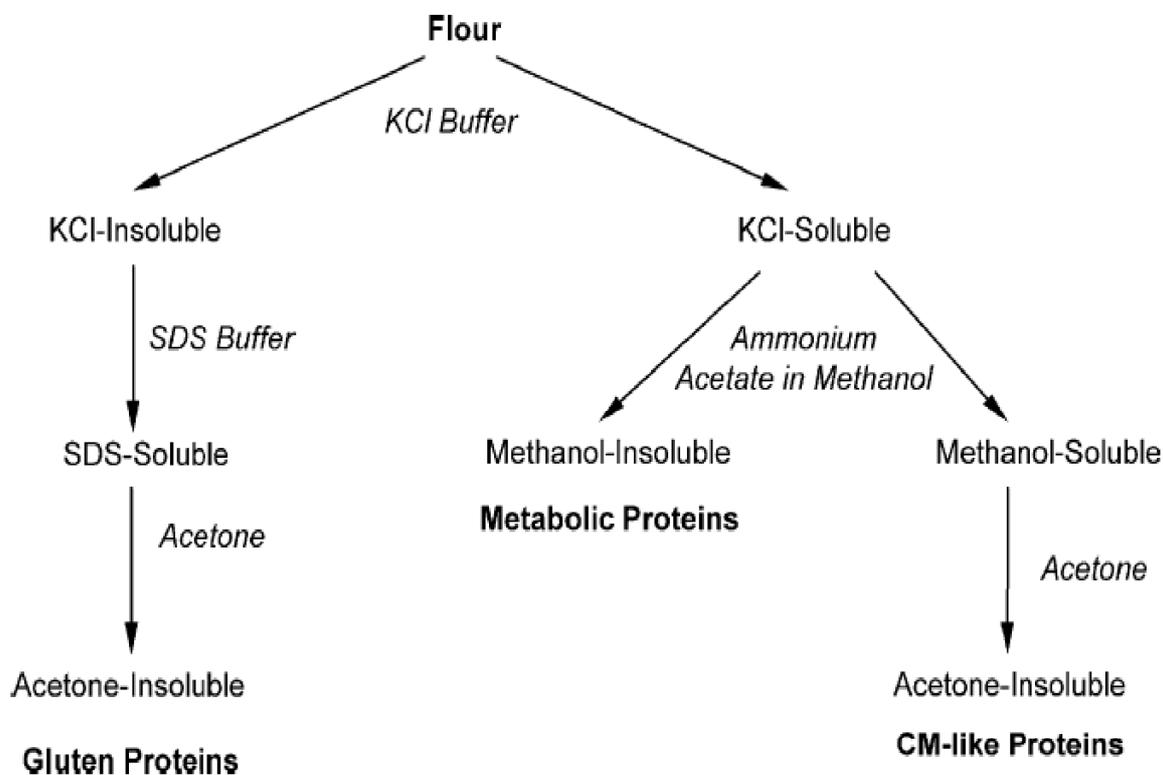
Nous sommes conscients que l'ensemble des projets décrits dans ces perspectives représente une somme de travail considérable. Il nous appartiendra de choisir parmi les différents sujets les approches à privilégier. Cependant, il nous paraissait intéressant d'exposer l'ensemble de ces perspectives pour montrer les différents aspects de l'étude de l'allergie au blé qui pourra être abordés par la suite.

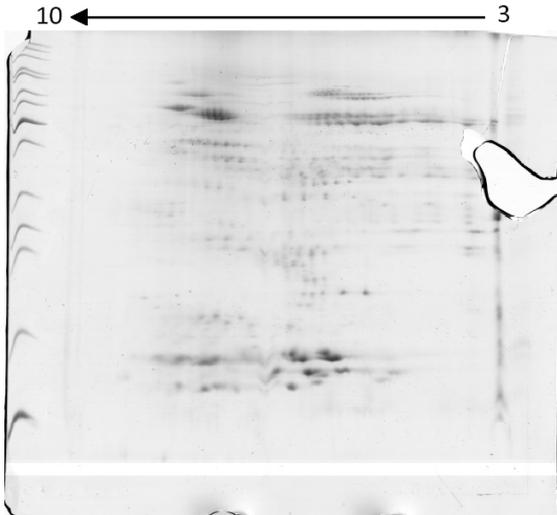
ANNEXES

Document de référence: Singh, Shepherd, *et al*, Journal of Cereal Science., 1991, 14, 203-208

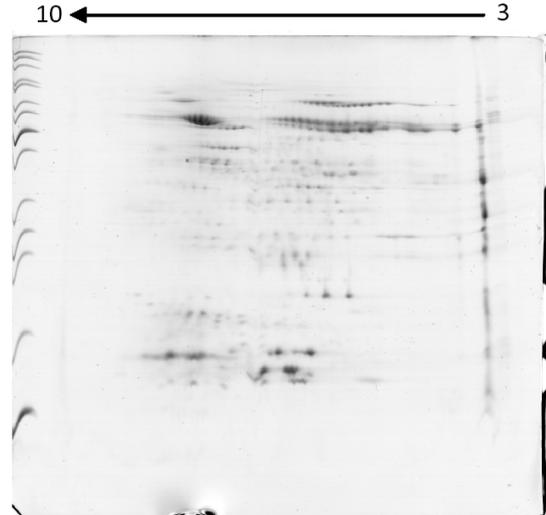


Document de référence: Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. *J of Cereal Science.*, **2004**, 40, 295-299.



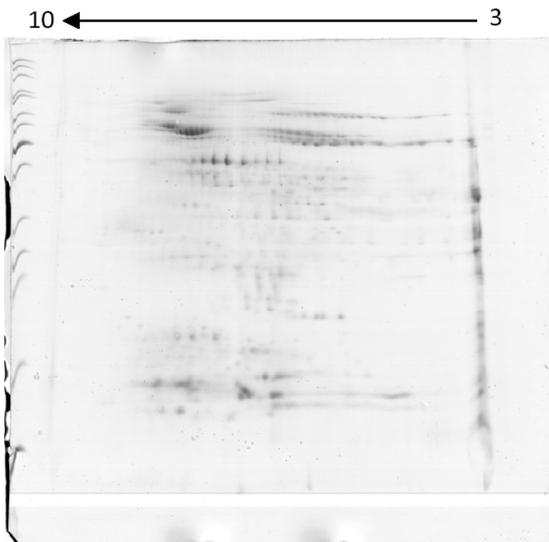


A1

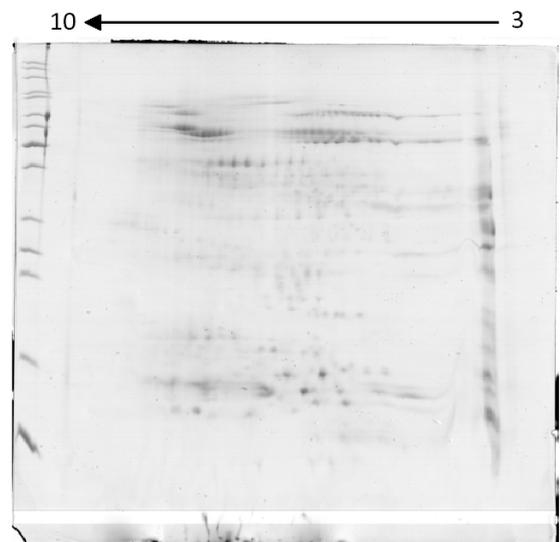


BLES

KA

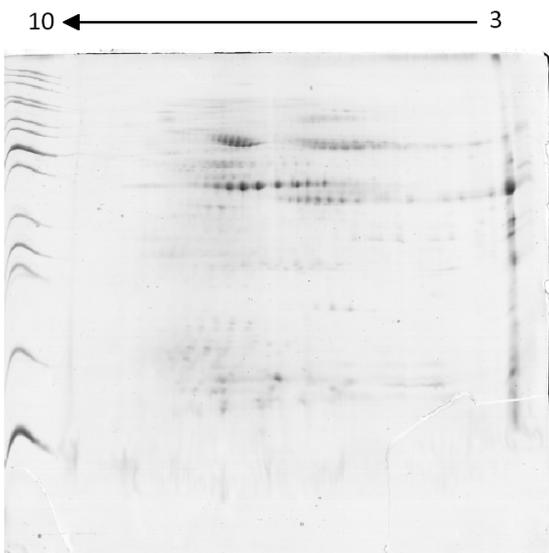


FA

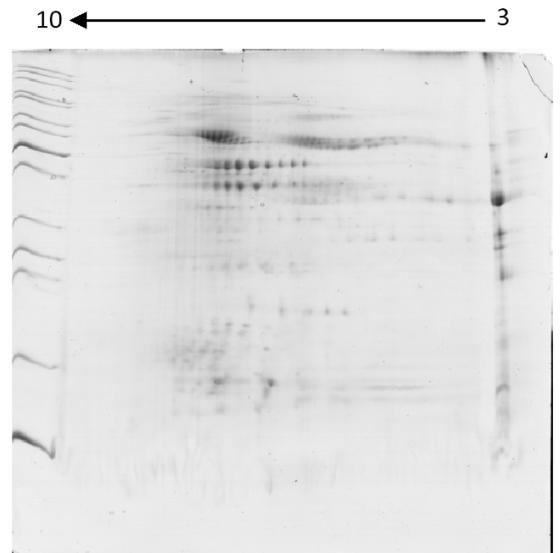


PO

TRITICALES

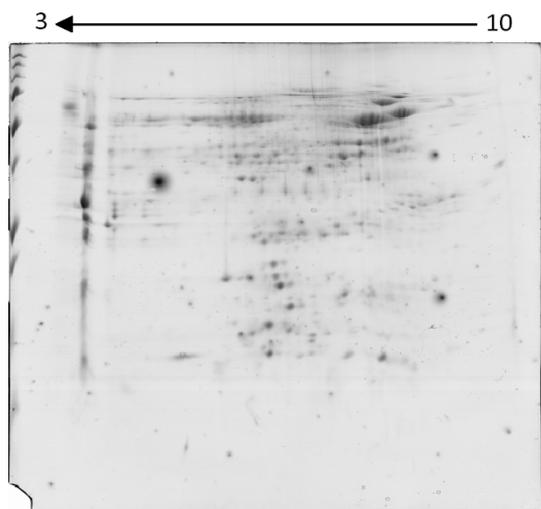


PET

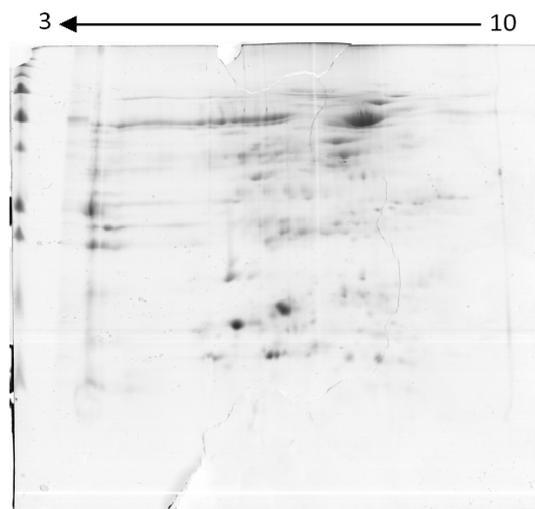


SEIGLES

LOC

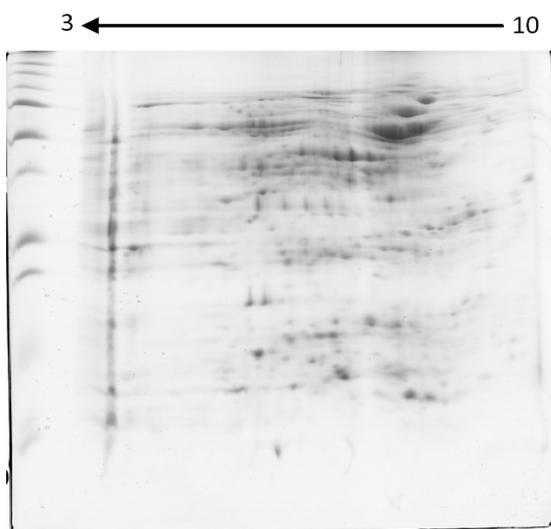


A1

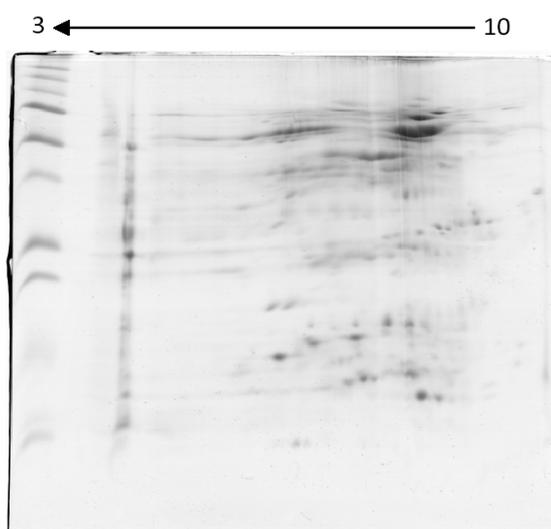


BLES

KA

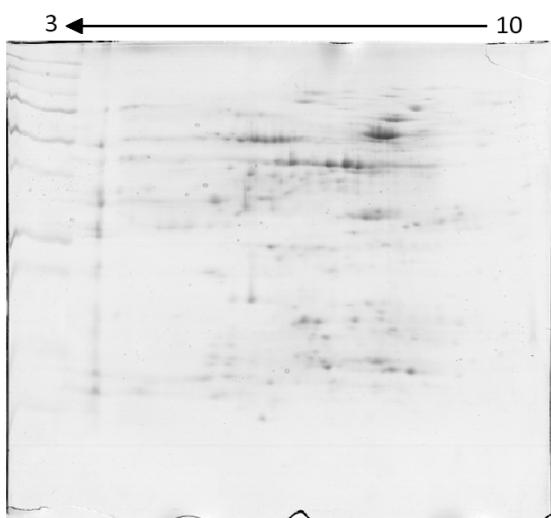


FA

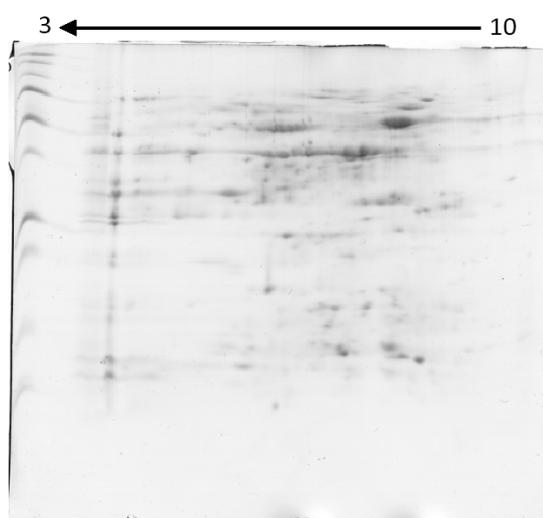


TRITICALES

PO

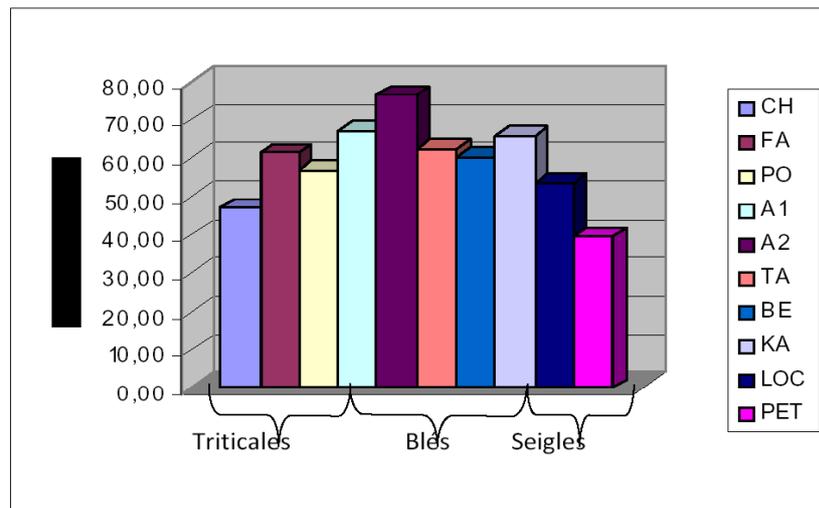


PET

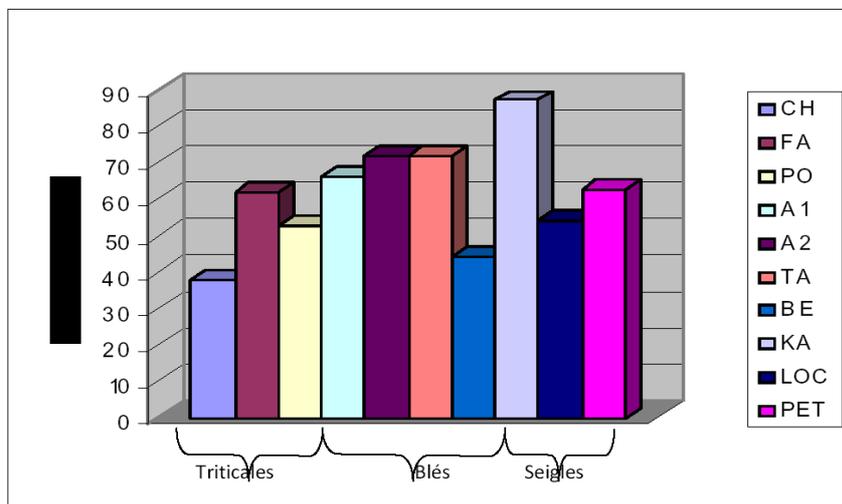


SEIGLES

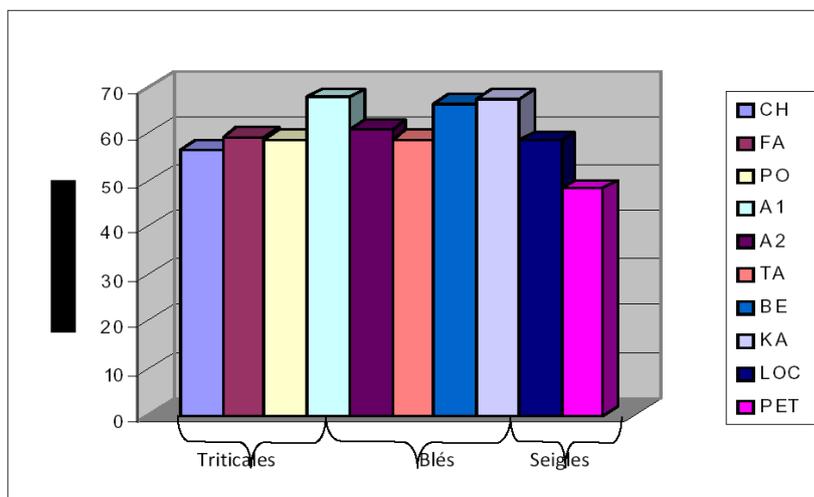
LOC



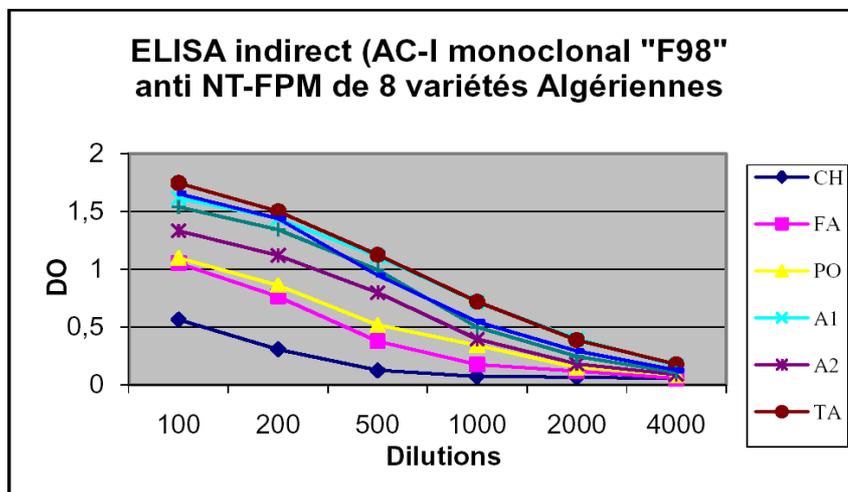
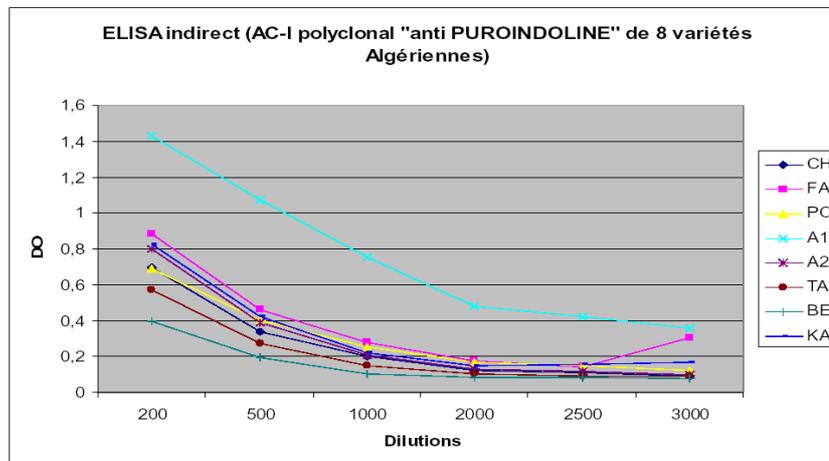
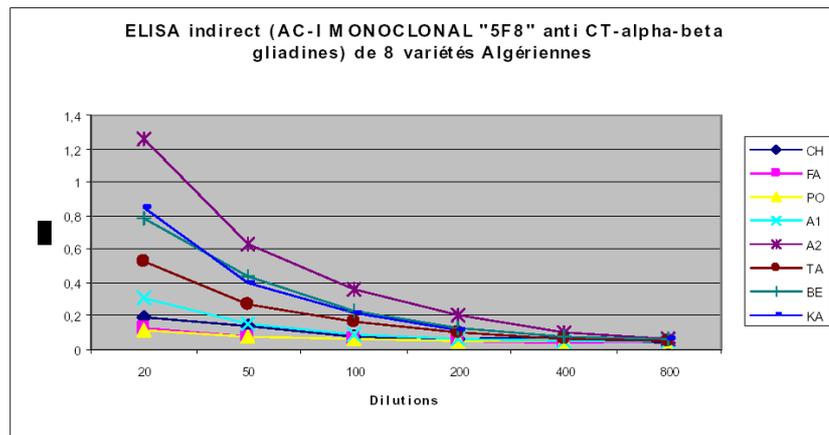
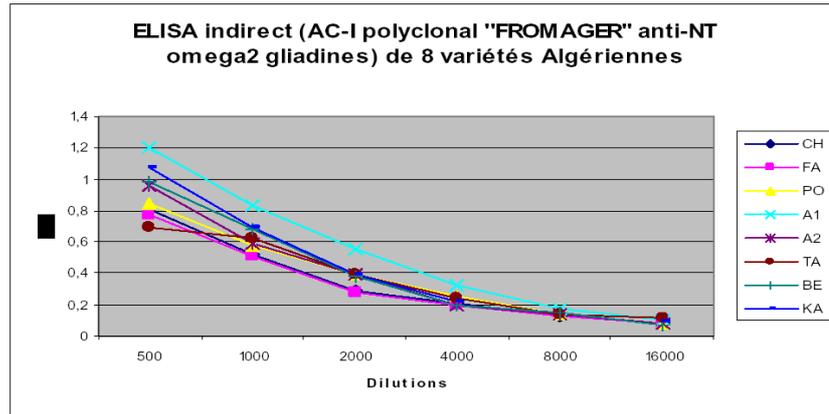
a : gluténines



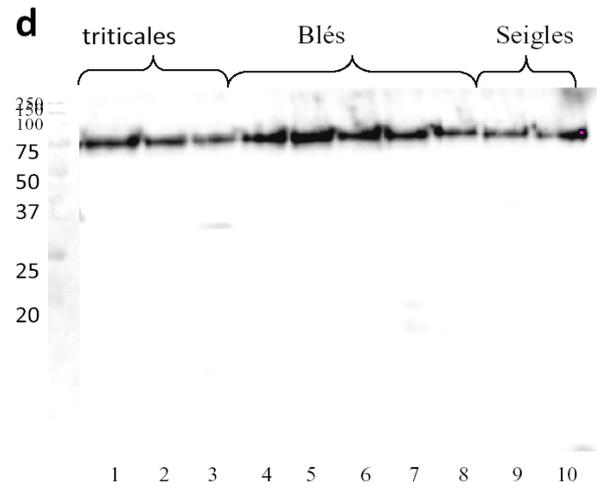
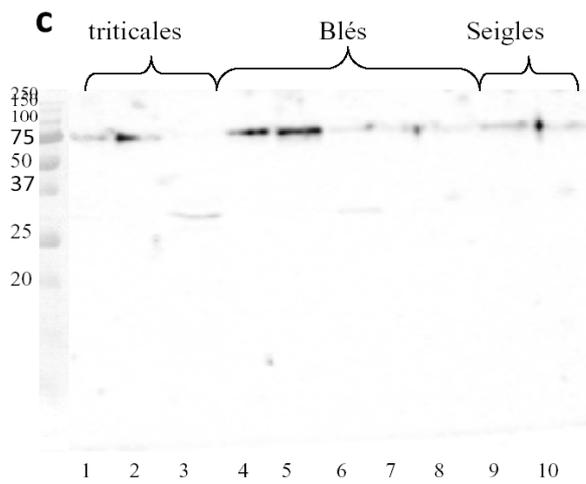
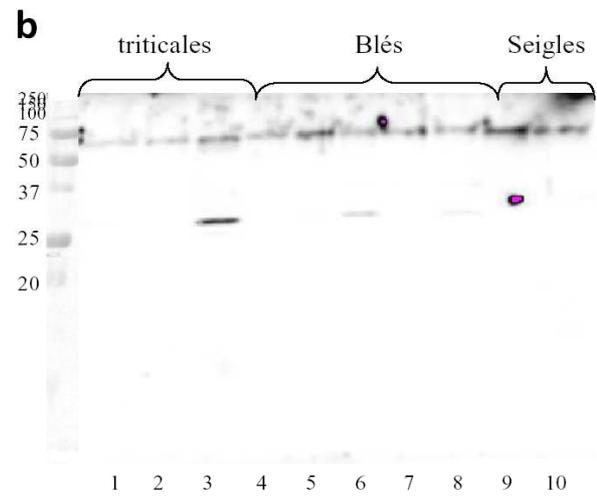
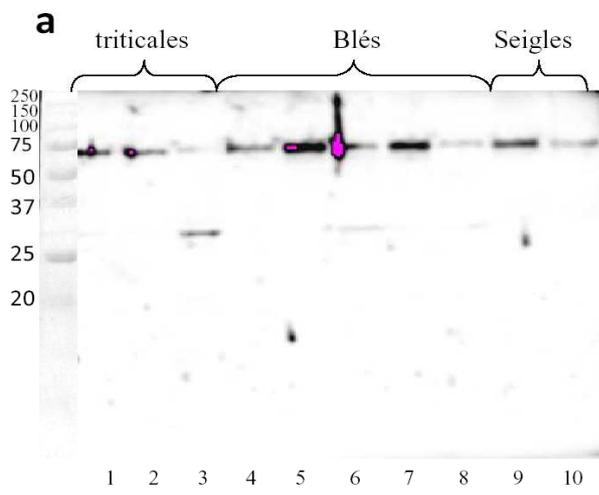
b : gliadines



c : albumines/globulines



Annexe VII : Immunoblotting en 1D. Réactivité des IgE de patients algériens allergiques à la farine de blé vis à vis de la fraction CM-like



Annexe VIII : Liste des protéines spécifiques identifiées par LC/MS-MS

OB03093	Bande 8	Environ 37 kDa								
Group	Sub-group	Description	log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Uniques		
1	1.01	tr A3KLL4 A3KLL4_WHEAT Malate dehydrogenase OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	-83,090965	59	35,4000015	58	-	16		
1	1.01	tr C3VNF1 C3VNF1_WHEAT Malate dehydrogenase OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	-83,090965	59	35,4000015	58	-	16		
2	2.01	tr F2CYG6 F2CYG6_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-62,058144	34	38,2000008	18	-	11		
3	3.01	tr C1J958 C1J958_SECCE Fructose-bisphosphate aldolase OS=Secale cereale PE=3 SV=1	-51,28479	61	38,7000008	13	3	12		
3	3.01	tr F2CXT7 F2CXT7_HORVD Fructose-bisphosphate aldolase OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-51,28479	61	38,7999992	13	3	12		
3	3.02	tr C1J959 C1J959_WHEAT Fructose-bisphosphate aldolase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	-44,099789	55	38,7000008	11	1	11		
4	4.01	tr F2DJJ2 F2DJJ2_HORVD ATP synthase subunit beta OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-59,712936	31	58,7999992	14	-	11		
4	4.01	tr Q41534 Q41534_WHEAT ATP synthase subunit beta OS=Triticum aestivum GN=atp2 PE=2 SV=1	-59,712936	31	59,0999985	14	-	11		
5	5.01	sp P38076 CYSK_WHEAT Cysteine synthase OS=Triticum aestivum GN=CYS1 PE=2 SV=1	-54,630241	45		34	13	-	8	
6	6.01	tr Q7X9M2 Q7X9M2_WHEAT Beta amylase (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	-44,348228	50	30,2000008	11	-	8		
7	7.01	tr F2E4C2 F2E4C2_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-44,714565	17	71,8000031	10	2	9		
7	7.02	sp P11143 HSP70_MAIZE Heat shock 70 kDa protein OS=Zea mays GN=HSP70 PE=3 SV=2	-39,378613	15	70,3000031	9	1	8		
7	7.02	tr B5L808 B5L808_DACGL Heat-shock protein 70 OS=Dactylis glomerata GN=Hsp70 PE=2 SV=1	-39,378613	15	71,5	9	1	8		
7	7.02	tr C4J410 C4J410_MAIZE Putative uncharacterized protein OS=Zea mays PE=2 SV=1	-39,378613	15	70,6999969	9	1	8		
7	7.02	tr C5WPE1 C5WPE1_SORBI Putative uncharacterized protein Sb01g039390 OS=Sorghum bicolor GN=Sb01g039390 PE=3 SV=1	-39,378613	15	71,3000031	9	1	8		
7	7.02	tr C5YEW8 C5YEW8_SORBI Putative uncharacterized protein Sb06g014400 OS=Sorghum bicolor GN=Sb06g014400 PE=3 SV=1	-39,378613	17	62,7000008	9	1	8		
7	7.02	tr G1FET0 G1FET0_PAELC Heat shock protein 70 OS=Paeonia lactiflora PE=2 SV=1	-39,378613	15	71,0999985	9	1	8		
7	7.02	tr H6UFA0 H6UFA0_PAESU Heat shock protein 70 OS=Paeonia suffruticosa GN=Hsp70 PE=2 SV=1	-39,378613	15	71,0999985	9	1	8		
7	7.02	tr Q6L509 Q6L509_ORYSJ Os05g0460000 protein OS=Oryza sativa subsp. japonica GN=OJ1281_H05.5 PE=2 SV=1	-39,378613	15	70,6999969	9	1	8		
8	8.01	sp Q9ST57 SPZ2A_WHEAT Serpin-Z2A OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	-34,637699	42	43,2000008	9	-	8		

Annexe VIII : Liste des protéines spécifiques identifiées par LC/MS-MS

OB03115	Bande9	environ 30kDa							
Group	Sub-group	Description	log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Uniques	
1	1.01	tr C1J958 C1J958_SECCE Fructose-bisphosphate aldolase OS=Secale cereale PE=3 SV=1	-57,24342	47	38,7000008	14	3	12	
1	1.02	tr C1J959 C1J959_WHEAT Fructose-bisphosphate aldolase OS=Triticum aestivum PE=3 SV=1	50,170658	38	38,7000008	11	1	10	
1	1.03	tr C5XRQ7 C5XRQ7_SORBI Fructose-bisphosphate aldolase OS=Sorghum bicolor GN=Sb04g019020 PE=3 SV=1	26,463249	23	38,5999985	6	1	6	
2	2.01	tr F2CZE7 F2CZE7_HORVD Adenosylhomocysteinase OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-31,31395	21	53,0999985	10	4	7	
2	2.01	tr Q4LB19 Q4LB19_HORVU Adenosylhomocysteinase OS=Hordeum vulgare GN=ahh2 PE=2 SV=1	-31,31395	21	53,0999985	10	4	7	
2	2.02	sp P32112 SAHH_WHEAT Adenosylhomocysteinase OS=Triticum aestivum GN=SAHH PE=2 SV=1	29,009256	19	53,2999992	8	2	7	
3	3.01	tr B7U6L4 B7U6L4_WHEAT Globulin 3 OS=Triticum aestivum GN=glo-3A PE=4 SV=1	30,919718	21	66,1999969	11	-	7	
4	4.01	sp P23901 ALDR_HORVU Aldose reductase OS=Hordeum vulgare PE=1 SV=1	32,204201	19	35,7000008	8	-	6	
4	4.01	tr F2D428 F2D428_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	32,204201	20	34,2999992	8	-	6	
4	4.01	tr F2DXQ5 F2DXQ5_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	32,204201	19	35,7000008	8	-	6	
4	4.01	tr Q42837 Q42837_HORVU Aldose reductase OS=Hordeum vulgare GN=AR-h PE=1 SV=1	32,204201	19	35,7999992	8	-	6	
5	5.01	tr F2D5B2 F2D5B2_HORVD ATP synthase subunit beta OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	39,170807	22	59,2000008	8	-	8	
5	5.01	tr F2DJJ2 F2DJJ2_HORVD ATP synthase subunit beta OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	39,170807	22	58,7999992	8	-	8	
5	5.01	tr Q41534 Q41534_WHEAT ATP synthase subunit beta OS=Triticum aestivum GN=atp2 PE=2 SV=1	39,170807	22	59,0999985	8	-	8	
6	6.01	tr Q7X9M2 Q7X9M2_WHEAT Beta amylase (Fragment) OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	28,010038	30	30,2000008	7	-	6	
7	7.01	tr Q6RS99 Q6RS99_TRITU Globulin OS=Triticum turgidum PE=4 SV=1	29,566551	42	24,8999996	6	-	6	
8	8.01	tr A3KLL4 A3KLL4_WHEAT Malate dehydrogenase OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	27,350365	26	35,4000015	6	-	6	
8	8.01	tr C3VNF1 C3VNF1_WHEAT Malate dehydrogenase OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	27,350365	26	35,4000015	6	-	6	

Annexe VIII : Liste des protéines spécifiques identifiées par LC/MS-MS

9	9.01	tr Q9SAU8 Q9SAU8_WHEAT HSP70 OS=Triticum aestivum GN=TaHSP70d PE=2 SV=1	31,270304	16	70,9000015	6	-	6
10	10.01	tr F2D4W3 F2D4W3_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	32,852871	25	48,0999985	6	-	6
OB03122	Bande 11	Environ 22 kDa						
Group	Sub-group	Description	log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Uniques
1	1.01	tr Q8S4P7 Q8S4P7_WHEAT Thaumatin-like protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	-29,680763	45	23,5	9	3	7
1	1.02	tr F2CTV7 F2CTV7_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-24,087305	36	23,5	7	1	6
1	1.02	tr O22462 O22462_HORVU Barperm1 (Fragment) OS=Hordeum vulgare GN=perm1 PE=2 SV=1	-24,087305	40	21,6000004	7	1	6
1	1.02	tr Q946Y9 Q946Y9_HORVU Thaumatin-like protein TLP7 OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1	-24,087305	36	23,5	7	1	6
2	2.01	sp Q9ST58 SPZ1C_WHEAT Serpin-Z1C OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	-15,386663	17	42,7999992	5	4	4
2	2.02	sp Q41593 SPZ1A_WHEAT Serpin-Z1A OS=Triticum aestivum GN=WZCI PE=1 SV=1	-20,823057	24	43	5	4	5
3	3.01	tr Q8RW03 Q8RW03_WHEAT Glutathione transferase OS=Triticum aestivum GN=gstu1B PE=2 SV=1	-14,105379	19	24,8999996	4	3	3
3	3.02	tr Q8RW02 Q8RW02_WHEAT Glutathione transferase OS=Triticum aestivum GN=gstu1C PE=2 SV=1	-10,458546	19	24,8999996	3	2	3
3	3.02	tr Q8RW04 Q8RW04_WHEAT Glutathione transferase OS=Triticum aestivum GN=gstu1A PE=2 SV=1	-10,458546	19	24,8999996	3	2	3
OB03102	Bande 12	Environ 21 kDa						
Group	Sub-group	Description	log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Uniques
1	1.01	tr F2CSK4 F2CSK4_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-6,7166986	7	37,4000015	3	-	2
2	2.01	tr F2CTV7 F2CTV7_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-15,387746	17	23,5	3	-	3
2	2.01	tr F2E541 F2E541_HORVD Predicted protein OS=Hordeum vulgare var. distichum PE=2 SV=1	-15,387746	18	23,6000004	3	-	3
2	2.01	tr O22462 O22462_HORVU Barperm1 (Fragment) OS=Hordeum vulgare GN=perm1 PE=2 SV=1	-15,387746	19	21,6000004	3	-	3
2	2.01	tr Q8S4P7 Q8S4P7_WHEAT Thaumatin-like protein OS=Triticum aestivum PE=2 SV=1	-15,387746	18	23,5	3	-	3
2	2.01	tr Q946Y9 Q946Y9_HORVU Thaumatin-like protein TLP7 OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1	-15,387746	17	23,5	3	-	3
2	2.01	tr Q946Z0 Q946Z0_HORVU Thaumatin-like protein TLP6 OS=Hordeum vulgare PE=2 SV=1	-15,387746	18	23,6000004	3	-	3

Annexe VIII : Liste des protéines spécifiques identifiées par LC/MS-MS

3	3.01	sp Q9ST57 SPZ2A_WHEAT Serpin-Z2A OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	-8,1214781	6	43,2000008	2	1	2
3	3.02	sp P93692 SPZ2B_WHEAT Serpin-Z2B OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1	-7,0883098	6	42,9000015	2	1	2
4	4.01	sp Q41593 SPZ1A_WHEAT Serpin-Z1A OS=Triticum aestivum GN=WZCI PE=1 SV=1	-7,8777843	6	43	2	-	2
5	5.01	tr Q07810 Q07810_WHEAT rRNA N-glycosidase OS=Triticum aestivum GN=trig7 PE=3 SV=1	-8,4943075	9	29,5	2	-	2
5	5.01	tr Q7M1Z3 Q7M1Z3_SECCE rRNA N-glycosidase OS=Secale cereale PE=3 SV=1	-8,4943075	9	30,1000004	2	-	2

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aalberse, R.C. Food Allergens. *Environ Tox Pharm.*, **1997**, 4, 55-60.

Aihara, M., Miyazawa, M., Osuna, H., Tsubaki, K., Ikebe, T., Aihara, Y., Ikezawa, Z. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: influence of concurrent aspirin administration on skin testing and provocation. *Br J Dermatol.*, **2002**, 146(3), 466-72.

Akagawa, M., Handoyo, T., et al. Proteomic Analysis of Wheat Flour Allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **2007**, 55(17), 6863-6870.

Alberse, R.C., Akkerdaas, J., Van Ree, R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy.*, **2001**, 56(6), 478-90.

Anderson, O.D., Hsia, C.C., Adalsteins, A.E., Lew, E.J.-L., Kasarda, D.D. Identification of several new classes of low-molecular-weight wheat gliadin-related proteins and genes. *Theor Appl Genet.*, **2001**, 103, 307-315.

Anderson, R.P., Degano, P., Godkin, A.J., Jewell, D.P., Hill, A.V. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.*, **2000**, 6(3), 337-42.

Arentz-Hansen, H., Korner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M., McAdam, S.N. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.*, **2000**. 191(4), 603-12.

Arentz-Hansen, H., McAdam, S.N., Molberg, O., Fleckenstein, B., Lundin, K.E., Jorgensen, T.J., Jung, G., Roepstorff, P., Sollid, L.M. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology.*, **2002**, 123(3), 803-9.

B

Baker, J. M., Hawkins, N. D., Ward, A., et al. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotechnology Journal.*, **2006**, 4(4), 381-392.

Bannon, G.A., et al. Engineering, characterization and in vitro efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* **2001**, 124, 70-72.

Battais, F., Richard, C., Leduc, V. Les allergènes du grain de blé : Wheat grain allergens. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.*, **2007**, 47, 171-174

Battais, F., Courcoux, P., Popineau, Y., et al. Food allergy to wheat: differences in immunoglobulin E binding proteins as function of age or symptoms. *Journal of Cereal Science.*, **2005**, 42,109-17.

Battais, F., Pineau, F., Popineau, Y., et al. Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and

- purified proteins from wheat flour. *Clin Exp Allergy.*, **2003**, 33, 962–70.
- Battais, F., Richard, C., Jacquenet, S., et al. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.*, **2008**, 40, 67–76.
- Battais F., Richard, C., Szustakowski, G., et al. Wheat flour allergy: an entire diagnostic tool for complex allergy. *Allerg Immunol.*, **2006**, 38(2), 59-61.
- Baudo, M. M., Lyons, R., Powers, S., et al. Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotechnology Journal.*, **2006**, 4(4), 369-380.
- Baur, X., Posch, A. Characterized allergens causing baker's asthma. *Allergy.*, **1998**, 53(6), 562- 6.
- Baur, X., Sander, I., Jansen, A., Czuppon, A.B. (). [Are amylases in bakery products and flour potential food allergens?]. *Schweiz Med Wochenschr.*, **1994**, 124(20), 846-51.
- Beaudouin, E., Renaudin, J.M., Morisset, M., Codreanu, F., Kanny, G., Moneretvautrin, D.A. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis—update and current data. *Allerg Immunol.*, **2006**, 38, 45–51.
- Bérot, S., Chiron, H., Nicolas, M., Gautier, S., Godon, B., Popineau, Y. Pilot scale preparation of wheat gluten protein fractions: Technological properties of the fractions. *International Journal of Food science and Technology.*, **1996**, 31, 77-83.
- Blanco, A., Bellomo, M.P., Cenci, A., de Giovanni, C., D'Ovidio, R., Lacono, E., Laddomado, B., Pagnotta, M.A., Porodduand, E., Sciancalepore, A., et al. A genetic linkage map of durum wheat. *Theor Appl Genet.*, **1998**, 97(5-6), 721-28.
- Blochet, J.E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M.F., Joudrier, P., Pezolet, M., Marion, D. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.*, **1993**, 329(3), 336-40.
- Bock,S.A., Munoz-Furlong,A., Sampson,H.A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2001**, 107, 191-193.
- Bredehorst, R., David, K. What establishes a protein as an allergen? *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, **2001**, 756(1-2), 33-40.
- Brown, J.W.S., Flavell, R.B. Fractionation of wheat gliadin and glutenin subunits by two dimensional electrophoresis and the role of group 6 and group 2 chromosomes in gliadin synthesis. *Theor Appl Genet.*, **1981**, 59, 349-359.
- Bruijnzeel-Koomen, C., Ortolani, C., Aas, K., Bindslev-Jensen, C., Bjorksten, B., Moneret-Vautrin, D. Wuthrich, B. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy.*, **1995**. 50(8), 623-35.
- Brunner, M., Walzer, M. Absorption of undigested proteins in human beings: the absorption of unaltered fish protein in adults. *Arch Intern Med.*, **1928**, 42, 173-9.

Buchanan, B.B., et al. Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1997**, 94(10), 5372-5377.

Bufe, A. Significance of IgE-binding epitopes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.*, **2001**, 107(2), 219-21.

Buhot, N., Douliez, J.P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B.F., Milat, M.L., Ponchet, M., Mikes, V., Kader, J.C., Blein, J.P. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett.*, **2001**, 509(1), 27-30.

Buonocore, V., Petrucci, T., Silano, V. Wheat protein inhibitors of α -amylase. *Phytochemistry.*, **1977**, 16: p. 811-820.

Burgess, S.R., Shewry, P.R. Identification of homologous globulins from embryos of wheat barley, rye and oats. *J. Exp. Botany.*, **1986**, 37, 1863-1871.

Burks, W., Helm, R., Stanley, S., Bannon, G.A. Food allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, **2001**, 1(3), 243-8.

Burks, W., Sampson, H.A., Bannon, G.A. Peanut allergens. *Allergy.*, **1998**, 53(8), 725-30.

Butler, J.E. The behavior of antigens and antibodies immobilized on a solid phase. *Structure of antigens.*, **1992**, 1, 209-259.

C

Camarca, A., Anderson, R.P., et al. Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: Implications for a Peptide-Based Therapy in Celiac Disease. *The Journal of Immunology.*, **2009**, 182(7), 4158-4166.

Carbonero, P., Garcia-Olmedo, F. A multigène family of trypsin/ α -amylase inhibitors from cereals., in *Seed proteins*, P.R. Shewry and R. Casey, Editors. **1999**, Kluwer Academic Publishers. p. 617-633.

Cassidy, B.G., Dvorak, J. Molecular characterization of a low-molecular-weight glutenin cDNA clone from *Triticum durum*. *Theor Appl Genet.*, **1991**, 81, 653-660.

Charvolin, D., Douliez, J.P., Marion, D., Cohen-Addad, C., Pebay-Peyroula, E. The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *Eur J Biochem.*, **1999**. 264(2), 562-8.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D. Protéines alimentaires. Lavoisier éd. **1985**, Paris: Tec.& Doc.

Chirido, F.G., Rumbo, M., Anon, M.C., Fossati, C.A. Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand J Gastroenterol.*, **1998**, 33(11), 1186-92.

Cho, M.J., et al. Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1999**, 96(25), 14641-14646.

Ciaffi, M., Tozzi, L., Lafiandra, D. Relationships between flour protein composition determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography and dough rheological parameters. *Cereal Chem.*, **1996**, 73, 346-351.

Clarke, B.C., Phongkham, T., Gianibelli, M.C., Beasley, H., Bekes, F. The characterisation and mapping of a family of LMW-gliadin genes: effects on dough properties and bread volume. *Theor Appl Genet.*, **2003**, 106(4), 629-35.

Clarke, B.C., Hobbs, M., Skylas, D., Appels, R. Genes active in developing wheat endosperm. *Funct Integr Genomics.*, **2000**, 1(1), 44-55.

Clarke, B.C., Larroque, O., Bekes, F., Somers, D., Appels, R. The frequent classes of genes expressed in wheat endosperm tissue as possible sources of genetic markers. *Aust J Agric Res.*, **2001**, 52, 1181-1193.

Colot, V., Bartels, D., Thompson, R., Flavell, R. Molecular characterization of an active wheat LMW glutenin gene and its relation to other wheat and barley prolamins genes. *Mol. Gen. Genet.*, **1989**. 216: p. 81-90.

Cornec, M. Comportement rhéologique du gluten : influence de la composition en prolamines et de leur d'association. *Université de Nantes.*, **1994**.

Cornell, H.J., Skerritt, J.H., Puy, R., Javadpour, M. Studies of in vitro gamma-interferon production in coeliac disease as a response to gliadin peptides. *Biochim Biophys Acta.*, **1994**, 1226(2), 126-30.

Cox, T.S., Harrell, L.G., Chen, P., Gill, B.S. Reproductive behavior of hexaploid/diploid wheat hybrids. *Plant Breed.*, **1991**, 107, 105-118.

Croston, R.P., Williams, J.T. A world survey of genetic resources IBRGR Bulletin/80/59. **1981**. p. 37

Cullinan, P., Cook, A., Nieuwenhuijsen, M.J., Sandiford, C., et al. Allergen and dust exposure as determinants of work-related symptoms and sensitization in a cohort of flourexposed workers; a case-control analysis. *Ann. Occup. Hyg.*, **2001**, 45, 97-103.

Curioni, A., Pogna, N.E., Peruffo, A.D. The quantity of bound β -amylases is related to the size of gluten polymers, in *Gluten 96.*, e. C.W. Wrigley, Editor. **1996**, RACI: Melbourne, Australia. p. 307-311

D

Damodaran, S., Paraf, A. Food proteins and their applications. **1997**, M. Dekker Inc.: New York.

David, B., Mecheri, S. Allergie et cytokines. *Annales de l'Institut pasteur.*, **1998**, 9, 141-161.

De Angelis M., R., Di Cagno, et al. Two-dimensional electrophoresis and IgE mediated food allergy. *Electrophoresis.*, **2010**, 31(13), 2126-2136.

Del Val, G., et al. Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of

milk. *J Allergy Clin Immunol.*, **1999**, 103(4), 690-697.

Delaney, D.E., Nasuda, S., Endo, T.R., Gill, B.S., Hulbert, S.H. Cytologically based physical maps of the group 2 chromosomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **1995**, 91, 568-573.

Denery-Papini, S. Obtention et caractérisation d'anticorps anti-peptide spécifiques des différentes prolamines du blé. **1995**, Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon. p. 240.

Deponte, R., Parlamenti, R., Petrucci, T., Silano, V., Tomassi, M. Albumin α -amylase inhibitor families from wheat flour. *Cereal Chem.*, **1976**, 53, 805-819.

Dodo, H., Konan, K., Viquez, O. A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.*, **2005**, 5(1), 67-73.

Douliez, J., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D. Structure, biological and technological functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science.*, **2000**, 32, 1-20.

D'Ovidio, R., Simeone, M., Masci, S., Porceddu, E., Kasarda, D.D. Nucleotide sequence of a gamma-type glutenin gene from a durum wheat : Correlation with a gamma-type glutenin subunit from the same biotype. *Cereal Chem.*, **1995**, 72, 443-449.

Doyen, C. Développement et caractérisation d'anticorps monoclonaux pour la quantification des sous-unités de gluténines de haut poids moléculaire. **1997**. p. 203.

Dubcovsky, J., Echaide, M., Giancola, S., Rousset, M., Luo, M.C., Joppa, L.R., Dvorak, J. Seed-Storage protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid and hexaploid wheat. *Theor Appl Genet.*, **1997**, 95, 1169-1180.

Dubcovsky, J., Luo, M.C., Zhong, G.Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A., Dvorak, J. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics.*, **1996**, 143, 983-999.

Dubreil, L., Compoint, J.P., Marion, D. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 108-116.

Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D.J., Broeckert, W.F., Quillien, L., Marion, D. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.*, **1998**, 138, 121-135.

Dupont, F.M., Vensel, W.H., Chan, R., and Kasarda, D.D. Characterization of the 1B-Type w-gliadins from *Triticum aestivum* cultivar butte. *Cereal Chem.*, **2000**, 77(5), 607-614.

Dvorak, J. Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In A.E. Slinkard, ed. Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp, **1998**, 1, 8-11. University of Saskatchewan, Canada, University Extension Press.

Dvorak, J., di Terlizzi, P., Zhang, H.B., Resta, P. The evolution of polyploid wheats:

identification of the A genome donor species. *Genome.*, **1993**, 36, 21-31.

Dvorak, J., Zhang, H.B. Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1990**, 87, 9640-9644.

E, F

Ebo, D.G. and Stevens, W.J. IgE-mediated food allergy--extensive review of the literature. *Acta Clin Belg.*, **2001**, 56(4), 234-47.

EFSA Journal. Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. **2010**, 8(7), 1700.

Egorov, T.A., Odintsova, T.I., Musolyamov, A., Fido, R., Tatham, A.S., Shewry, P.R. Disulphide structure of a sunflower seed albumin: conserved and variant disulphide bonds in the cereal prolamin superfamily. *FEBS Lett.*, **1996**, 396(2-3), 285-8.

Ellis, H.J., Pollock, E.L., Engel, W., Fraser, J.S., Rosen-Bronson, S., Wieser, H., Ciclitira, P.J. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut.*, **2003**, 52(2), 212-7.

Ewart, J.A. Isolation and characterisation of a wheat albumin. *J Sci Food Agric.*, **1969**, 20(12), 730-3.

Farhadi, A., Banan, A., Fields, J., Keshavarzian, A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol.*, **2003**, 18(5), 479-97.

Finkelman, F.D., Katona, I.M., Urban, J.F., Holmes, Jr. J., Ohara, J., Tung, A.S., Sample, J.V., Paul, W.E. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol.*, **1988**, 141(7), 2335-41.

Frick, O.L. Food allergy in atopic dogs. *Adv Exp Med Biol.*, **1996**, 409, 1-7.

Fries, J.H. Peanuts: allergic and other untoward reactions. *Ann. Allergy.*, **1982**, 48, 220-226.

G

Gallais, A., Bannerot, H. Amélioration des espèces végétales cultivées: Objectifs et critères de sélection. (Ed): INRA., **1992**, p.786.

Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.*, **1995**, 3(2), 72-4.

Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P., Jones, B.L. Chromosomal location of genes that control wheat endosperm proteins., in *Advances in Cereal Science and Technology.*, e. Y. Pomeranz, Edilor. **1982**, Am. Assoc. Cereal Chem.: St Paul, MN. p. 1-47.

Gautier, M.F., Aleman, M.E., Guirao, A., Marion, D., Joudrier, P. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol Biol.*, **1994**, 25(1), 43-57.

Gautier, M.F., Cosson, P., Guirao, A., Alary, R., Joudrier, P. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. *Plant Sci.*, **2000**, 153, 81-91.

Gianibelli, M., Larroque, O., MacRitchie, F., Wrigley, C. Biochemical , Genetic, and Molecular characterization of wheat endosperm proteins. *Online Review.*, **2001**, 1-20.

Gilissen, L.J., et al. Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol.*, **2005**, 115(2), 364-369.

Gill, K.S., Gill, B.S., Endo, T.R. A chromosome region-specific mapping strategy reveals generich telomeric ends in wheat. *Chromosoma.*, **1993**, 102, 374-381.

Gincel, E., Simorre, J.P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M., Voyelle, F. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers. *Eur J Biochem.*, **1994**, 226(2), 413-22.

Godon, B. Protéines Végétales., éd. C.s.e.t. agroalimentaires. **1996**, Paris: Technique et documentation Lavoisier.

González-Buitrago, J.M., Ferreira, L., Isidoro-Garcia, M., et al. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clin Chim Acta.*, **2007**, 385(1-2), 21-7.

Guandalin,i S., Newland, C. Differentiating Food Allergies from Food Intolerances. *Current Gastroenterology Reports.*, **2011**, 13(5), 426-434.

Guenard-Bilbault, L., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. Food allergy to wheat flour in adults. *Allergie et Immunologie.*, **1999**, 31(1), 22-25.

Guinnepain, M., Eloit, C., Raffard, M., Brunet-Moret, M., Rassemont, R., Laurent, J. Exercise-induced anaphylaxis: useful screening of food sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, **1996**, 77(6), 491-496.

Gupta, R.B., MacRitchie, F. A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of LMW subunits of glutenin in wheat. *J. Cereal Sci.*, **1991**, 14, 105-109.

Gupta, R.B., Shepherd, K. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. *Theor Appl Genet.*, **1990**, 80, 65-74.

H

Hanakawa, Y., Tohyama, M., Shirakata, Y., Murakami, S., Hashimoto, K. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: a case related to the amount of food allergen ingested. *Br.J.Dermatol.*, **1998**, 138(5), 898-900.

Harlan, Crops and man. Eds John Wiley and Sons. **1975**. p. 350. NY.

Heck, G.R., Chamberlain, A.K., Ho T.H. Barley embryo globulin 1 gene, Beg 1: characterization of cDNA, chromosome mapping and regulation of expression. *Mol Gen Genet.*, **1993**, 239(1-2), 209-18.

Heinemann, B., Andersen, K.V., Nielsen, P.R., Bech, L.M., Poulsen, F.M. Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Sci.*, **1996**, 5(1), 13-23.

Herman, E.M., et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.*, **2003**, 132(1), 36-43.

Hischenhuber, C., Crevel, R., et al. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.*, **2006**, 23(5), 559-575.

Hoffman, D., Lowanstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E., Thomas, W. Allergen Nomenclature. *International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee*. **1994**. Ref Type: Internet Communication

Hsia, C.C., Anderson, O.D. Isolation and characterization of wheat ω -gliadins genes. *Theor Appl Genet.*, **2001**, 103, 37-44.

Hurkman, W.J., Tanaka, C.K. Improved methods for separation of wheat endosperm proteins and analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *J of Cereal Science.*, **2004**, 40, 295-299.

Husby, S., Foged, N., Host, A., Svehag S.E., Passage of dietary antigens into the blood of children with coeliac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut.*, **1987**, 28(9), 1062-72.

I, J

Ikeda, T.M., Nagamine, T., Fukuoka, H., Yano, H. Identification of new low-molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor Appl Genet.*, **2002**, 104(4), 680-687.

Isolaure, E., Turjanmaa, K. Combined skin prick and patch testing enhances identification of food allergy in infants with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.*, **1996**, 97(1 Pt 1), 9-15.

Jackson, E.A., Holt, L.M., Payne, P.I. Characterization of high molecular weight gliadin and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensional electrophoresis and the chromosomal location of their controlling genes. *Theor Appl Genet.*, **1983**, 66, 29-37.

Jacobs J.H., Meijster T., et al. Wheat allergen exposure and the prevalence of work-related sensitization and allergy in bakery workers. *Allergy.*, **2008**, 63(12), 1597-1604.

Jaffuel, D., Demoly, P., Dhivert-Donnadieu, H., Bousquet, J., Michel, F.B., Godard, P. [The epidemiology and genetics of asthma. I. Descriptive epidemiology and analysis of environmental factors]. *Rev Mal Respir.*, **1996**, 13(5), 455-65.

Jarvinen, K.M., Suomalainen, H. Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clin Exp Allergy.*, **2001b**, 31(7), 978-87.

Jenkins, J.A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P.R. et al. Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross reactive allergens: an *in silico* analysis. *J Allergy Clin Immunol.*, **2005**, 115, 163–170.

Johnson, B.L. Identification of the apparent B genome donor of wheat. *Can J Genet Cytol.*, **1975**, 17, 21-39

Johnson, B.L., Dhaliwal, H.S. 1976. Reproductive isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the origin of the tetraploid wheat. *Am. J. Bot.*, **1976**, 63, 1088-1094.

Joudrier, P., et al. The thioredoxin h system : potential applications. *Biotechnol Adv.*, **2005**, 23(1), 81-85.

K

Kader, J.C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1996**, 47, 627-654.

Kano, H., Juji, F., Shibuya, N., et al. Clinical courses of 18 cases with fooddependent exercise-induced anaphylaxis. *Arerugi.*, **2000**, 49, 472–478.

Kasarda, D.D., Autran, J., Lew, E.J.-L., Nimmo, C.C., Shewry, P.R. N-Terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins. Implications for the evolution of prolamins genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1983**, 747, 138-150.

Keck, B., Köhler, P., Wieser, H. Disulphide bonds in wheat gluten : Cystine peptides derived from gluten proteins following peptic and thermolytic digestion. *Z. Lebensm. Unsters. Forsch.*, **1995**, 6, 432-439.

Khatkar, B.S., Bell, A.E., Schofield, J.D. The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. *Journal of Cereal Science.*, **1995**, 22, 29-44.

Kihara, H. Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (Japanese). *Agric. Hort.*, **1944**, 19, 13-14.

Kihara, H. Ueber cytologische Studien bei einigen Getreidearten. 1. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastard. *Bot. Mag.*, **1919**, 32, 17-38.

Köhler, P., Belitz, H.D., Wieser, H. Disulphide bonds in wheat gluten : further cystine peptides from HMW and LMW subunits of glutenin and from γ -gliadins. *Z. Lebensm. Unsters. Forsch.*, **1993**, 196, 239-247.

Köhler, P., Keck, B., Muller, H.G., Wieser, H. Disulphide bonds in wheat gluten, in Wheat kernel proteins. Molecular and functional aspect., C.N.d.R.e. Università Degli Studi della Tuscia, Editer. **1994**. p. 54-62.

Konan, K., Viquez, O., Dodo, H. Towards the development of a hypoallergenic peanut through genetic transformation. *Appl Biotechnol., Food Sci and Policy.* **2003**, 1(3),159-168.

Koppelman, S.J., Kno, E.F., Vlooswijk, R.A., Wensing, M., Knulst, A.C., Hefle, S.L.,

Gruppen, H., Piersma, S. Peanut allergen Ara h3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy*, **2003**, 58, 1144-1151.

Kreis, M., Forde, B.G., Rahman, S., Mifflin, B.J., Shewry, P.R. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J Mol Biol.*, **1985**. 183(3): p. 499-502.

Kreis, M., Shewry, P. Unusual features of cereal seed protein structure and evolution. *Bioessays.*, **1989**, 10(6), 201-207.

Kriz, A.L. Characterization of embryo globulins encoded by the maize Glb genes. *Biochem Genet.*, **1989**, 27(3-4), 239-51.

Kriz, A.L. 7S globulins of cereals., in Seed Proteins, P.R. Shewry. Casey, R, eds., Editor. **1999**, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. p. 477-498.

Kusaba-Nakayama, M., Ki, M., Kawada, E., Sato, M., Ikeda, I., Mochizuki, T., Imaizumi, K. Intestinal absorbability of wheat allergens, subunits of a wheat alpha-amylase inhibitor, expressed by bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **2001**, 65(11), 2448-55.

L

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage. *Nature.*, **1970**, 227, 680-685.

Larré, C., Lupi, R., Gombaud, G., Brossard, C., Branlard, G., Moneret-Vautrin, D.A., Rogniaux, H., Denery-Papini, S. Assessment of allergenicity of diploid and hexaploid wheat genotypes: Identification of allergens in the albumin/globulin fraction. *Journal of proteomics.*, **2011**, 74, 1279-1289.

Laurière, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiout, I., et al. Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis.*, **2006**, 54(5), 283-289.

LeBihan, T., Blochet, J.E., Desormeaux, A., Marion, D. Pezolet, M. Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry.*, **1996**, 35, 12712-12722.

Lee, J.Y., Min, K., Cha, H., Shin, D.H., Hwang, K.Y., and Suh, S.W. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J Mol Biol.*, **1998**, 276(2), 437-48.

Lehrer, S.B, Bannon, G.A. Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods : perception and reality. *Allergy*. **2005**, 60(5), 559-564.

Lehto, M., Palosuo, K., Varjonen, E., Majuri, M.L., Andersson, U., Reunala, T., Alenius, H. Humoral and cellular responses to gliadin in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.*, **2003**, 33(1), 90-5.

Letho M., Airaksinen L., Puustinen A. et al. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **2010**, 104, 139–146.

Lew, E.J.-L., Kuzmicky, D.D., Kasarda, D.D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulphat-polyacrylamide gel electrophoresis and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem.*, **1992**, 69, 508-515.

Li, XM., et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol.*, **2000**, 106(1 Pt 1), 150-158.

Lilienfield, F.A. Genome analysis in *Triticum* and *Aegilops*. Concluding review. *Cytologia*, **1951**, 16, 101-123.

Linna, O. Specific IgE antibodies to uningested cereals. *Allergy.*, **1996**. 51(11): p. 849-50.

Lollier, V., Denery-Papini, S., Larré, C., Tessier, D. A generic approach to evaluate how B-cell epitopes are surface-exposed on protein structures. *Molecular Immunology.*, **2011**, 48, 577-585

Lukaszewski, A.J., Apolinarska, B., Gustafon, J.P. Introduction of D-genome chromosomes from bread wheat into hexaploid triticale with a complete rye genome. *Genome.*, **1987**, 29, 425-430.

M

Majamaa, H., Isolauri, E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, **1997**, 99(2), 179-85.

Majamaa, H., Moisiö, P., Holm, K., Turjanmaa, K. Wheat allergy: diagnostic accuracy of skin prick and patch tests and specific IgE. *Allergy.*, **1999**, 54(8): p. 851-856.

Maleki, S.J., Kopper, R.A., Shin, O.S., Park, C.W., Compadre, C.M., Sampson, H., Burks, A.W., Bannon, G.A. Structure of the major peanut allergen Ara h 1 may protect IgE-binding epitopes from degradation. *J Immunol.*, **2000**, 164(11), 5844-9.

Mamone, G., Picariello, G., et al. Proteomic analysis in allergy and intolerance to wheat products. *Expert Rev. Proteomics.* **2011**, 8(1), 95-115.

Margiotta, B., Urbano, M., Colaprico, G., Johansson, E., Buonocore, F., D'Ovidio, R., Lafiandra, D. Detection of γ -type subunit at the Glu-A1 locus in some Swedish bread wheat lines. *J Cereal Sci.*, **1996**, 2, 203-211.

Marino, C.L., Nelson, J.C., Lu, Y.H., Sorrells, M.E., Leroy, P., Tuleen, N.A., Lopes, C.R., Hart, G.E. Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome.*, **1996**, 39, 359-366.

Marsh, D.G., Goodfriend, L., King, T.P., Lowenstein, H., Platts-Mills, T.A. Allergen nomenclature. *Bull. World Health Organ.*, **1986**, 64, 767-774.

Masci, S., Lafiandra, D., Porceddu, E., Lew, E.J.-L., Tao, H.P., Kasarda, D.D. D-glutenin subunits : N-terminal sequences and evidence for the presence of cysteine. *Cereal Chem.*, **1993**,

70, 581-585.

Masci, S., Lew, E.J.-L., Lafiandra, D., Porceddu, E., Kasarda, D.D. Characterization of low molecular weight glutenin subunits in durum wheat by reversed-phase high-performance liquid chromatography and N-terminal sequencing. *Cereal Chem.*, **1995**, 72, 100-104.

Masci, S., Rovelli, L., Kasarda, D.D., Vensel, W.H., Lafiandra, D. Characterisation and chromosomal localisation of C-type low-molecular-weight glutenin subunits in the bread wheat cultivar Chinese Spring. *Theor Appl Genet.*, **2002**, 104(2-3), 422-428.

Masoudi-Nejad, A., Nasuda, S., Kawabe, A., Endo, T.R. Molecular cloning, sequencing, and chromosome mapping of a 1A-encoded omega-type prolamin sequence from wheat. *Genome*, **2002**, 45(4), 661-9.

Matsuo¹, H., Masako, U., Miyuki Y., Atsuko A., Eishin, M. Identification of IgE-reactive proteins in patients with wheat protein contact dermatitis. *Contact Dermatitis.*, **2010**, 63, 23–30.

Mattei, C., Elmorjani, K., Molgo, J., Marion, D., Benoit, E. The wheat proteins puroindoline-a and alphan-purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *Neuroreport*, **1998**, 9(17), 3803-7.

Mayer, L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, **2000**. 30: p. S4-S12.

McFadden, E.S., Sears, E.R. The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec. Soc. Genet. Am.*, **1944**, 13, 26-27.

McFadden, E.S., Sears, E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.*, **1946**, 37, 81-89, 107-116.

Meding, B., Wrangsjö, K., Brisman, J., Järholm, B. Hand eczema in 45 bakers – a clinical study. *Contact Dermatitis.*, **2003**, 48, 7–11.

Metakovsky, E.V. Gliadin allele identification in common wheat II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Genet, and Breed*, **1991**, 45, 325-344.

Miescher, S.M., Vogel, M. Molecular aspects of allergy. *Mol Aspects Med.*, **2002**, 23(6), 413.

Mifflin, B., Field, J.M., Shewry, P.R. Cereal storage proteins and their effects on technological properties., in *Seed Proteins*, D.J.M.J.a.V. J., Editor. **1983**, Academic Press: New-York.

Miletic, L, Miletic, V., Sattely-Miller, E., Schiffman, S. Identification of gliadin presence in pharmaceutical products. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.*, **1994**, 19(1), 27-33.

Mills, E.N.C., Madsen, C., Shewry, P.R., Wichers, H.J. Food allergens of plant origin-their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Science & Technology.*, **2003**, 14, 145-156.

Mittag, D., Niggemann, B., Sander, I. et al. Immunoglobulin E-reactivity of wheat-allergic subjects (baker's asthma, food allergy, wheat-dependent, exerciseinduced anaphylaxis) to

wheat protein fractions with different solubility and digestibility. *Mol. Nutr.Food Res.*, **2004**, 48, 380-389.

Molkhou, P., Allergies Alimentaires : problèmes actuels et futurs., éd. U. Allergie. **1999**, Paris. 103.

Moneret-Vautrin, D.A., Vitte, J., et al. Diagnostic de l'IgE-réactivité par analyse des composants moléculaires (test ISAC). *Revue Française d'Allergologie.*, **2011**, 51(2), 73-83.

Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., Morisset, M. Les allergies alimentaires de l'enfant et de l'adulte. **2006**, Paris: Masson Editeur.

Moneret-Vautrin, D.A. Allergies et pseudo-allergies à des aliments dans l'urticaire chronique. *Ann Dermatol Venereol.*, **2003**, 130, 35-42.

Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., Guerin, L., Flabbee, J., Lemerdy, P., [The multifoed allergy syndrome]. *Allerg Immunol (Paris)*, **2000**, 32(1), 12-5.

Moneret-Vautrin, D.A., Kanny, G., Morisset, M., Rance, F., Fardeau, M.F., Beaudouin, E. Severe food anaphylaxis: 107 cases registered in 2002 by the Allergy Vigilance Network. *Allerg. Immunol.*, **2004**, 36, 46-51.

Moneret-Vautrin, D.A., Modifications of allergenicity linked to food technologies. *Allerg Immunol (Paris)*, **1998**, 30(1), 9-13.

Moneret-Vautrin, D.A., Petithory, D. Risques allergiques des technologies alimentaires et des consommations de produits nouveaux. *Med. Nutr.*, **1987**, 23, 217-24.

Morel, M.H., Bonicel, J., Melas, V., Autran, J.C. Multiple approach (IEF, SDS-PAGE and A-PAGE) of the composition of LMW subunits of glutenin and its effetc on dough properties., in *Gluten protein.*, **1993.**, A.o.C. Research., Editor. **1994**: Detmold, Germany. p. 244-254.

Morita, E., Matsuo, H., Mihara, S., et al. Fast α -gliadin is a major allergen in wheat-dependent-exercise-induced anaphylaxis. *J. Dermatol. Sci.*, **2003**, 33, 99-104.

Morita, K., Yamamura, Y., Mihara, S., Kameyoshi, Y., Yamamoto, S. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: a report of two cases and determination of wheat-gamma-gliadin as the presumptive allergen. *Br J Dermatol.*, **2000**, 143, 1059-63.

Morren, M.A, Janssens, V., Dooms-Gossens, A., Van Hoeyveld, E., Cornelis, A., De Wolf-Peeters, C., Heremans, A. alpha- Amylase, a flour additive: an important cause of protein contact dermatitis in bakers. *J Am Acad Dermatol.*, **1993**, 29, 723-728.

Mowat, A.M. Coeliac disease-a meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet.*, **2003**, 361(9365), 1290-2.

Mowat, A.M., Weiner, H.L. Oral tolerance. *Physiological basis and clinical applications.*, in Orga et al., M.I.A.P. éd., Editor. **1999**, p. 587-618.

Muller, S., Wieser, H. The location of disulphide bonds in α -type gliadins. *J. Cereal Sci.*, **1995**, 22, 21-27.

N, O

Nilsson-Ehle, H. Kreuzungsunter-suchungen an Hafer und Weizen. Lunds Universitets Arsskrift, N.F. Afd. 2, Bd. 5, **1909**. No. 2. p. 122.

Ogawa, T., Samoto, M., Takahashi, K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J Nutr Sci Vitaminol.*, **2000**, 46, 271-279.

Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Zhu, Y.L., Hirano, H., Nishikawa, K. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **1993**, 57(6), 1030-3.

Okita, T.W., Cheesbrough, V., Reeves, C.D. Evolution and heterogeneity of the alpha-/beta-type and gamma-type gliadin DNA sequences. *J Biol Chem.*, **1985**, 260(13), 8203-13.

Ortolani, C., and Pastorello, E. Food allergies and food intolerances. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.*, **2006**, 20(3), 467-483.

Osborne, T. The proteins of the wheat kernel. Washington DC: Carnegie Inst., **1907**. 84.

Osborne, T. The Vegetable Proteins., Longmans Green, ed. London, **1924**.

P

Pahr, S., Constantin, C., Mari, A., Scheiblhofer, S., Thalhamer, J., Ebner, C., Vrtala, S., Mittermann, I., Valenta, R. Molecular characterization of wheat allergens specifically recognized by patients suffering from wheat-induced respiratory allergy. *Clin Exp Allergy.*, **2012**, 42(4), 597-609. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.03961.x.

Palacin, A., Varela, J., et al. Recombinant lipid transfer protein Tri a 14: a novel heat and proteolytic resistant tool for the diagnosis of baker's asthma. *Clinical & Experimental Allergy.*, **2009**, 39(8), 1267-1276.

Palosuo, K., Alenius, H., Varjonen, E., Koivuluhta, M., Mikkola, J., Keskinen, H., Kalkkinen, N., Reunala, T. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1999**, 103, 912-917.

Palosuo, K. Update on wheat hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, **2003**, 3(3), 205-9.

Palosuo, K., Varjonen, E., Kekki, O.M., Klemola, T., Kalkkinen, N., Alenius, H., Reunala, T. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol.*, **2001**, 108(4), 634-8.

Palosuo, K., Varjonen, E., Nurkkala, J., Kalkkinen, N., Harvima, R., Reunala, T., Alenius, H. Transglutaminase-mediated cross-linking of a peptic fraction of omega-5 gliadin enhances IgE reactivity in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.*, **2003**, 111(6), 1386-92.

- Pastorello, E. A., Farioli, L., Conti, A., Pravettoni, V., et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: Alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2007**, 144, 10–22.
- Pastorello, E.A., Conti, A., Pravettoni, V., Farioli, L., Rivolta, F., Ansaloni, R., Ispano, M., Incorvaia, C., Giuffrida, M.G., Ortolani, C. Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J Allergy Clin Immunol.*, **1998**, 101(4 Pt 1), 531-7.
- Payne, P.I., Holt, L.M., Jarvis, M.G., Jackson, E.A. Two-dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*): Biochemical and genetic studies. *Cereal Chem.*, **1985**, 62, 319-326.
- Payne, P.I., Jackson, E.A., Law, C.N. Genetic linkage between storage protein genes on each of the short arms of chromosomes 1A and 1B in wheat. *Theor Appl Genet.*, **1984**, 67, 235-243.
- Payne, P.I., Lawrence, G.D. Catalogue of the alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, **1983**, 11, 29-35.
- Payne, P.J., Corfield, K.G. Subunit composition of wheat glutenin proteins isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta.*, **1979**, 145, 83-88.
- Pebay-Peyroula, E., Cohen-Addad, C., Lehmann, M.S., Marion, D. Crystallographic data for the 9000 dalton wheat non-specific phospholipid transfer protein. *J Mol Biol.*, **1992**, 226(2), 563-4.
- Peretz, C., de Pater, N., de Monchy, J., et al. Assessment of exposure to wheat flour and the shape of its relationship with specific sensitization. *Scand. J. Work Environ. Health.*, **2005**, 31, 65–74.
- Perkins, D.N., Keith, P.K. Food and exercise-induced anaphylaxis: importance of history in diagnosis. *Ann Allergy.*, **2002**, 89, 15–23.
- Peruffo, A.D., Pogna, N.B., Curioni, A. Evidence for the presence of disulphide bonds between β -amylase and low molecular weight glutenin subunits., in *Gluten 96.*, e. C.W. Wrigley, Editor. **1996**, RACI: Melbourne, Australia. p. 312-315.
- Petit, M.C., Sodano, P., Marion, D., Ptak, M. Two-dimensional ¹H-NMR studies of maize lipid-transfer protein. Sequence-specific assignment and secondary structure. *Eur J Biochem.*, **1994**, 222(3), 1047-54.
- Petitot, M., Abecassis, J., et al. Structuring of pasta components during processing: impact on starch and protein digestibility and allergenicity. *Trends in Food Science & Technology.*, **2009**, 20(11-12), 521-532.
- Pogna, N.E., Autran, J.C., Mellini, F., Lafiandra, D., Feillet, P. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat : genetics and relationship to gluten strength. *J Cereal Sci.*, **1990**, 11, 15-34.

Popineau, Y., Denery-Papini, S. Les protéines de réserve du grain de blé. in *Protéines Végétales.*, B. Godon, Editor. **1996**, Lavoisier Tec & Doc: Londres, Paris, New York. p. 120-172.

Popineau, Y. Physiochimie du gluten, relation avec l'étiologie de la maladie coeliaque. In symposium international sur l'intestin grêle: physiologie, physiopathologie. **1988**. Amsterdam : Exepta Medica.

Popineau, Y., Cornec, M., Lefevre, J., Marchylo, B. Influence of high Mr Glutenin subunits on glutenin polymers and rheological properties of gluteins and gluten subfractions of near-isogenic lines of wheat sicco. *Journal of Cereal Science.*, **1994**, 19, 231-241.

Popineau, Y., Huchet, B., Larré, C., Bérot, S. Foaming and emulsifying properties of fraction of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *J. Cereal Sci.*, **2002**, 35, 327-35.

Popineau, Y., Pineau, F., Evon, P., Bérot, S. Influence of pH salt concentration on the emulsifying properties of native wheat gliadins and of their chymotryptic hydrolysates. *Nahrung.*, **1999**, 43(6), 361-367.

Poznanski, J., Sodano, P., Sun, S.W., Lee, J.Y., Ptak, M., Vovelle, F. Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins. *Eur J Biochem.*, **1999**. 259(3): p. 692-708.

Prescott, S., and Allen, J.K. Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatric allergy and Immunology.*, **2011**, 22(2), 155-160.

Pumphrey, R.S. Fatal anaphylaxis in the UK 1992–2001. *Novartis Found Symp.*, **2004**, 257:116–128; discussion, 128–132,157–160, 276–285.

Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., McKenzie, A.N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R., de Vries, J.E. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1993**, 90(8), 3730-4.

Purcell, J.M., Kasarda, D.D., Wu, C.S.C. Secondary structures of wheat α - and ω -gliadin proteins: Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci.*, **1988**, 7, 21-32.

R

Rabjohn, P., et al. Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest.*, **1999**, 103(4), 535-542.

Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol.*, **2008**, 121, 847-52.

Radauer, C., Heimo, B. Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol.*, **2007**, 120, 518-25.

Rajan, T.V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a reinterpretation. *Trends Immunol.*, **2003**, 24, 376-379.

Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanovic, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics.*, **1995**, 41(4), 178-228.

Rance, F., Dutau, G. Labial food challenge in children with food allergy. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1997**, 8, 41-44.

Rasanen, L., Lehto, M., Turjanmaa, K., Savolainen, J., Reunala, T. Allergy to ingested cereals in atopic children. *Allergy.*, **1994**, 49(10), 871-876.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.*, **1993**, 290 (Pt 1), 205-18.

Rayburn, A.L., Gill, B.S. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences of wheat chromosomes. *J. Hered.*, **1985**, 76, 78-81.

Reizis, B., Eisenstein, M., Mor, F., Cohen, I.R. The peptide-binding strategy of the MHC class II I-A molecules. *Immunol Today.*, **1998**, 19(5), 212-6.

Riascos, J.J., Weissinger, A.K., et al. Hypoallergenic Legume Crops and Food Allergy: Factors Affecting Feasibility and Risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **2010**, 58(1), 20-27.

Riley, R., Unrau, J., Chapman, V. 1958. Evidence on the origin of the B genome of wheat. *J. Hered.*, **1958**, 49, 91-98.

Roitt, L., Brostoff, J., Male, D. *Immunologie* (3ème edit). De Boeck Université, **1994**. Bruxelles.

Romano, A., Di Fonso, M., Giuffreda, F., Papa, G., Artesani, M.C., Viola, M., Venuti, A., Palmieri, V., Zeppilli, P. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: clinical and laboratory findings in 54 subjects. *Int Arch Allergy Immunol.*, **2001**, 125(3), 264-72.

Rothfus, J.A., Kennel, S.J. Properties of wheat β -amylase adsorbed on glutenin. *Cereal Chem.*, **1970**, 47, 140-146.

S

Sakamura, T. Kurze Mitteilung uber die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der Triticum-Arten. *Bot. Mag.*, **1918**, 32, 151-154.

Salcedo, G., Quirce, S., Diaz-Perales, A. Wheat Allergens Associated With Baker's Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.*, **2011**, 21(2), 81-92.

Samoto, M., et al. Substantially complete removal of three major allergenic soybeans proteins (Gly m Bd 30 K, Gly m Bd 28 K, and the alpha-subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biotech Biochem.*, **1997**, 61, 2148-2150.

- Sampson, H.A. 9. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, **2003**, 111(2 Suppl), 540-7.
- Sampson, H.A. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1999**, 103, 717-728.
- Sampson, H.A., Mendelson, L., Rosen, J.P. Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med.*, **1992**, 327, 380-384.
- Sanchez-Monge, R., Salcedo, G. Analytical methodology for assessment of food allergens: Opportunities and challenges. *Biotech. Adv.*, **2005**, 23, 415-422.
- Sánchez-Monge, R., García-Casado, G., López-Otin, C., et al. Wheat flour peroxidase is a prominent allergen associated with Baker's asthma. *Clin. Exp. Allergy.*, **1997**, 27, 1130–1137.
- Sander, I., Flagge, A., Merget, R., Halder, T.M., Meyer, H.E., Baur, X. Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol.*, **2001**, 107(5), 907-13.
- Sander, I., Rozynek, P., et al. Multiple wheat flour allergens and cross-reactive carbohydrate determinants bind IgE in baker's asthma. *Allergy.*, **2011**, 66(9), 1208-1215.
- Sandiford, C.P., Tatham, A.S., Fido, R., et al. Identification of the major water/salt insoluble wheat proteins involved in cereal hypersensitivity. *Clin. Exp. Allergy.*, **1997**, 27, 1120-1129.
- Sandiford, C.P., Tee, R.D., Taylor, A.J. The role of cereal and fungal amylases in cereal flour hypersensitivity. *Clin Exp Allergy.*, **1994**, 24(6), 549-57.
- Sarkar, P., Stebbins, G.L. Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am. J. Bot.*, **1956**, 43, 297-304.
- Sax, K. Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids. *Genetics.*, **1922**, 7, 513-550.
- Sax, K. The behavior of the chromosomes in fertilization. *Genetics.*, **1918**, 3, 309-327.
- Scheets, K., Hedgcoth, C. Nucleotide sequence of a γ -gliadin gene : Comparisons with other γ -gliadin sequences show the structure of γ -gliadin genes and the general primary structure of γ - gliadins. *Plant Sci.*, **1988**, 57, 141-150.
- Schropp, P., Wieser, H. Effects of high molecular weight subunits of glutenin on the rheological properties of wheat gluten. *Cereal Chem.*, **1996**, 73, 410-413.
- Sears, E.R., Sears, L.M.S. The telocentric chromosomes of common wheat. In S. Ramanujams, ed. *Proc. 5th Int. Wheat Genetics Symp.*, **1978**, 389-407. New Delhi, Indian Agricultural Research Institute.
- Shewry, P.R., Baudo, M., et al. Are GM and conventionally bred cereals really different? *Trends in Food Science & Technology.*, **2007**, 18(4), 201-209.
- Shewry, P. Tatham, A. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem.J.*, **1990**, 267(1): p. 1-12.

- Shewry, P., Tatham, A., Forde, J., Kreis, M., Miflin, B. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins, a reassessment. *J.Cereal Sci.*, **1986**, 4, 97-106.
- Shewry, P.R. Plant storage proteins. *Biol Rev Camb Philos Soc.*, **1995**, 70(3), 375-426.
- Shewry, P.R., Halford, N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Bot.*, **2002a**, 53(370), 947-58.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Belton, P.S., Tatham, A.S. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **2002b**, 357(1418), 133-42.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.*, **1992**, 15, 105-120.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S. The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology.*, **1989**, 6, 163-219.
- Shewry, P.R., Halford, N.G., Tatham, A.S., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P.S. The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. *Adv Food Nutr Res.*, **2003**, 45, 219-302.
- Shewry, P.R., Miles, M.J., Tatham, A.S. The prolamin storage proteins of wheat and related cereals. *Prog Biophys Mol Biol.*, **1994**, 61(1), 37-59.
- Shin, D.H., Lee, J.Y., Hwang, K.Y., Kim, K.K., Suh, S.W. High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure.*, **1995**, 3(2), 189-99.
- Sicherer, S.H, and Sampson, H.A. Food allergy. *J Allergy Clin. Immunol.*, **2006**, 117(2 Suppl Mini-Primer), 470-5.
- Sicherer, S.H. Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*, **2011**, 127(3), 594-602.
- Sicherer, S.H. Determinants of systemic manifestations of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*, **2000a**, 106(5 Suppl), 251-7.
- Sicherer, S.H. Food allergy: when and how to perform oral food challenges. *Pediatr. Allergy Immunol.*, **1999**, 10, 226-234.
- Simonato, B., De Lazzari, F., Pasini, G. et al. IgE binding to soluble and insoluble wheat flour proteins in atopic and non-atopic patients suffering from gastrointestinal symptoms after wheat ingestion. *Clin. Exp. Allergy.*, **2001**, 31, 1771-8.
- Simorre, J.P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M. Two- and three-dimensional ¹H NMR studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure. *Biochemistry.*, **1991**, 30(49), 11600-8.
- Singh, N.K., Shepherd K.W., Cornish G.B. A simplified SDS-PAGE procedure for separating

- LMW subunits of glutenin. *J Cereal Sci.*, **1991**, 14, 203-208.
- Singh, J., Blundell, M., Tanner, G., Skerritt, J. Albumin and globulin proteins of wheat flour Immunological and N-terminal sequence characterisation. *Journal of Cereal Science.*, **2001**, 34, 85-103.
- Singh, J., Shepherd, K. Linkage mapping of genes controlling andosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theor Appl Genet.*, **1988**, 75, 628-641.
- Singh, N.K., Donovan, G.R., Carpenter, H.C., Skerritt, J.H., Langridge, P. Isolation and characterization of wheat triticin cDNA revealing a unique lysine-rich repetitive domain. *Plant Mol Biol.*, **1993**, 22(2), 227-37.
- Skerritt, J.H. Immunochemistry of cereal grain storage proteins. *Adv. Cereal Sci. Technol.*, **1988**, 9, 263-338.
- Skerritt, J.H., Tatham, A.S. Cereal seed storage proteins., in *Structure of antigens*, V.R. ed., editor. **1994**.
- Smith, K.M., Eaton, A.D., Finlayson, L.M., Garside, P. Oral tolerance. *Am J Respir Crit Care Med.*, **2000**, 162(4 Pt 2), 175-8.
- Sollid, L.M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.*, **2002**, 2(9), 647-55.
- Sollid, L.M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., Thorsby, E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.*, **1989**, 169(1), 345-50
- Sotkovský, P., Sklenář, J., Halada, P., Cinová, J., Setinová, I., Kainarová, A., Goliáš, J., Pavlásková, K., Honzová, S., Tučková, L. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin Exp Allergy.*, **2011**, 41(7), 1031-43. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03766.x.
- Šotkovský, P., Hubálek, M., et al. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics.*, **2008**, 8(8), 1677-1691.
- Sturgess, R., Day, P., Ellis, H.J., Lundin, K.E., Gjertsen, H.A., Kontakou, M., Ciclitira, P.J. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet.*, **1994**, 343(8900), 758-61.
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., Koga, Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production System fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol.*, **1997**, 159(4), 1739-45.
- Sutton, R., Wrigley, C.W., Baldo, B.A. Detection of IgE- and IgG-binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels. *J. Immunol. Methods.*, **1982**, 52, 183-94.
- Sutton, R., Hill, D.J., Baldo, B.A., Wrigley, C.W. Immunoglobulin E antibodies to ingested cereal flour components: studies with sera from subjects with asthma and eczema. *Clin Allergy.*,

1982, 12(1), 63-74.

T

Tada, Y., et al. Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett.*, **1996**, 391(3), 341-345.

Tanabe, S., Arai, S., Yanagihara, Y., Mita, H., Takahashi, K., Watanabe, M. A major of wheat allergen has a Gln-Gln-Gln-Pro-Pro motif identified as an IgE-Binding epitope. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **1996**, 219(2), 290-293.

Tanchak, M.A., Scherthner, J.P., Ginband, M., Altosaar, I. Tryptophanins: isolation and molecular characterization of oat cDNA clones encoding proteins structurally related to puroindoline and wheat grain softness proteins. *Plant Sci.*, **1998**, 137, 173-184.

Tatham, A.S., Shewry, P.R. Allergy to wheat and related cereals. *Clinical & Experimental Allergy.*, **2008**, 38, 1712–1726.

Tatham, A.S., Drake, A.F., Shewry, P.R. Conformational studies of synthetic peptides corresponding to the repetitive regions of the high molecular weight glutenin subunits of wheat. *J.Cereal Sci.*, **1990a**, 11, 189-200.

Tatham, A.S., Masson, P., Popineau, Y. Conformational studies of peptides derived by the enzymatic hydrolysis of a gamma-type gliadin. *J. Cereal Sci.*, **1990b**, 11, 1-13.

Tatham, A.S., Shewry, P.R. Elastomeric proteins: biological roles, structures and mechanisms. *Trends Biochem Sci.*, **2000**, 25(11), 567-71.

Tatham, A.S., Shewry, P.R. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of α -, B-, γ - and ω -gliadins. *J. Cereal Sci.*, **1985**, 3, 103-113.

Tatham, A.S., Shewry, P.R. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *J. Cereal Sci.*, **1995**, 22, 1-16.

Tatham, A.S., Shewry, P.R., Mifflin, B. Wheat gluten elasticity: a similar molecular basis to elastin? *FEBS Lett.*, **1984**, 177, 205-208.

Taylor, S.L., Lehrer, S.B. Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **1996**, 36, 91-118.

Thompson, R.D., Bishop, D.H.L., Tatham, A.S., Shewry, P.R., Exploring disulphide bond formation in a low molecular weight subunit of glutenin using a baculovirus expression system., in *Gluten proteins 1993.*, A.o.c. research, Editor. **1994**: Detmold, Germany.

Tkachuk, R., Tipples, K. Wheat beta-amylases. II. Characterization. *Cereal Chem.*, **1966**, 43, 62-79.

Tollefsen S., Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., et al. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J. Clin. Invest.*, **2006**, 116, 2226–2236.

U, V

Upadhyaya, M.D., Swaminathan, M.S. Genome analysis in *Triticum zhukovskyi*, a new hexaploid wheat. *Chromosoma.*, **1963**, 14, 589-600.

Verhasselt, V. Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal Immunology.*, **2010**, doi: 10.1038/mi.2010.25.

Van Deynze, A.E., Dubcovsky, J., Gill, K.S., Nelson, J.C., Sorrells, M.E., Dvorak, J., Gill, B.S., Lagudah, E., McCouch, S.R., Appels, R. Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of *Triticeae* species and their relation to chromosomes in rice and oat. *Genome*, **1995**, 38, 45-59.

Van Dijk, A.A., De Boef, E., Bekkers, A., Van Wijk, L.L., Van Swieten, E., Hamer, R.J., Robillard, G.T. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins. II. Characterization in solution and in the dry state. *Protein Sci.*, **1997**, 6(3), 649-56.

Van Slageren, M.W. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae). Wageningen, Netherlands, Agricultural University. **1994**. p.512.

Varjonen, E., Petman, L., Mäkinen-Kiljunen, S. Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy.*, **2000**, 55, 294–296.

Varjonen, E., Björkstén, F., Savolainen, J. Stability of cereal allergens. *Clin Exp Allergy.*, **1996**, 26, 436–43

Varjonen, E., Vainio, E., Kalimo, K. Antigliadin IgE-indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy.*, **2000**, 55(4), 386-391.

Varjonen, E., Vainio, E., Kalimo, K. Life-threatening, recurrent anaphylaxis caused by allergy to gliadin and exercise. *Clin Exp Allergy.*, **1997**, 27(2), 162-6.

Vickery Brian P., Scurlock, M., et al. Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *J Clin Immunol.*, **2011**, doi:10.1016/j.jaci.2010.12.1116

W, X, Y, Z

Wal, J.M. Structure and function of milk allergens. *Allergy.*, **2001**, 67, 35-8.

Wallace, N.H., Kriz, A.L. Nucleotide sequence of a cDNA clone corresponding to the maize *Globulin-2* gene. *Plant Physiology.*, **1991**, 95, 973-975.

Wang, J., Sampson, H.A. Food anaphylaxis. *Clinical and Experimental Allergy.*, **2007**, 37, 651–660.

Weichel, M., Glaser, A.G., Ballmer-Weber, B.K., et al. Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *J Allergy Clin Immunol.*, **2006**, 117, 676–81.

Weiss, W., Huber, G., Engel, K.H. et al. Identification and characterization of wheat grain albumin/globulin allergens. *Electrophoresis.*, **1997**, 18, 826–33.

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

Woychick, J.H., Boundy, J.A., Dimler, R.J. Starch gel eletrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch.Biochem.Biophys.*, **1961**, 94, 477-482.

Yagami, T., Haishima, Y., Tsuchiya, T., et al. Proteomic analysis of putative latex allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2004**, 135, 3–11.

Yano, H., et al. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2001**, 98(8), 4794-4799.

Yupsanis, T., Burgess, S.R., Jackson, P.J., Shewry, P.R. Characterization of the major protein component from aleurone cells of barley *Hordeum vulgare* L. *J. Exp. Botany.*, **1990**, 41, 385-392.

Zeiger, R. Beast-feeding and dietary avoidance., in *Intestinal Immunology and food allergy.*, S.H.e. de Week A., Editor. **1995**, Raven Press: New York. p. 203-22.

Zuidmeer, L., Goldhahn, K., et al. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.*, **2008**, 121(5), 1210-1218.e1214.

RESUMES

Résumé

Dans la première partie de cette étude, deux collections de blé et une collection de triticales cultivés sont analysées pour apprécier le polymorphisme génétique des SG-HPM et SG-FPM, à savoir: Une collection de 69 triticales cultivés en France, une autre collection de 856 accessions de blé dur local collecté en Algérie et divisée a priori en 17 variétés botaniques selon leur caractères morphologiques, et deux dernières collections de 40 et 30 variétés de blé tendre et dur des oasis. L'analyse biochimique a été effectuée par SDS-PAGE. Dans la collection des triticales hexaploïdes, une nomenclature allélique a été dressée dont un total de 36 allèles sont exprimés aux sept loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Gli-R2*, *Glu-B2*, *Glu-A3*, *Glu-B3*. Cette diversité a fait ressortir deux grands groupes de triticales cultivés : les triticales du Nord et les triticales du Sud. Dans la collection des blés botaniques, 16 allèles sont identifiés aux loci Glu-1. Deux sont nouveaux: Le premier est nommé *Glu-B1i₁* codant pour deux bandes localisées entre les bandes 17 et 18 dont on leur a attribué la nomenclature 17₁ et 18₁. L'autre est appelé *Glu-B1e₁* code pour deux bandes similaires aux 20x et 20y mais avec des mobilités légèrement plus rapides, ces bandes sont nommées 20x₁-20y₁. Aux loci Glu-3 et Glu-2, 19 allèles sont identifiés. L'allèle nommé *Glu-B3ab* (codant pour les sous unités 2-8-9-13-16) est considéré comme nouveau. L'analyse des blés sahariens a permis de recenser un total de 32 et 29 allèles pour les blés tendres et durs respectivement et dont la combinaison a donné 36 et 29 diagrammes types différents pour les blés tendres et durs respectivement. Chez les variétés de blé tendre 3, 9 (dont 1 nouveau) et 4 allèles sont observés aux loci *Glu-A1*, *Glu-B1* et *Glu-D1* codant pour les SG-HMW, respectivement. Un polymorphisme similaire a été trouvé pour les SG-FPM avec 4, 9 et 3 allèles identifiés aux loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-D3* respectivement. Dans la collection de blé dur, 3 allèles sont exprimés au locus Glu-A1 et 9 au Glu-B1 (dont 1 est nouveau). Au loci *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-B2* codant pour les SG-FPM, 7, 8, (dont 1 nouveau) et 2 allèles sont identifiés respectivement. La connaissance de ces allèles constitue un outil important d'une part pour l'estimation de la variabilité génétique et l'identification variétale et d'autre part dans la sélection pour la qualité des céréales.

Une autre partie de cette étude avait pour objectifs de caractériser les principaux allergènes de blé et/ou de céréales, à décomposer la réponse IgE spécifiques afin d'évaluer la part des différentes familles protéiques dans l'allergénicité du blé. L'analyse a porté sur 10 variétés et 14 sérums de patients algériens et français allergiques au blé. L'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques que toutes les protéines sont reconnues par les patients quelque soit la classe clinique observée. 90% des sérums réagissent sur la fraction albumines/globulines en immunoblotting. Les IgE de tous les sérums reconnaissent plus d'une seule protéine de blé et les résultats permettent d'observer que l'immunoréactivité varie en fonction des génotypes. Ainsi le profil antigénique qui ressort de ces résultats est composé de cinq antigènes majeurs, les albumines/globulines, les α/β , γ et ω gliadines et les sous unités gluténines de faible poids moléculaire et d'un antigène mineur les sous unités gluténines de haut poids moléculaire. Il est donc difficile de conclure sur le type de sensibilisation à un ou plusieurs épitopes communs de ces patients. Quatre bandes protéiques ont été identifiées par analyse protéomique. Confronté par l'analyse en spectrométrie de masse LC-MS/MS, nous pouvons suggérer l'existence de treize allergènes du blé dans les quatre groupes analysés.

Mots clés : Blé, Triticale, Diversité, Protéines, Electrophorèses, Allergies au blé, Anticorps IgE, Allergènes du blé, Immunoblotting, ELISA, Analyse protéomique.

Abstract

In the first part of this study, two collections of wheat and one collection of triticale cultivated are analyzed to assess the genetic polymorphism of HMW-GS and SG-FPM: a collection of 69 triticale grown in France, another collection of 856 accessions of local durum wheat collected in Algeria and a priori divided into 17 botanical varieties according to their morphological characteristics, and the last two collections of 40 and 30 varieties of bread and durum wheats from Algerian oases. Biochemical analysis was performed by SDS-PAGE. In hexaploid triticale collection, allele nomenclature was compiled with a total of 36 alleles expressed at seven loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-R1*, *Gli-R2*, *B2-Glu*, *Glu-A3*, *Glu-B3*. This diversity has highlighted two major groups of triticale: winter and spring triticales.

Important variation was found in the collection of botanic durum wheat. Among the 16 alleles identified at the *Glu-1* loci, two were new. The first named *Glu-B1i1* encoding for two bands located between 17 and 18 which was assigned the nomenclature 171 and 181. The other named *Glu-B1e1* codes two bands similar to 20x and 20y but with faster mobility, which were named 20x1-20y1. At *Glu-3* and *Glu-2* loci, 19 alleles were identified, where the allele named *Glu-B3ab* (encoding for subunits 2-8-9-13-16) was considered as new.

Analysis of Saharan wheats has identified a total of 32 and 29 alleles for bread and durum wheat, respectively, which in combination resulted in 36 and 29 different patterns respectively. In bread wheat 3, 9 (including 1 new) and 4 alleles were observed at *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* loci encoding HMW-GS respectively. LMW-GS displayed similar polymorphism, as 4, 9 and 3 alleles were identified at loci *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-D3* respectively. In durum wheat collection, 3 alleles were expressed at *Glu-A1* locus and 9 (including 1 new) at *Glu-B1*. At *Glu-A3*, *Glu-B3* and *Glu-B2* loci 7, 8 (including 1 new) and 2 alleles were identified. Knowledge of these alleles is an important one hand to estimate the genetic variability and varietal identification and secondly in the selection for grain quality.

Another part of this study aimed to characterize the major allergens of wheat and / or cereals, to break down the specific IgE response to evaluate the role of different protein families in the allergenicity of wheat. The analysis included 10 varieties and 14 sera from allergic Algerian and French patients to wheat. All biochemical and immunological analysis showed that all proteins are recognized by patients regardless of clinical grade observed. 90% of the sera reacted fraction to albumins / globulins fraction in immunoblotting. IgE sera recognize more than one wheat protein and results can be observed that the immunoreactivity varies with genotypes. And the antigenic profile that emerges from these results is composed of five major antigens, albumins / globulins, α/β , γ and ω gliadins and glutenins subunits low molecular weight and a minor antigen subunits of glutenin high molecular weight. It is difficult to conclude on the type of sensitization to one or more common epitopes of these patients. Four protein bands were identified by proteomic analysis. Confronted by mass spectrometry analysis LC-MS/MS, we can suggest the existence of thirteen wheat allergens in the four groups analyzed.

Key words: Wheat, Triticale, Diversity, Proteins, Electrophoresis, Wheat allergy, IgE antibodies, Wheat allergens, Immunoblotting, ELISA, Proteomic analysis

ملخص

في الجزء الأول من هذه الدراسة، قمنا بتحليل عدة مجموعات من القمح و triticale المزروع و ذلك بغرض تقييم التنوع الوراثي لتحت وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المرتفع و المنخفض، هذه المجموعات هي كما يلي، 69 عينة من triticales, مجموعة أخرى مكونة من 856 عينة من القمح الصلب المحلي المجموع في الجزائر و المقسم سلفا إلى 17 نوع نباتي حسب الخصائص المورفولوجية. و مجموعتين أخرتين مكونتين من 40 و 30 سلالة من القمح اللين و الصلب المزروع في واحات الجزائر. التحليل البيو كيميائي أجري بواسطة الهجرة الكهربية للبروتينات SDS-PAGE. في مجموعة triticale القراءة الاليلية تمثلت في 36 أليل على مستوى 7 مورثات: *Glu-A3, Glu-B3, Glu-B2*, *Glu-A1, Glu-B1, Glu-R1, Gli-R2*, يمكن هذا التنوع الوراثي من تصنيف triticale إلى صنفين: الشمالي و الجنوبي. في مجموعة القمح المحلي، 16 أليل وجد على مستوى مورثات *Glu-1* منها اثنين جديدين، الأول سمي *Glu-B1e* و الثاني *Glu-B1i* هذه الأليلات الجديدة تترجم تحت وحدات بروتينية جديدة. على مستوى مورثات *Glu-3* و *Glu-2*, 19 أليل وجد منها واحد جديد. تحليل القمح الصحراوي أظهر 32 و 29 أليل للقمح اللين و الصلب على الترتيب. في مجموعة القمح اللين المزروع في واحات الجزائر: 4، 9 و 3 أليلات وجدت على مستوى *Glu-A1, Glu-B1* و *Glu-1* بالترتيب منها واحد جديد. تنوع مماثل وجد على مستوى *Glu-3* أين وجدت مجموعة مكونة من 16 أليل. في مجموعة القمح الصلب وجدنا 12 أليل مترجمة لتحت وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المرتفع منها واحد جديد و 17 أليل مترجمة لتحت وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المنخفض منها واحد جديد.

معرفة هذه اليليات وسيلة مفيدة لتقدير التنوع و التعريف بالغيثات من جهة و لاختيار العينات ذات النوعية من جهة أخرى. في الجزء الثاني من هذه الدراسة الذي يهدف إلى تحديد أهم البروتينات المسببة للحساسية للقمح و تقسيم استجابة المضادات الجسمية من نوع IgE من أجل تقييم دور مختلف العائلات البروتينية في الحساسية للقمح. تمت الدراسة على 10 عينات من القمح و 14 مصلى لمرضى بالحساسية للقمح جزائريين و فرنسيين. جميع التحاليل البيوكيميائية و المناعية تبين أن جميع المضادات الجسمية للمرضى استجابت لمختلف بروتينات القمح مهما كانت نوعية الأعراض الملاحظة حيث أن 90% من الأمصال تتفاعل مع الألبومينات و الغلوبولينات في تقنية الالتصاق المناعي immunoblotting. المضادات الجسمية للمرضى من نوع IgE تتفاعل مع أكثر من بروتين للقمح و النتائج تمكن من ملاحظة التنوع في الاستجابة المناعية بتنوع عينة القمح. و من هذا، النمط المولد للمضادات الجسمية يتكون من 5 بروتينات رئيسية مسببة للحساسية: الألبومينات و الغلوبولينات وجميع أقسام الغليادين و وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المنخفض. إضافة إلى بروتين غير رئيسي مسبب للحساسية: وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المرتفع. و من هذا يتبين أنه من الصعب اتخاذ خلاصة حول نوع التحسس لبروتين أو عدة بروتينات مشتركة لمرضى الحساسية للقمح. قمنا بتحليل بروتينومي لأربع بروتينات محللة سابقا بواسطة الهجرة الكهربية حيث سمح التحليل الطيفي LC-MS/MS واستجواب قاعدة المعطيات بتعريف حوالي 13 بروتين مسبب للحساسية.

الكلمات الرئيسية: القمح، triticale، التنوع، بروتينات، الهجرة الكهربية للبروتينات، حساسية للقمح، المضادات الجسمية للمرضى من نوع IgE، بروتينات القمح مسببة للحساسية، immunoblotting، ELISA، التحليل البروتينومي.

Tableau 2 : Liste des *Aegilops* et leurs synonymes les plus fréquents (Van slageren,1994)

Génome ⁽¹⁾	Espèces	Synonymes (<i>Aegilops</i>)	Synonymes (<i>Triticum</i>)
Genre <i>Aegilops</i>			
Section <i>Aegilops</i> L.			
UM	<i>Aegilops biuncialis</i> Vis.	<i>Ae. lorenti</i>	<i>T. macrochaetum</i> (Shuttl.&Huet)Richter
MU	<i>Aegilops geniculata</i> Roth	<i>Ae. ovata</i> L.	<i>T. ovatum</i> (L.) Raspail
UM ou UMN	<i>Aegilops neglecta</i> Req ex Bertol.(4x et 6x)	<i>Ae. triaristata</i> Willd. (4x and 6x)	<i>T. triaristatum</i> (Willd.) Godr.& Gren.
SU	<i>Aegilops peregrina</i> (Hack. In J.Fraser Marie et Weiller Var. <i>peregrina</i> Var. <i>brachyathera</i> (Boiss.)Marie et weille	<i>Ae. variabilis</i>	
U	<i>Aegilops umbellulata</i> Zhuk.		<i>T. mbellulatum</i> (Zhuk.) Bowden
UMN	<i>Aegilops columnaris</i> Zhuk.		<i>T. columnare</i> (Zhuk.) Morris & Sears
UC	<i>Aegilops triuncillis</i> L. Var. <i>triuncialis</i> Var. <i>persica</i> (Boiss.) Eig	<i>ssp. triuncialis</i> <i>ssp. persica</i> (Boiss.) Zhuk.	<i>T. triunciale</i> (L.) Raspail
US	<i>Aegilops kotschyi</i> Boiss.		<i>T. kotschyi</i> (Boiss.) Bowden
Section <i>Comopyrum</i> (Jaub. et Spach) Zhuk.			
M	<i>Aegilops comosa</i> Sm. In Sibth. Et Sm. Var. <i>comosa</i> Var. <i>subventricosa</i>	<i>ssp. Comosa</i> <i>ssp. heldreichii</i> (Boiss.) Eig.	<i>T. comosum</i> (Sibth. & Sm.) Richter
N	<i>Aegilops uniaristata</i> Vis.		<i>T. uniaristatum</i> (Vis.)Richter
Section <i>cyindropyrum</i>(Jaub.et Spach) Zhuk.			
C	<i>Aegilops caudata</i> L.	<i>Ae. markgrafii</i> et <i>Ae. dichasians</i> (Bowden)	<i>T. dichasians</i> (Zhuk.) Bowden
CD	<i>Aegilops cylindrica</i> Host.		<i>T. cylindricum</i> Ces.
Section <i>Sitopsis</i> (Jaub et Spach) Zhuk.			
S ^b	<i>Aegilops bicornis</i> (Forssk.) Jaub. et Spach Var. <i>bicomis</i>		<i>T. bicomis</i> Forssk.
S ^l	Var. <i>anathera</i> Eig <i>Aegilops longissima</i> Schweinf. Et Muschl.		<i>T. longissimum</i> (Schweinf. & Muschl.) Bowden
S ^s	<i>Aegilops searsii</i> Feldmen et Kislev ex Hammer		<i>T. searsii</i> (Feldman & Kislev) Feldman, comb. nov.
S ^l	<i>Aegilops sharonensis</i> Eig		
S	<i>Aegilops speltoides</i> Tausch Var. <i>speltoides</i> Var. <i>ligustica</i> (Savign.)Fiori	<i>Ae. ligustica</i> (Savign.) Coss.	<i>T. speltoides</i> (Tausch) Gren. Ex Richter
Section <i>Vertebrata</i> Zhuk.emend. Kihara			
DMU	<i>Aegilops juvenalis</i> (Thell.)Eig	<i>Ae. turcomanica</i> Roshev.	<i>T. juvenale</i> Thell .
D	<i>Aegilops tauschii</i> Coss.	<i>Ae. Squarrosa</i> L.	<i>T. tauschii</i> (Coss.) Schmalh.
DMS	<i>Aegilops vavilovii</i> (Zhuk.) Chennav		<i>T. syriacum</i> Bowden
DDM	<i>Aegilops crassa</i> Boiss. (4x et 6x)		<i>T. crassum</i> (Boiss.) Aitch. & Hensl.
DN	<i>Aegilops ventricosa</i> Tausch		<i>T. ventricosum</i> Ces.
Genre <i>Amblyopyrum</i>(Jaub.et Spach) Eig			
T	<i>Amblyopyrum muticum</i> (Boiss.) Eig Var. <i>muticum</i> Var. <i>loliaceum</i> (Jaub. Et Spach) Eig	<i>Ae. mutica</i> Boiss. var. <i>mutica</i> var. <i>loliacea</i> (Jaub. & Spach) Eig	<i>T. tripsacoides</i> (Jaub. & Spach) Bowden

^a les soulignés sont des génomes modifiés au niveau polyploïde et ceux entre parenthèses ont été déduits de l'analyse d'ADN.
Source : **Dvorak, (1998)**, basés sur l'appariement de chromosome et l'analyse d'ADN.

Tableau 3: Répartition des différentes protéines dans le grain de blé (Popineau, 1988).

Partie du grain	Poids (% grain entier)	Teneur en protéines (% MS)	Protéines
Germe	3	35-40	Albumines Globulines
Couche à aleurone	7-9	30-35	Albumines Globulines
Péricarpe	4	6-9	
Albumen amylicé	80	9-14	Prolamines Albumines Globulines

Tableau 4: Classification des protéines du blé selon (Shewry et al., 2002a).

Protéines de structure et fonctionnelles (30%)	Prolamines (70%)		
	Pauvres en soufre	Riches en soufre	Haut poids moléculaire
Albumines,	ω -gliadines	α/β -, γ -gliadines	
globulines,	SG-FPM de type D	SG-FPM de type B	SG-HPM
autres		SG-FPM de type C	
	30-75 kDa	30-45 kDa	65-90 kDa
	(10-20%)	(70-80%)	(6-10%)

SG-HPM : sous-unités gluténines de haut poids moléculaire

SG-FPM : sous-unités gluténines de faible poids moléculaire

Tableau 6: composition en acides aminés de quelques protéines de blé (valeur en % de résidus) (Tkachuk et al., 1966 ; Ewart, 1969 ; Kasarda et al., 1983 ; Gianibelli et al., 2001 ; Singh et al., 2001).

Acide aminé	Gliadines					Gluténines		Albumines/globulines		
	α^*	β^*	γ^*	ω_1^*	ω_5	SG-FPM*	SG-HPM*	albumines	β -amylases	Triticines
Ala	2.6	2.9	2.9	0.8	0.6	2.6	2.9	8.4	8.0	5.8
Arg	2.2	1.8	1.6	0.4	0.9	2.4	1.9	5.7	5.4	6.2
Asn	2.5	2.4	1.7	0.8	0.6	2.3	0.04	7.6	11	7.2
Asp	0.4	0.4	0.9	0.0		0.8	0.7			
Cys	2.2	2.1	2.9	0.0	0	2.7	0.7	8.1	1.6	1.0
Gln	35.0	36.5	33.5	39.0	53.4	34.1	34.1	10.8	11.1	20.3
Glu	1.9	1.6	1.1	1.9		1.8	2.7			
Gly	2.5	2.1	3.0	1.1	1.1	3.4	19.0	8.3	8.8	16.2
His	2.3	2.2	1.6	0.0	1.3	1.5	0.9	0.02	3.7	3.2
Ile	4.7	4.6	5.4	2.3	3.7	4.8	0.8	1.7	3.9	2.9
Leu	8.0	7.4	6.6	3.8	3.5	7.4	4.0	7.6	8.7	6.0
Lys	0.4	0.4	0.8	0.4	0.5	0.6	0.9	5	3.8	2.8
Met	0.8	0.6	1.9	0.0	0	2.0	0.3	2.6	2.4	0.8
Phe	3.7	3.7	4.9	8.8	8.7	4.1	0.2	0.1	4.4	5.3
Pro	15.0	15.6	16.6	28.7	20.0	12.9	12.5	7.5	6.1	4.9
Ser	5.5	5.6	5.8	6.1	3.7	8.5	6.6	6.4	3.9	7.1
Thr	1.6	1.5	2.4	1.9	0.3	3.0	3.5	2.4	3.1	3.0
Trp	0.3	0.2	0.7	0.4	nd	0.5	0.8	3	2.5	nd
Tyr	3.6	3.3	1.0	2.3	0.8	1.4	5.8	3.4	4.5	3.0
Val	4.6	4.8	5.0	0.4	0.4	5.3	1.8	11.3	7.3	4.3

* : Composition d'après les séquences référencées sur internet (α : 16 séquences ; β : 10 séquences ; γ : 13 séquences ; ω_1 : 1 séquence ; SG-FPM : 27 séquences et SG-HPM : 14 séquences) ; nd : non déterminé.

Tableau 7: Pourcentage des séquences N-terminales présentes dans les SG-FPM de type B et C. (Masci et al., 2002).

	Séquences N-terminales	Pourcentage
SG-FPM de type B	α	9
	γ	15
	SG-FPM-m	24
	SG-FPM-s	52
SG-FPM de type C	α	40
	γ	55
	SG-FPM-m	5
	SG-FPM-s	0

Tableau 8: Séquences N-terminales des ω -gliadines purifiées par (Kasarda et al 1983) (D'après (Denery-Papini, 1995)).

ω-gliadines (nomenclature de Kasarda)	Séquence N-terminale
ω 2 (type ancestral)	<u>ARELNPSN</u> KELQSPQQSF
ω 5	<u>SRLSPRGKELHTP</u> QQQF
ω 1	KELQSPQQSF <u>SHQQ</u> PF

Les acides aminés variables parmi les séquences N-terminales sont soulignés.

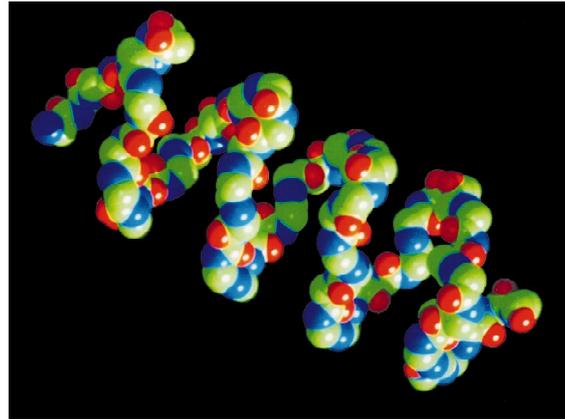
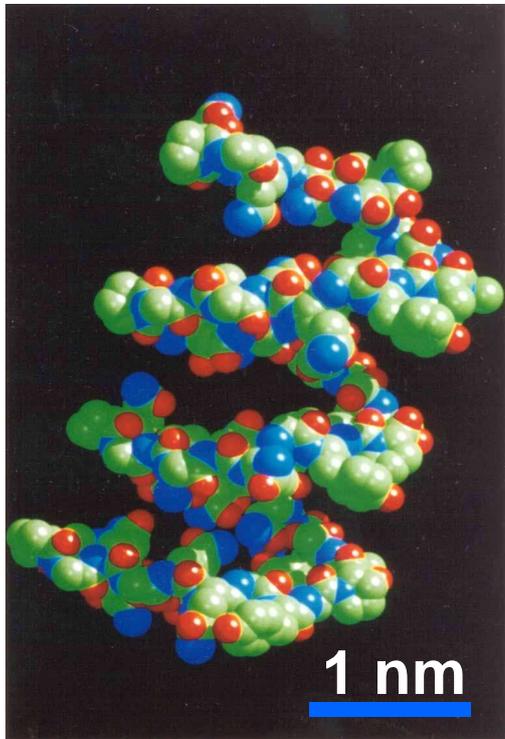


Figure 5. Modèle moléculaire de la structure hélicoïdale des coudes β du domaine répétitif des SG-HPM (Tatham, et al., 2000).

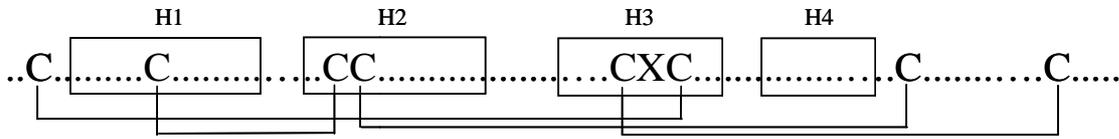


Figure 6. Distribution et liaison des cystéines dans la séquence primaire de nsLTP. H_i : distribution des hélices α (Douliet, et al., 2000).

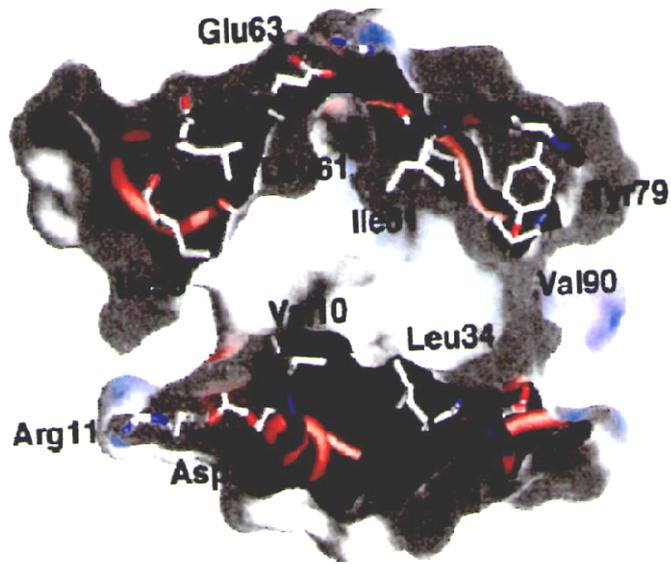


Figure 7. Modèle moléculaire de la cavité hydrophobe de la LTP1 de blé

Tableau 9: Comparaison des motifs répétitifs des prolamines (Denery-Papini, 1995)

Famille de Prolamines	Motif Répétitif
Pauvres en soufre : ω -gliadines	PQQPFPQQ
Riches en soufre : α/β -gliadines	PQQPY, QQPFP
γ -gliadines	PQQPFPFQ
SG-FPM	PQQQPPFS, QQQQPVL
Haut poids moléculaire : SG-HPM de type x	GYYPSTPQQ, PGQGQQ, GQQ
SG-HPM de type y	GYYPSTLQQ, PGQGQQ

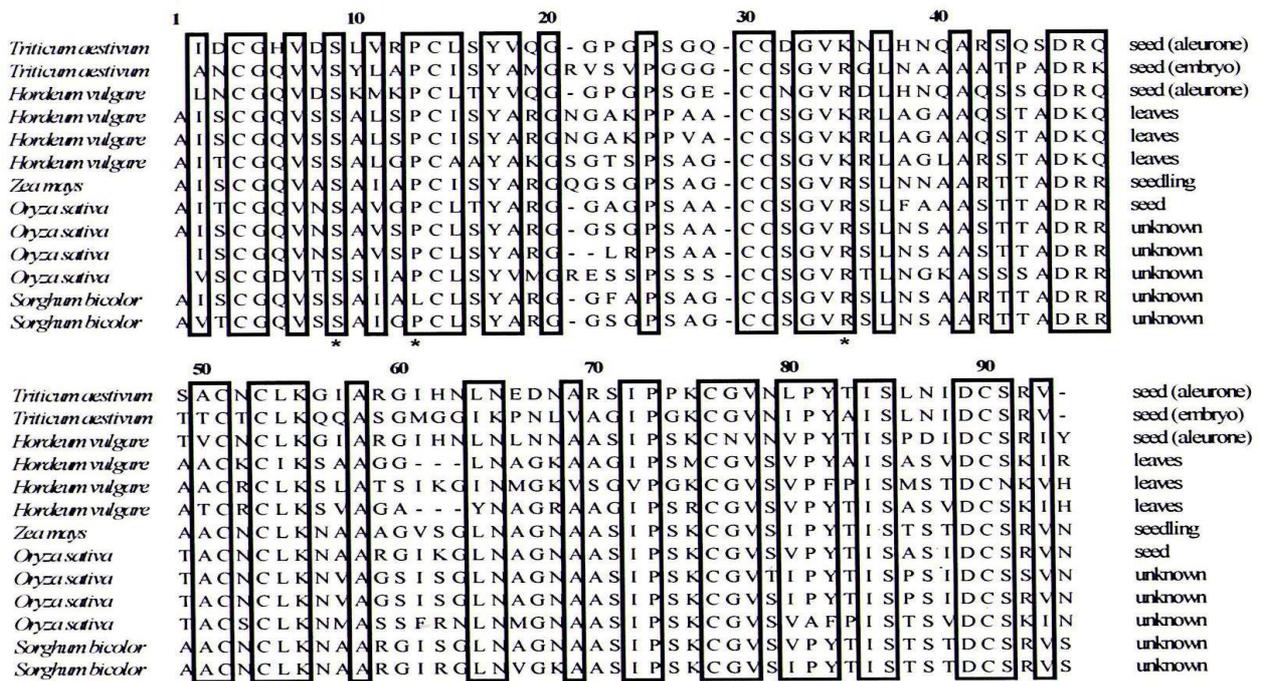


Figure 8. Aligment des squences des protines de transfert de lipides (LTP1) de crcales (Douliez, et al., 2000).

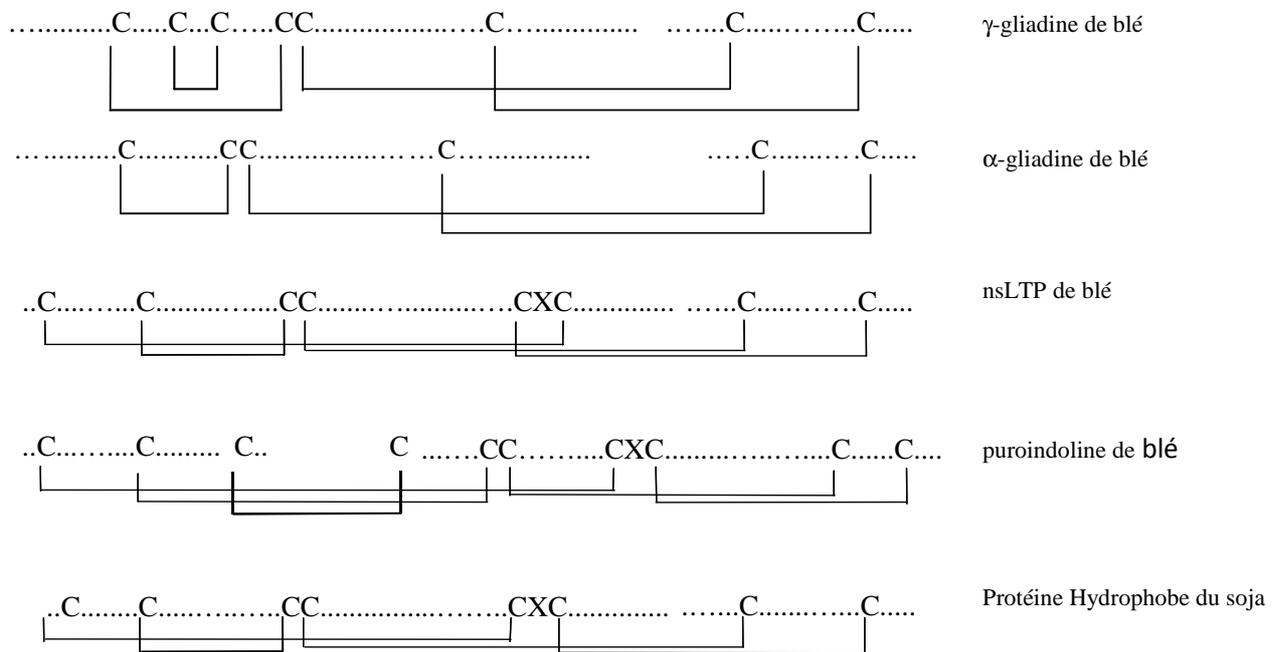


Figure 9. Représentation des squelettes cystéines de quelques protéines de la superfamille des prolamines de crcales.

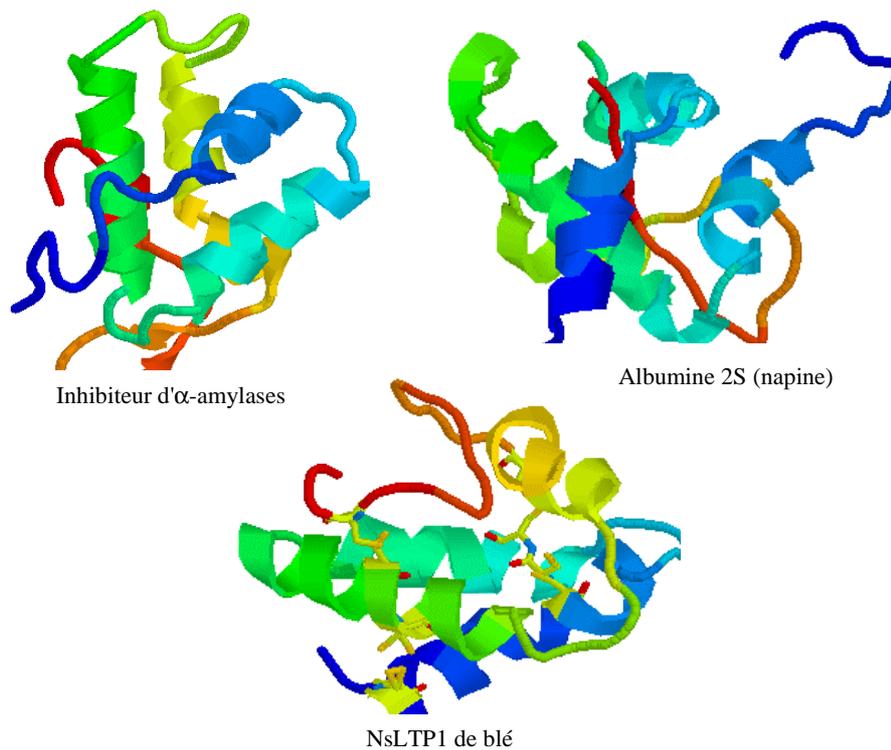


Figure 10. Représentation des structures tridimensionnelles de trois familles de protéines appartenant à la superfamille des prolamines de céréales.

Tableau 10: les applications des différents constituants du grain de blé.

Etat		Applications alimentaires	Applications non alimentaires
Farine		Pains, biscuits, pâtisseries, pâtes, bières...	
Amidon	Natif	Fécule	Enrobage Fermentations (éthanol, carburants...)
	Modifié	Epaississant, glucose, sirops...	plastiques
Gluten	Natif	Additif en panification, ingrédient liant	Matériaux
	Dénaturé	Alimentation animale	
	Hydrolysé	Additif alimentaire émulsifiant, épaississant	Cosmétiques
Son		Fibres	
Germe		Huile, Alimentation	

Tableau 11 : Classification de des phénomènes allergiques.

Type d'ypersensibilité	I	II	III	IV
Type de réactions	Médiée par les IgE	Cytotoxique	Complexes immuns	cellulaire
Délai de déclenchement	Immédiat	Semi-retardé (4 à 8 heures)	Semi-retardé (quelques heures)	Retardé (1 à 3 j.)
Maladies et phénomènes courants	Anaphylaxie, asthme, rhinite, eczéma atopique, choc anaphylactique	Destruction des cellules sanguines par allergie médicamenteuse	Maladies sérique, pneumathies à précipines	Dermatites, eczéma de contact, allergie microbienne, rejet de greffes
Effecteurs	IgE, mastocytes, basophiles	IgG ou IgM, cellules K	IgG, IgM	Lymphocytes T, macrophages
Médiateurs	Histamine, leucotriènes, platelet activating Factor (PAF)	Protéines du complément	Anticorps, complément, plaquettes, neutrophiles	Lymphokines

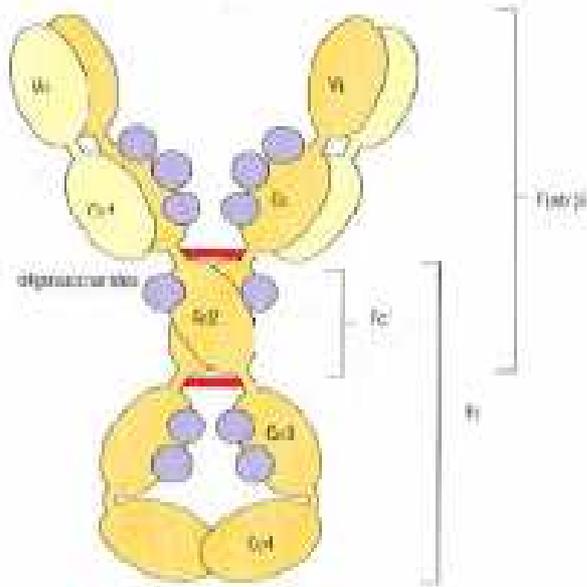


Figure 11 : structure de l'IgE humaine

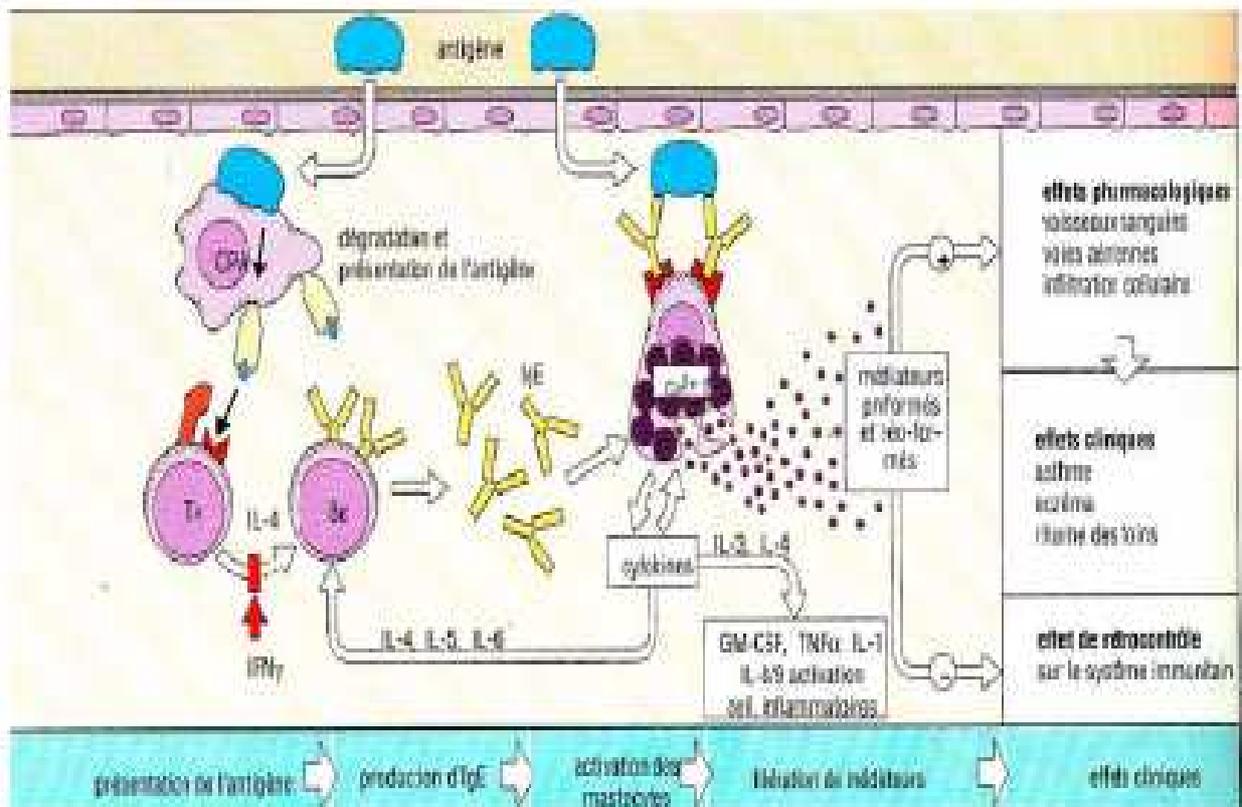


Figure 12 : induction et mécanismes effecteurs de l'hypersensibilité de type I (d'après Roitt, Brostoff, Male, 1994).

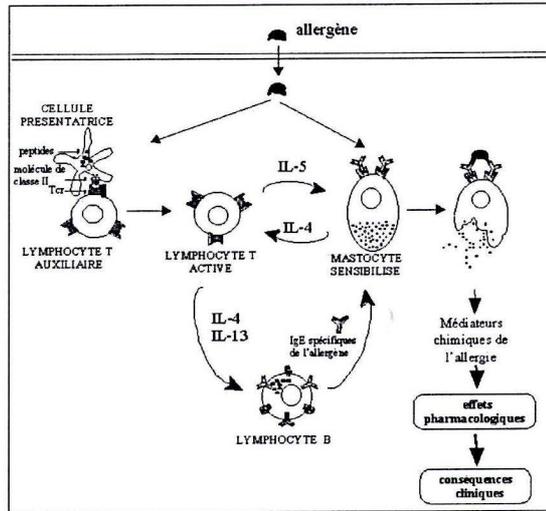


Figure 13. Mécanismes immunologiques de la réaction allergique IgE-dépendante (Miescher, *et al.*, 2002)

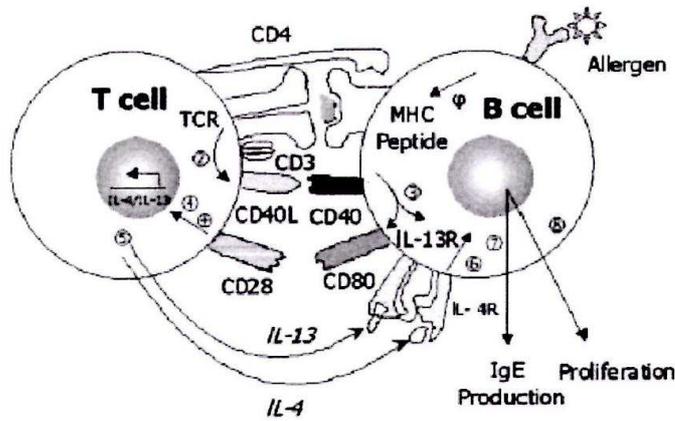


Figure 14. Interaction lymphocytes T et B, régulation de la synthèse des IgE (Miescher, *et al.*, 2002)

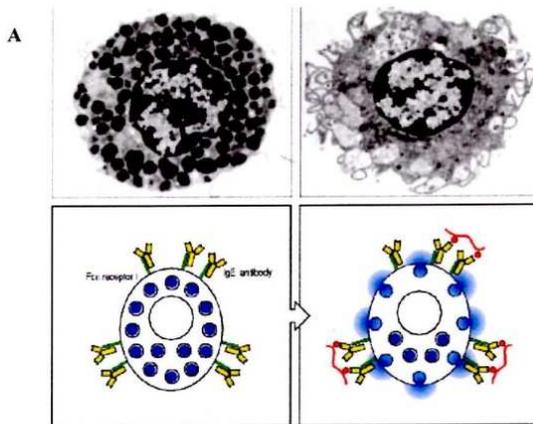


Figure 15.A: Mastocytes au repos, fixation des IgE après 1ère sensibilisation par l'allergène.
B: 2ème étape, pontage des IgE par l'allergène, activation des mastocytes.

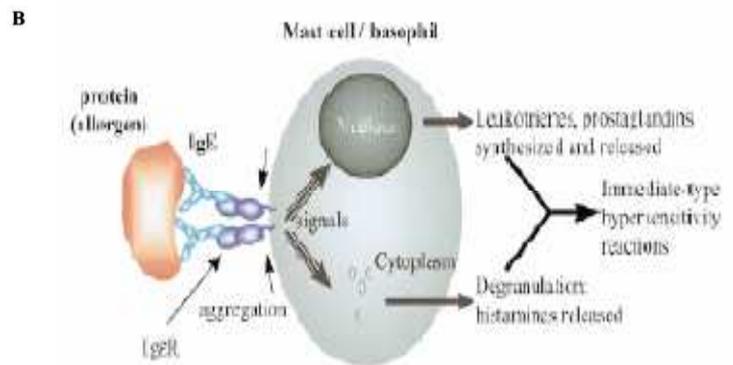


Figure 16 : médiateurs libérés par les mastocytes et basophiles au cours de l'hypersensibilité immédiate suite aux signaux intracellulaires engendrés par les récepteurs aux IgE.

Tableau 12 : Effets physiologiques des médiateurs libérés par les mastocytes.

Effets chimiotactiques	
Cytokines (IL-5, TNF α , IL-8)	Neutrophiles, éosinophiles, basophiles
LTB ₄ , PAF	Basophiles
Effets inflammatoires	
Histamine	Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire
PAF	Microthrombus
Tryptase	Enzyme protéolytique qui active C3 (composant du complément)
Kininogénase	Kinine, vasodilatation, oedème
Effets spasmogènes	
Histamine	Contraction du muscle lisse bronchique Œdème muqueux Sécrétion de mucus
PGD ₂	
LTC ₄ LTD ₄	

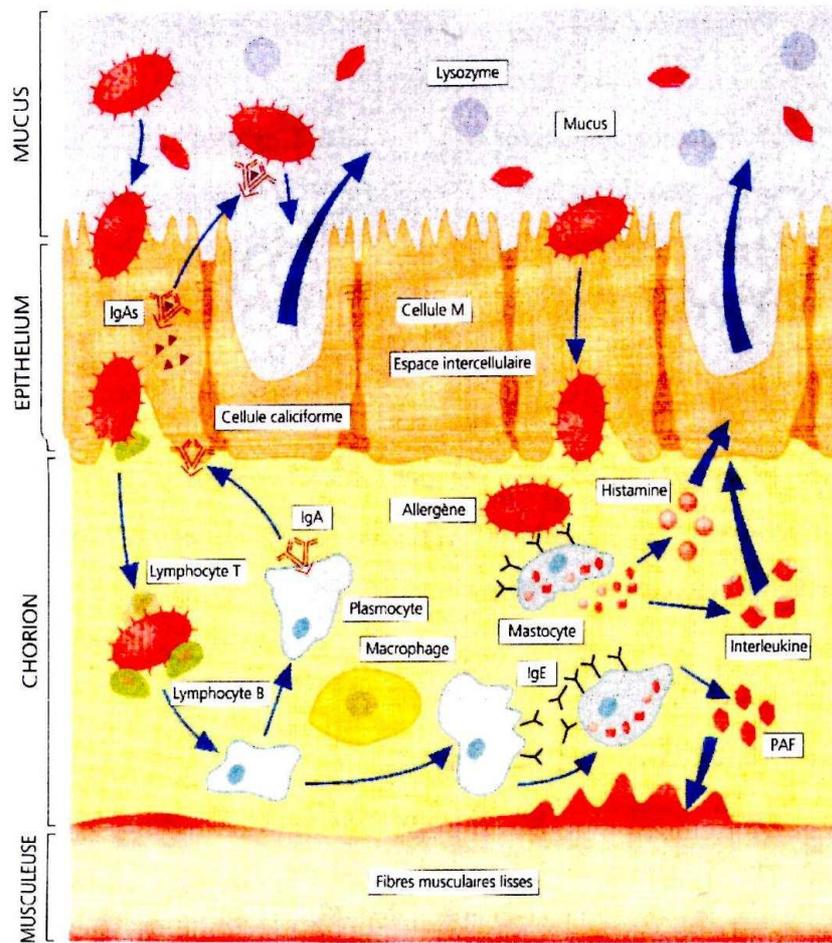


Figure 17. Représentation schématique de la barrière intestinale et de son système immunitaire associé lors de l'absorption d'aliments (Molkhou, 1999).

Tableau 13 : les différents types de symptômes gastro-intestinaux associés à l'allergie alimentaire et leurs manifestations cliniques

	Type	Manifestations
IgE dépendantes	Hypersensibilité immédiate	<ul style="list-style-type: none"> Nausées, douleurs abdominales, colique, vomissements, diarrhées Faible appétit, faible poids, malabsorption Désensibilisation des mastocytes
	Syndrome oral allergique	<ul style="list-style-type: none"> Picotement et angiodème des lèvres, de la langue, du palais, de la gorge Activation mastocytaire
Mixtes IgE et non IgE dépendantes	Oesphagite eosinophilique, gastrite, gastro-entérite allergique	<ul style="list-style-type: none"> Reflux gastrique, douleur abdominale, anorexie, retard de croissance, perte de poids Infiltration dans l'œsophage, l'estomac ou la barrière intestinale
Non IgE dépendantes	Syndrome d'entérocolite	<ul style="list-style-type: none"> Vomissements, diarrhées, déshydratation (dans les premiers mois, alimentation du lait de vache et soja) Sécrétion d'antigène spécifique de TNF- α
	Proctitis	<ul style="list-style-type: none"> Anémie (dans les premiers mois, alimentation au lait de vache et soja) Infiltration d'éosinophiles dans la paroi intestinale
	Entéropathie	<ul style="list-style-type: none"> Diarrhées, pas de prise de poids (dans les premiers mois, alimentation au lait de vache) Sécrétion d'IgA et IgG spécifiques
	Maladie coeliaque	<ul style="list-style-type: none"> Diarrhées graisseuses, dénutrition (alimentation au gluten) Forte infiltration cellulaire

Tableau 14 : les différents types des symptômes cutanés associés à l'allergie alimentaire et leurs manifestations cliniques.

IgE dépendantes	Angiodème, urticaire aigu	<ul style="list-style-type: none"> Activation des mastocytes circulants possédants des IgE à leur surface Essentiellement le lait, l'œuf, les noix et cacahuètes
Mixtes et non IgE dépendantes	Dermatite atopique	<ul style="list-style-type: none"> Prurit, association à l'asthme et à la rhinite allergique Rôle des cellules de Langherans de la peau, présentant l'allergie via des IgE à leur surface ; activation des cellules T et sécrétion de cytokines de type Th2
Non IgE dépendantes	Dermatite associée à l'entéropathie (gluten)	<ul style="list-style-type: none"> Prurit papulo-vésiculaire Dépôt d'IgA et présence de neutrophiles à la jonction derme-épiderme

Tableau 15: Quelques allergènes alimentaires de superfamilles de protéines d'après la base de données Protall (Mills et al., 2003).

Allergènes alimentaires	protéines	Poids moléculaires	Fonctions dans la plante
Prolamines de céréales	α - et γ -gliadines ; SG-FPM	30-55 kDa	Protéines de réserve
Inhibiteurs d' α -amylases	Orge (Horv v 1 CMb) ; riz (RAP) ; seigle (Sec c 1) ; blé	15-16 kDa	Rôle de protection dans la plante contre les pathogènes
ns-LTP	Pomme (Mal d 3) ; abricot (Pru ar 3) ; prune (Pru d 3) ; pêche (Pru p 3) ; maïs (Zea m 14)	9 kDa	Semblent être impliquées dans le transport des monomères de subérines durant la biosynthèse de la cutine
Albumines 2S	Noix du Brésil (Ber e 1) ; arachide (Ara h 2,6,7) ; noix (Jug r 1) ; moutarde (Sin a 1) ; sésame (Ses i 1)	9-17 kDa	Protéines de réserve
Globulines 11S	Arachide (Ara h 3,4) ; glycinine du soja	50-60 kDa	Protéines de réserve
Globulines 7S	Arachide (Ara h 1) ; noix (Jug r 2) ; β -conglycinine de soja	50-70 kDa	Protéines de réserve

Tableau 16: Clusters of cross-immunity/cross-allergy (Ebo and Stevens, 2001)

<i>ALLERGEN</i>	<i>SOURCE</i>
<u>Defense proteins</u>	
Bet v 1 homologues Protease / PRP class 10)	Pollen: alder, birch, hazelnut Food: apple, almond, carrot, cherry, celery, hazelnut, kiwi, peach, pear, plum, potato
Art v1 homologues (Pectate lyase)	Pollen: birch, Japanese cedar, mugwort, ragweed Food: anise, apple, carrot, celery, dill, fennel, parsley, tomato
Thaumatococcus - like proteins (permeatins, osmotins / PRP 5)	Apple, bell peppers, cherry, wheat, oat, tomato
Hevein – like domain (class I Chitinases / PRP 3)	Natural Rubber Latex (<i>Hevea brasiliensis</i>) Food; avocado, banana, chestnut
Lipid transfer protein (PRP 14)	Apple, apricot, broccoli, carrot, celery, cereals, kiwi, melon, peach, peanut, pistachio, tomato, walnut
α -amylases inhibitors Lysozymes (α -lactoglobuline)	Barley, Indian millet, maize, rice, wheat Cow's milk, egg white, meat (beef)
<u>Seed storage proteins</u>	
2S albumin	Mustard, nuts, peanuts
Vicilins	Cacao, cotton seed, nuts, peanuts, soybean
<u>Muscle proteins</u>	
Parvalbumin	Amphibians, carp, codfish, eel, perch, salmon, tuna
Tropomyosin	Crab, crayfish, insects, lobster, mites, mollusks, shrimps, snails, cockroach
<u>Miscellaneous</u>	
Albumin (Serum protein)	Egg yolk, sera, meat, feathers, epithelia (cat)
Profilins (Actin binding cytoskeleton protein)	Pollen: birch, mugwort, ragweed Food: apple, bell peppers (paprika), carrot, celery, coriander, fennel, peanut, potato, tomato

Tableau 17: Liste des allergènes de blé reconnus par la nomenclature IUIS

Allergen	Biochemical name	MW (SDS-PAGE)	Food Allergen	Entry Date	Modified Date
<u>Tri a 12</u>	Profiling	14	Yes	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 14</u>	Non specific lipid transfer protein 1	9	Yes	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 15</u>	Monomeric alpha amylase inhibitor 0.28		No	2011-04-07 07:45:43	2011-04-07 07:45:43
<u>Tri a 18</u>	Agglutinin isolectin 1		Yes	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 19</u>	Omega-5 gliadin, seed storage protein	65	Yes	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 21</u>	Plpha-beta-gliadin		No	2011-04-29 16:52:47	2011-04-07 16:52:47
<u>Tri a 25</u>	Thioredoxin		Yes	2010-04-29 16:57:55	2011-04-07 08:58:48
<u>Tri a 26</u>	High molecular wheat glutenin	88	Yes	2010-04-29 16:57:55	2011-05-25 09:19:54
<u>Tri a 27</u>	Thiol reductase homologue	27	No	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 28</u>	Dimeric alpha amylase inhibitor 0.19	13	No	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 29</u>	Tetrameric alpha amylase inhibitor CM1/CM2	13	No	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 30</u>	Tetrameric alpha-amylase inhibitor CM3	16	No	2010-04-29 16:57:55	0000-00-00 00:00:00
<u>Tri a 31</u>	Triosephosphate-isomerase		No	2011-04-07 08:02:08	2011-04-07 08:02:08
<u>Tri a 32</u>	1-cys-peroxiredoxin		No	2011-04-07 08:08:50	2011-04-07 08:08:50
<u>Tri a 33</u>	Serpin		No	2011-04-07 08:12:13	2011-04-07 08:12:13
<u>Tri a 34</u>	Glyceraldehydes-3-phosphate-deshydrogenase		No	2011-04-07 08:48:03	2011-04-07 08:48:03
<u>Tri a 35</u>	Dehydrin		No	2011-04-07 08:54:18	2011-04-07 08:54:18
<u>Tri a 36</u>	Low molecular weight glutenin GluB3-23	40 KDa	Yes	2011-05-23 08:56:36	2011-05-23 08:56:36
<u>Tri a 37</u>	Alpha purothionin	12 KDa	Yes	2011-11-08 03:46:02	2011-11-08 03:46:02

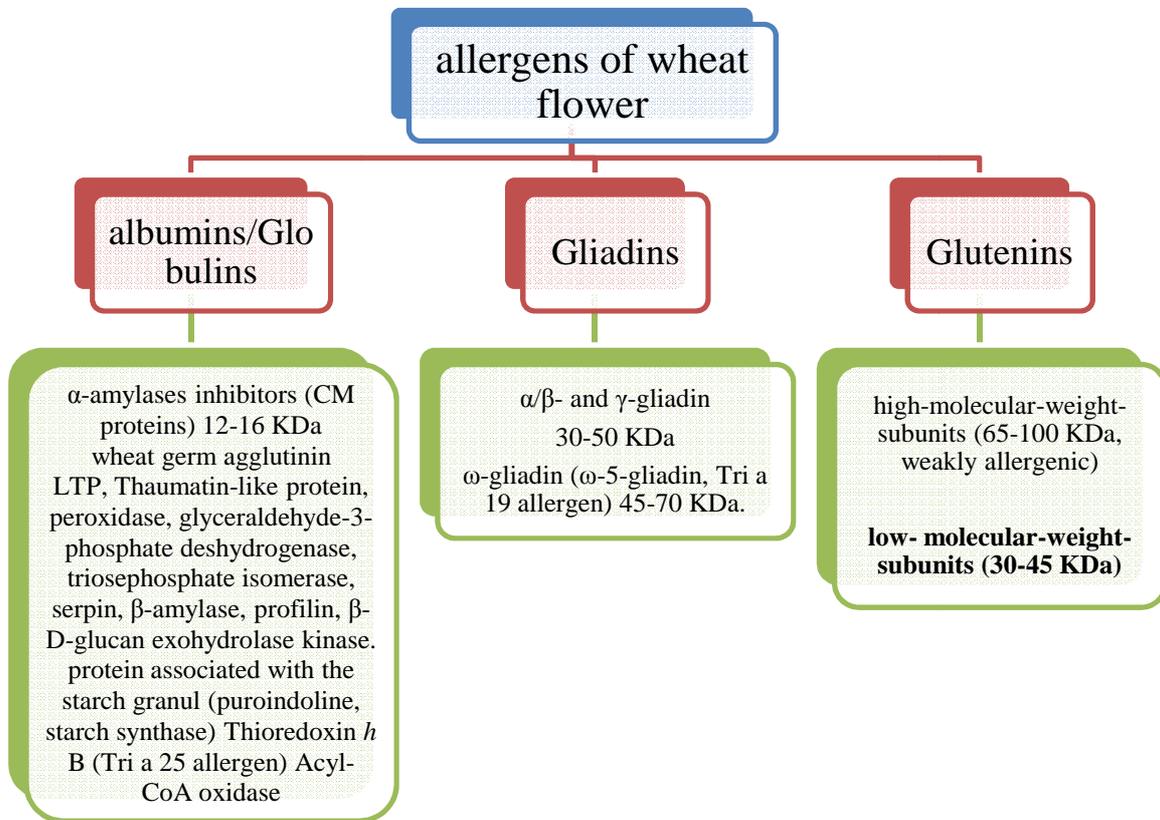


Figure 18: Classification of the different groups of allergenic proteins identified in wheat flour (Mamone et al., 2011).

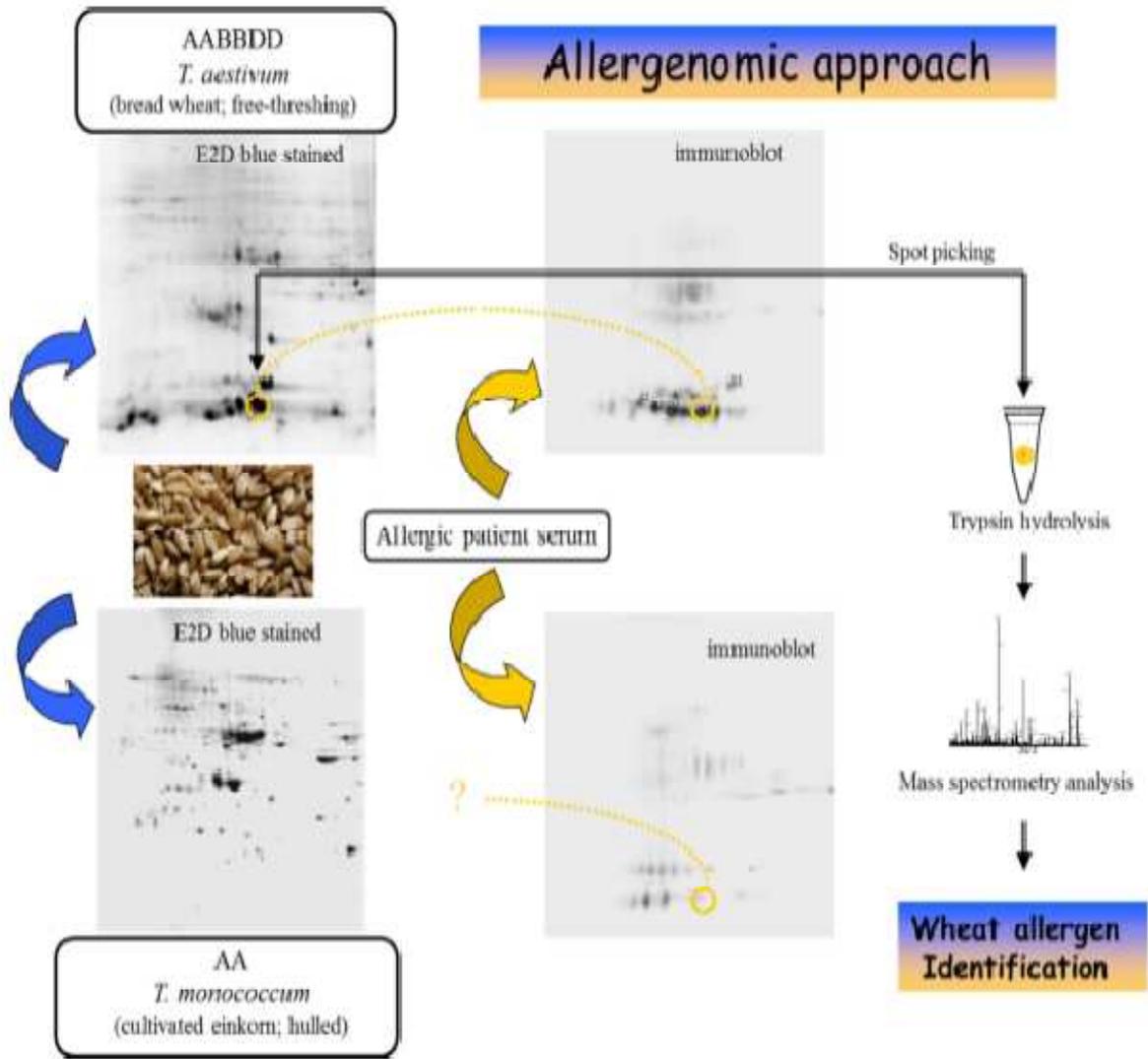


Figure 19 : Représentation schématique de l'allergénomique (Larré et al., 2011).