

**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 : .....

N° de série : .....

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en sciences**

**Présentée par :**

**HAMDI Ouahiba**

**Sujet de Recherche**

**Evaluation des ressources phylogénétiques des blés cultivés en  
Algérie et de leurs apparentés.  
Analyse de l'expression différentielle de protéines dans le grain selon  
deux conditions de culture (biologique versus conventionnelle)**

**Soutenue le ...../2011**

**Devant le jury composé de :**

**Président** : N. KHALFALLAH Prof. Université Mentouri Constantine

**Rapporteur** : D.KHELIFI Prof. Université Mentouri Constantine

**Examineur** : A. BOUTEBBA Prof. Université Annaba

**Examineur** : A. DJABEUR M.C. Université Oran (USTO)

**Examineur** : A. TAHAR Prof. Université Annaba

**Examineur** : A. HAMIDCHI M.C. Université Mentouri Constantine

## Remerciements

Ma reconnaissance s'adresse à Monsieur KHELIFI Douadi, Professeur de Biochimie Génétique à l'Université Mentouri Constantine et Directeur du Laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies Végétales où la thèse a été réalisée. Je tiens à le remercier pour son accueil, sa prise en charge dans la réalisation de cette étude, ses conseils, sa disponibilité 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. En dépit d'un emploi du temps chargé, j'ai conscience des efforts qu'il a du fournir pour se rendre disponible durant toute la période de la réalisation de la thèse.

Je remercie Monsieur Gérard BRANLARD, Directeur de Recherches et Responsable du Laboratoire de Protéomique à l'INRA de Clermont-Ferrand de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux dans d'excellentes conditions.

Je remercie également les membres de Jury Prof. N. KHALFALLAH, Prof. A. BOUTEBBA, Prof. A. TAHAR, Dr. A. DJABEUR et Dr. A. HAMIDECHI d'avoir accepté d'examiner cette thèse

Mes remerciements vont aussi à Madame Emmanuelle BANCEL qui m'a accompagné et conseillé tout au long de mon stage à l'INRA de Clermont-Ferrand.

Je tiens à remercier également tout le personnel de l'institut Technique des Grandes Cultures du Khroub (Constantine) pour leur aide.

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** Espèces de genre triticum et leurs constitutions génomiques.

**Tableau 2:** Liste des *Aegilops* et leurs synonymes les plus fréquents.

**Tableau 3:** Liste des 71 blés tendres.

**Tableau 4:** Liste des 120 blés durs. Liste

**Tableau 5:** des variétés de blé dur botanique.

**Tableau 6:** Liste des blés apparentés.

**Tableau 7:** Liste de la collection des *Aegilops*.

**Tableau 8:** Composition allélique aux loci Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1 (codant pour les SG-HPM) et GluA3, Glu-B3, Glu-D3 (codant pour les SG-FPM) des 71 variétés de blé tendre cultivées en Algérie.

**Tableau 9:** Fréquences alléliques des SG-HPM et SG-FPM de la collection de blé tendre cultivée en Algérie.

**Tableau 10:** Composition allélique aux loci Glu-A1, Glu-B1 (codant pour les SG-HPM) et GluA3, Glu-B2, Glu-B3 (codant pour les SG-FPM) des 120 variétés de blé dur cultivées en Algérie.

**Tableau 11:** Fréquences alléliques des SG-HPM et SG-FPM de la collection de blé dur cultivée en Algérie.

**Tableau 12:** Fréquences alléliques des sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaires trouvées au sein des 856 blés durs local d'Algérie.

**Tableau 13:** Indices de diversité génétique.

**Tableau 14:** Accessions représentatives de la core collection proposée.

**Tableau 15 :** Nomenclature allélique des SC-HPM et SG-FPM des blés apparentés.

**Tableau 16 :** Nomenclature allélique des SC-HPM et typologie des SG-FPM des accessions des espèces diploïdes du genre *Aegilops*.

**Tableau 17 :** Nomenclature allélique des SC-HPM et typologie des SG-FPM des accessions des espèces tétraploïdes du genre *Aegilops*.

**Tableau 18 :** Classes de tailles déterminées selon le poids en mg des grains.

**Tableau 19 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction gluténines de la variété Renan.

**Tableau 20 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction gluténines de la variété Ataro.

**Tableau 21 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction gliadines de la variété Renan.

**Tableau 22 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction gliadines de la variété Ataro.

**Tableau 23 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction albumines-globulines de la variété Renan.

**Tableau 24 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction alb-glob de la variété Ataro

**Tableau 25 :** Spots de l'extrait des protéines totales variants significativement entre mode de culture.

**Tableau 26 :** Spots variants identifiés au sein de la classe de petits grains.

**Tableau 27 :** Spots variants identifiés au sein de la classe de grains moyens.

**Tableau 28 :** Spots variants identifiés au sein de la classe de gros grains.

**Tableau 29:** Spots quantitativement différents d'une classe à une autre au sein de mode biologique.

**Tableau 30 :** Spots quantitativement différents d'une classe à une autre au sein de mode conventionnel.

**Tableau 31 :** Spots de l'extrait des albumines-globulines variants significativement entre modes de culture.

**Tableau 32 :** Identification des spots variants correspondants aux protéines totales.

**Tableau 33 :** Identification des spots variants correspondants aux albumines-globulines.

### Liste des figures

**Figure 1 :** Différents organes du grain de blé.

**Figure 2 :** Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.

**Figure 3 :** Répartition géographique des variétés de blés botaniques collectés en Algérie.

**Figure 4:** Electrophorégrammes des SG-HPM et SG-FPM de certaines variétés de blé tendre cultivé collectées en Algérie.

**Figure 5:** Electrophorégrammes des SG-HPM et SG-FPM de certaines variétés de blé dur cultivé en Algérie.

**Figure 6 :** Electrophorégrammes des SG-HPM et SG-FPM de quelques accessions de certaines variétés de blé dur botanique collectées en Algérie.

**Figure 7:** Profils électrophorétiques des SG-HPM 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub> obtenus à partir d'une Urée-Acid-PAGE suivi d'une alkylation mixte de l'accession Leucurum (Alef.) Koern. IG 14311.

**Figure 6:** Dendrogramme obtenu à partir des dix caractères morphologiques.

**Figure 9:** Dendrogramme obtenu à partir des fréquences alléliques dans chaque variété de blé botanique.

**Figure 10:** Diagrammes types Correspondant aux SG-HPM et SG-FPM rencontrés chez les 30 accessions de blés apparentés.

**Figure 11:** A. Electrophorégrammes des accessions non homogènes. B. Electrophorégrammes des accessions de *Ae. Umbellulata*. C Electrophorégrammes des accessions de *Ae.caudata*.

**Figure 12:** A. Electrophorégrammes des accessions de *Ae.comosa*. B. Electrophorégrammes des accessions d'*Ae.tauschii*.

**Figure 13:** A. Electrophorégrammes des accessions de *Ae.ventricosa* B. Electrophorégrammes des accessions de *Ae.geniculata*.

**Figure 14:** A. Electrophorégrammes des accessions de *Ae.triuncialis*. B. Electrophorégrammes des accessions de *Ae. Neglecta*.

**Figure 15:** Distribution des teneurs en protéines des grains d'Ataro (A) et Renan (R) selon le mode (B ou C) et leur taille Petit, Moyen et Gros.

**Figure 16:** Profils électrophorétiques monodimensionnels des protéines de réserve (Gluténines et Gliadines) et protéines du métabolisme (albumines-globulines) extraites à partir de la farine des grains de taille moyenne.

**Figure 17:** Protéines totales (environ 611 spots) présents chez la variété Ataro, tels que révélés après coloration au bleu de Coomassie sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle (IPG\*SDS-PAGE) -Les spots encadrés correspondent aux protéines de réserve.

**Figure 18:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites des grains de toutes tailles confondues où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture pour toutes tailles de grain confondues.

**Figure 19:** Vue globale des 186 spots variants après analyse statistique en prenant un fold supérieur à 2 pour toutes tailles de grains confondues.

**Figure 20:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites des grains de petite taille où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture.

**Figure 21:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites des grains de taille moyenne.

**Figure 22:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites des grains de grosse taille où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture.

**Figure 23:** Représentation des spots significativement variants entre classes de taille (petite, moyenne et grosse) des grains obtenus pour un même mode de culture.

**Figure 24:** Electrophorèse bidimensionnelle des albumines-globulines extraites des grains de toutes tailles confondues où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture.

### Liste des annexes

**Annexe 1 :** Extraction des gluténines de HPM et FPM selon SINGH (1991).

**Annexe 2 :** Electrophorèse monodimensionnelle selon SINGH (1991).

**Annexe 3 :** Détermination du nombre de groupements thiols.

**Annexe 4 :** Extraction et séparation des gliadines par la technique Acid-Page (protocole L. Caballero).

**Annexe 5:** Extraction des protéines totales de grain mature pour analyse en électrophorèse bidimensionnelle.

**Annexe 6 :** Extraction des albumines-globulines de la farine (ou de l'albumen).

**Annexe 7:** Dosage des protéines avec le réactif BRADFORD (SIGMA).

**Annexe 8 :** Préparation et migration des gels SDS-PAGE de deuxième dimension.

### Liste des abréviations

- **APS :** Ammonium Persulfate
- **Bio:** Biologique
- **BSA :** Bovin Serum Albumine
- **CHAPS :** 3[(3-Cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate
- **Conv:** conventionnel
- **CIMMYT :** Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz Y Trigo
- **Da :** Dalton
- **DTT :** Dithiothréitol
- **E-2D :** Electrophorèse Bidimensionnelle
- **FAO**
- **GLM :** General Linear Models
- **ICARDA:** International Center for Agricultural Research in the dry areas
- **IEF :** Isoélectrofocalisation
- **INRA :** Institut National de la Recherche Agronomique
- **IBPGR :** Conseil International des Ressources Génétiques
- **IPG :** Electrophorèse en gradient de pH immobilisé
- **IPGRI :** International Plant Genetic Resources Institute
- **ITGC :** Institut Technique des Grandes Cultures
- **kDa :** Kilo Dalton
- **kV :** Kilo Volt
- **kVh :** Kilo Volt Heure
- **M :** Molaire
- **mA :** Milli Ampère
- **MALDI-TOF :** Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight
- **Max :** Maximum
- **mg :** Milligramme
- **min :** Minute
- **Min :** Minimum

- **mL** : Millilitre
- **mm** : Millimètre
- **mM** : Millimolaire
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **pI** : Point Isoélectrique
- **PM** : Poids Moléculaire
- **q.s.p.**: Quantité Suffisante Pour
- **RP-HPLC** : Reverse Phase High Liquid Chromatography
- **SAU**: surfaces agricoles usées
- **SAS**: Statistical Analysis System
- **SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis ou Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécylsulfate de Sodium
- **SG-FPM** : Sous-unité de Gluténine de Faible Poids Moléculaire
- **SG-HPM** : Sous-unité de Gluténine de Haut Poids Moléculaire
- **sign** : signification
- **TCA** : Acide Trichloroacétique
- **TEMED** : N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
- **W** : Watt
- **µg** : Microgramme
- **µL** : Microlitre

## SOMMAIRE

Remerciements	i
Listes des figures, tableaux, annexes et abréviations	ii
Sommaire	vi
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Recherche Bibliographique</b>	
1. Origine, phylogénie et classification des blés	4
1.1. Origine géographique	4
1.2. Origine génomique et Phylogénie	4
2. Grain de blé	8
2.1. Composition des différents organes	8
2.2. Les différentes fractions protéiques	10
2.3. Extraction et séparation des protéines de réserve	12
2.4. Déterminisme génétique et localisation chromosomique des protéines de réserve	13
3. Ressources génétiques de blé	14
3.1. Importance des ressources phytogénétiques	14
3.2. Diversité des ressources génétiques	14
3.3. Disparition de la diversité génétique	15
3.4. Evaluation des ressources génétiques des blés	16
3.4. Préservation et conservation des ressources génétiques	16
4. Culture biologique de blé	18
4.1. Evolution des surfaces de la culture biologique	18
4.2. Problèmes et limites de l'agriculture biologique du blé	18
4.3. Expression différentielle des protéines du grain liée aux différents modes de culture	20
4.5. L'utilisation de l'outil protéomique dans la détermination de la synthèse différentielle des protéines liée aux conditions de culture.	21
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
1. Présentation du matériel végétal	23
1.1. Collections de blés tendre et dur cultivés en Algérie	23
1.2. Collection de 19 variétés de blés botaniques collectés en Algérie	23
1.3. Collection de blés apparentés	24
1.4. Collection de blés sauvages du genre <i>Aegilops</i>	24
1.5. Variétés utilisées dans l'étude comparative entre modes de culture	24
2. Méthodes d'analyse	29
2.1. La technique SDS-PAGE pour l'évaluation de la variabilité des SG-HPM et SG-FPM	29
2.2. Détermination du nombre des groupements thiols du nouvel allèle trouvé <i>Glu-B1e1</i> codant pour les sous unités 20x <sub>1</sub> -20y <sub>1</sub>	31
2.3. Méthodes utilisées pour les comparaisons de l'expression protéique en fonction de types de culture	31
2.3.1. Comparaison des teneurs en protéines des grains	31
2.3.2. Comparaisons des profils électrophorétiques monodimensionnels et bidimensionnels des gluténines, gliadines et des albumines-globulines	32
a. Extraction des protéines	32
b. L'estimation de la quantité de protéines à déposer	33
c. Electrophorèses monodimensionnelles	33
d. Analyse d'image et comparaisons statistiques	33
e. Analyse protéomique	34
- Electrophorèse bidimensionnelle	34
- L'analyse des protéines par spectrométrie de masse	37
- L'identification des protéines à partir des bases de données	37

### Chapitre 3 : Resultats et discussion

<b>Première partie :</b> Evaluation de la variabilité génétique des gluténines des blés originaires et/ou cultivés en Algérie et de leurs apparentés	38
1. Variabilité des SG-HPM et des SG-FPM des blés cultivés en Algérie	39
1.1. Variabilité trouvée dans les cultivars de blé tendre	40
1.2. Variabilité trouvée dans les cultivars de blé dur	43
2. Variabilité des SG-HPM et des SG-FPM des blés durs botaniques	48
2.1. Variation allélique des SG-HPM	48
2.2. Variation allélique des SG-FPM	50
2.3. Analyse des liaisons cysteines des nouvelles bandes détectées 20x1-20y1	51
2.4. Indice de diversité génétique	52
2.5. Analyse en Cluster basant sur les fréquences alléliques des SG-HPM et SG-FPM	53
2.6. Etude des caractères morphologiques de la collection	54
2.7. Choix des accessions représentatives de la core collection	54
3. Variabilité des SG-HPM et des SG-FPM des blés apparentés.	58
4. Variabilité des SG-HPM et des SG-FPM des Aegilops	61
1.1. Variabilité trouvée chez les espèces diploïdes	61
1.2. Variabilité trouvée chez les espèces tétraploïdes	64
Conclusion et perspectives	69
<b>Deuxième partie :</b> Analyse de l'expression différentielle de protéines dans le grain selon deux conditions de culture	73
1. Comparaison des Teneur en protéines	74
2. Comparaison des profils monodimensionnels des protéines.	75
2.1. Analyse de profils électrophorétiques monodimensionnel des protéines de réserve	77
2.2. Analyse de profils électrophorétiques monodimensionnels des albumines-globulines	80
3. L'approche bidimensionnelle (2D)	81
3.1. Analyse des protéines totales de l'albumen	81
3.1.1. Comparaison entre modes biologique et conventionnel pour toutes tailles de grains confondues	82
3.1.1. Comparaison entre modes biologique et conventionnel pour chaque taille de grains	85
3.1.2. Variation d'expression au sein d'un mode de culture	89
3.2. Analyse des albumines-globulines	91
3.3. Identification des protéines différentiellement exprimées	91
Conclusion et perspectives	95
Références bibliographiques	97
Annexes	110

## INTRODUCTION

---

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.

Les blés tendre et dur ont toujours occupé une place prépondérante dans l'alimentation des populations sédentaires, et ce, depuis la haute antiquité et sont considérées comme les céréales les plus cultivées dans le monde. Ils dérivent d'hybridations successives entre les espèces sauvages diploïdes du genre *Aegilops*. Au sein des progéniteurs, à savoir *Ae.urartu* (donneur du génome A), *Ae.taishii* (donneur du génome D) et *Ae. Searsi* (donneur du génome B), seuls un ou quelques génotypes ont participé à la création des blés. Il apparaît donc que l'essentiel de la variabilité qu'ils présentent ne se trouve pas dans les blés.

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. L'érosion rapide et continue du patrimoine génétique du blé a diminué les possibilités d'amélioration des rendements et rendu les cultures du blé dans le monde de plus en plus vulnérables à de nouveaux stress biotiques et abiotiques.

En Algérie, depuis l'indépendance, aucune stratégie de sélection et d'amélioration n'a été suivie de façon continue. Les recherches réalisées à ce jour ne font aucune mention de collections étudiées. De plus, des introductions de nouvelles variétés de blés durant les années 1967-1968, ont entraîné une régression et une déperdition de certains cultivars locaux bien adaptés. Mais, il doit exister un matériel ancestral ou très ancien dans certaines régions montagneuses et sahariennes, seules les prospections, les collectes et les caractérisations nous donneront une idée sur le matériel qui subsiste jusqu'à nos jours (Abdelguerfi et Laouar, 1999)

Le processus de sélection des cultivars locaux a connu une régression à partir de 1965 due en grande partie à l'absence de moyens humains et matériels aux différents niveaux des structures en place ayant à charge la collection et le stockage des génotypes existants. A cet effet il est indispensable de réfléchir à une meilleure stratégie de conservation de ces ressources génétiques disponibles en Algérie.

L'insuffisance de la variabilité des blés cultivés peut être résolue par l'exploitation des 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 nécessité de conserver les ressources génétiques est devenue un enjeu politique et économique, car la production agricole actuelle et future dépend en grande partie de la diversité génétique disponible pour l'amélioration des plantes.

La mise en valeur de l'apport des ressources phylogénétiques dans l'amélioration des blés cultivés ne peut être réalisé 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 de thèse s'inscrit dans ce contexte. Elle a pour objectif la valorisation des ressources phylogénétiques des blés par l'analyse du polymorphisme des marqueurs biochimiques (sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire) d'un ensemble de 1131 génotypes appartenent à différentes collections, disponibles en Algérie. La séparation et l'identification allélique ont été réalisées par l'utilisation de l'approche électrophorétique. En effet, l'identification de ce type de protéines d'intérêt pourra servir plus tard dans les programmes de sélection et d'amélioration technologique des blés économiquement importants.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous intéressons à l'agriculture biologique. Ce type d'agriculture a acquis, cette dernière décennie, une image favorable auprès des consommateurs. 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 cet 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. En Europe, les crises alimentaires répétées et la méfiance vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés ont conduit plus d'un quart des consommateurs à se tourner vers des produits issus de l'agriculture biologique (Sylvander, 2000). En excluant l'utilisation d'engrais minéraux et de produits phytosanitaires de synthèse, l'agriculture biologique offre l'opportunité d'une production agricole plus respectueuse de l'environnement mais aussi économiquement viable. Cependant, les cultures biologiques présentent généralement des performances inférieures à celles obtenues en mode

conventionnel intensif. Il y a un besoin crucial de mieux comprendre la variabilité de la teneur en protéines du grain, car les meuniers exigent des lots avec des valeurs en protéines supérieures à 10,5% de la matière sèche. Il convient donc de caractériser en plus de la diminution de teneur en protéines l'incidence du mode de culture (biologique versus intensif) sur les protéines du grain de blé.

Notre étude va donc chercher à examiner les variations quantitatives et qualitatives (présence/absence) observables au niveau du protéome du grain de blé en fonction du mode de production. Notre approche porte donc sur une analyse comparée du protéome du grain obtenu dans l'un ou l'autre mode de production.

La régulation de la synthèse des protéines de réserve et de protéines de types salino solubles (albumines et globulines) est fonction de facteurs génétiques et environnementaux qui doivent donc être étudiées pour continuer à progresser dans la voie de la maîtrise de la valeur technologique. L'analyse de ces mécanismes peut être abordée par l'analyse du transcriptome et du protéome du grain en développement en réponse à des facteurs du milieu bien contrôlés. Nous nous limiterons, par cette première analyse, à examiner les différences au niveau du protéome du grain mature obtenu selon les deux modes biologique et intensif. Cette approche peut aussi nous donner des indications sur l'existence ou non de différences susceptibles de différencier les blés produits selon l'un ou l'autre des deux modes.

Ce manuscrit se compose de 3 chapitres. Le premier résume la phylogénie et l'importance des ressources génétiques des blés, tout en donnant quelques généralités sur les caractéristiques biochimiques du grain, ainsi que, l'intérêt de la culture biologique.

Le deuxième chapitre décrit le matériel végétal, objet de l'étude, et les différentes techniques d'analyse utilisées.

Ensuite, les différents résultats obtenus seront présentés dans le troisième chapitre en 2 parties distinctes.

- Première partie, «Evaluation de la variabilité génétique des gluténines des blés originaires et/ou cultivés en Algérie et de leurs apparentés »
- Deuxième partie : « Analyse de l'expression différentielle de protéines dans le grain selon deux conditions de culture (biologique versus conventionnel) ».

---

# **CHAPITRE 1 :**

# **RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

# 1. ORIGINE, PHYLOGENIE ET CLASSIFICATION DES BLES

---

## 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<sup>ème</sup> millénaire avant J.C. ont été découverts sur des sites archéologiques au Proche Orient (Harlan, 1975).

## 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 karyotype 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 karyotype 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 de blé tendre, blé dur et deux espèces ancêtres ont été développés (Dubcovsky *et al.*, 1996 ; Van Deynze *et al.*, 1995 ; Marino *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 les blés polyploïdes.

### 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 avant, en tant que donateur du génome B. Concernant l'origine des génomes B et G des blés polyploïdes, Sarkar et Stebbins (1956) ont proposé *Ae. speltoides* 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. speltoides* (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* (Upadhyya et Swaminathan, 1963).

Le tableau 1 résume les différentes espèces du genre *Triticum* et leurs niveaux de ploïdie. 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 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 stérile (bien que leurs chromosomes appariés indiquant une constitution génomique identique).

**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>T. durum</i> (Desf.) Husn.; <i>T. paleocolchicum</i> A. ; <i>T. polonicum</i> (L.) Thell.; <i>T. turanicum</i> (Jakubz.) A. et <i>T. dicoccoides</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

**Tableau 2 : Liste des *Aegilops* et leurs synonymes les plus fréquents (Van slageren, 1994)**

Génome(I)	Espèces	Synonymes ( <i>Aegilops</i> )	Synonymes ( <i>Triticum</i> )
<b>UM</b> <b>MU</b> <b>UM ou UMN</b>	<b>Genre Aegilops</b> <b>Section Aegilops L.</b> <i>Aegilops biuncialis</i> Vis. <i>Aegilops geniculata</i> Roth <i>Aegilops neglecta</i> Req ex Bertol. (4x et 6x)	<i>Ae. lorenti</i> <i>Ae. ovata</i> L. <i>Ae. triaristata</i> Willd. (4x and 6x)	<i>T. macrochaetum</i> (Shuttl. & Huet) Richter <i>T. ovatum</i> (L.) Raspail <i>T. triaristatum</i> (Willd.) Godr. & Gren.
<b>SU</b>	<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>	
<b>U</b> <b>UMN</b> <b>UC</b>	<i>Aegilops umbellulata</i> Zhuk. <i>Aegilops columnaris</i> Zhuk. <i>Aegilops triuncialis</i> L. Var. <i>triuncialis</i> Var. <i>persica</i> (Boiss.) Eig	<i>ssp. triuncialis</i> <i>ssp. persica</i> (Boiss.) Zhuk.	<i>T. mbellulatum</i> (Zhuk.) Bowden <i>T. columnare</i> (Zhuk.) Morris & Sears <i>T. triunciale</i> (L.) Raspail
<b>US</b>	<i>Aegilops kotschyi</i> Boiss.		<i>T. kotschyi</i> (Boiss.) Bowden
<b>M</b>	<b>Section Comopyrum (Jaub. et Spach) Zhuk.</b> <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
<b>N</b>	<i>Aegilops uniaristata</i> Vis.		<i>T. uniaristatum</i> (Vis.) Richter
<b>C</b> <b>CD</b>	<b>Section cylindropyrum (Jaub. et Spach) Zhuk.</b> <i>Aegilops caudata</i> L. <i>Aegilops cylindrica</i> Host.	<i>Ae. markgrafii</i> et <i>Ae. dichasians</i> (Bowden)	<i>T. dichasians</i> (Zhuk.) Bowden <i>T. cylindricum</i> Ces.
<b>Sb</b>	<b>Section Sitopsis (Jaub et Spach) Zhuk.</b> <i>Aegilops bicornis</i> (Forssk.) Jaub. et Spach Var. <i>bicornis</i> Var. <i>anathera</i> Eig		<i>T. bicornis</i> Forssk.
<b>Sl</b> <b>Ss</b> <b>Sl</b> <b>S</b>	<i>Aegilops longissima</i> Schweinf. Et Muschl. <i>Aegilops searsii</i> Feldman et Kislev ex Hammer <i>Aegilops sharonensis</i> Eig <i>Aegilops speltoides</i> Tausch Var. <i>speltoides</i> Var. <i>ligustica</i> (Savign.) Fiori	<i>Ae. ligustica</i> (Savign.) Coss.	<i>T. longissimum</i> (Schweinf. & Muschl.) <i>T. searsii</i> (Feldman & Kislev) <i>T. speltoides</i> (Tausch) Gren. Ex Richter
<b>DMU</b> <b>D</b> <b>DMS</b> <b>DDM</b> <b>DN</b>	<b>Section Vertebrata Zhuk. emend. Kihara</b> <i>Aegilops juvenalis</i> (Thell.) Eig <i>Aegilops tauschii</i> Coss. <i>Aegilops vavilovii</i> (Zhuk.) Chennav <i>Aegilops crassa</i> Boiss. (4x et 6x) <i>Aegilops ventricosa</i> Tausch	<i>Ae. turcomanica</i> Roshev. <i>Ae. Squarrosa</i> L.	<i>T. juvenale</i> Thell. <i>T. tauschii</i> (Coss.) Schmalh. <i>T. syriacum</i> Bowden <i>T. crassum</i> (Boiss.) Aitch. & Hensl. <i>T. ventricosum</i> Ces.
<b>T</b>	<b>Genre Amylopyrum (Jaub. et Spach) Eig</b> <i>Amylopyrum 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

(1) Kimber et Feldman (1987)

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* et le *T. durum* qui sont des sous espèces de *T. Turgidum* : le premier fut l'un des blés cultivés dans l'antiquité et le deuxième 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 polyploïdes. Sept génomes distincts composent les espèces diploïdes et polyploïdes, excepté le génome T, spécifique à *Ae. mutica* (tableau 2).

## 2. GRAIN DE BLE

---

### 2.1. Composition des différents organes

Dans toutes les espèces céréalières, le grain est essentiellement glucidique avec 60 à 75 % de glucides digestibles (amidon principalement) (Feillet, 2000). Le blé apparaît ainsi comme un aliment essentiellement énergétique : 330 à 385 kcal/100 g. Le taux de fibre diététique est variable (2 à plus de 30 %). Il dépend notamment de la taille du grain, les grains de faibles dimensions (petits mils) ayant une plus grande proportion d'enveloppes. La teneur en protéines va de 6 à 18 % dans les cas extrêmes mais se situe le plus souvent entre 8 et 13 %, l'acide aminé limitant est la lysine. Les lipides sont relativement peu abondants mais ils sont extrêmement intéressants par la forte proportion des acides gras polyinsaturés. Les céréales sont peu minéralisées : la teneur en phosphore est élevée, celle du calcium est faible, et ne suffit pas à neutraliser tout l'acide phytique. L'acide phytique insolubilise également Mg, Zn, Fe (Favier, 1989).

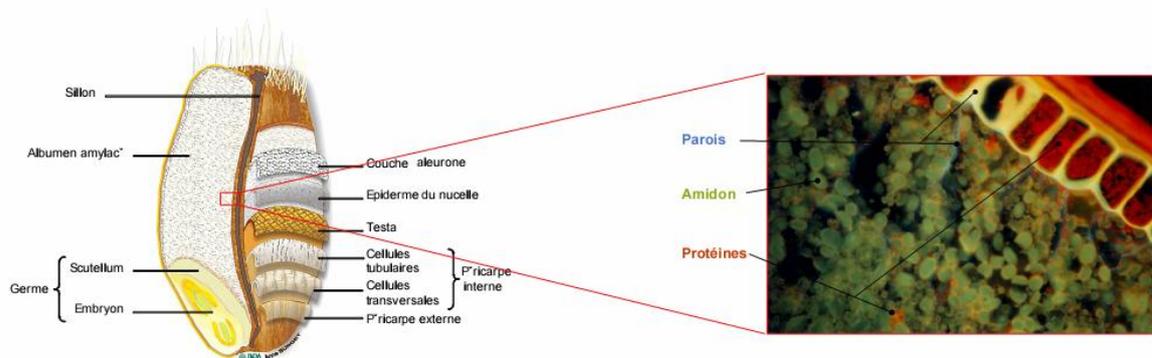
**Les couches externes** sont caractérisées essentiellement par leur teneur non négligeable en protéines (7%), lipides (2%), minéraux et vitamines du groupe B (à l'exception de la vitamine B12 absente du règne végétal). La teneur en fibres est très élevée ; ces fibres sont principalement des glucides pariétaux ou glucides indigestibles : cellulose, hémicelluloses, lignine. Rappelons que la fraction fibre joue un rôle physiologique important en permettant la progression normale du bol alimentaire dans le tube digestif et en favorisant certains métabolismes (cholestérol, triglycérides). Mais elle joue aussi un autre rôle très important en diminuant la digestibilité des autres constituants de la ration, notamment les protéines. La testa de certaines céréales est riche en polyphénols (tanins) ce qui accroît leur résistance à certains stress. Mais les tanins diminuent la digestibilité des protéines et du fer en se liant à eux pour former des complexes indigestibles. Par ailleurs, en colorant les farines et semoules, les tanins les rendent moins acceptables par les consommateurs.

**La couche d'aleurone** est une couche histologique localisée à la périphérie du grain de blé entre l'albumen amylicé et les enveloppes. Elle est, avec l'embryon, l'unique tissu vivant du grain mature et permet son développement au cours de la germination. Elle assure à la fois un rôle nourricier via le stockage de métabolites et la synthèse d'enzymes d'hydrolyse des réserves, et un rôle de protection grâce à sa structure pariétale résistante. La couche à aleurone est un tissu complexe qui renferme des concentrations importantes de molécules d'intérêt nutritionnel (Antoine *et al*, 2004). Ainsi, dans le cas du blé, bien que constituant seulement 6

% du poids du grain, elle contient à elle seule 16 à 20 % des protéines du grain entier, 31 % des lipides, 58 % des minéraux, 32 % de la thiamine (vitamine B1), 37 à 82 % des autres vitamines du groupe B (B2, B6, PP, acide pantothénique). En raison de sa concentration élevée en nutriments nobles, la couche d'aleurone est parfois appelée «couche merveilleuse». Mais il faut savoir qu'elle contient aussi une quantité notable d'acide phytique (insolubilisant des protéines et des minéraux tels que Ca, Mg, Fe, Zn) et des fibres qui diminuent la digestibilité des constituants de la ration.

**Le germe** est riche en minéraux, protéines, lipides et vitamines. Selon les céréales, il contient à lui seul une grande partie, parfois la plus grande partie, des lipides et de la vitamine E liposoluble. Le scutellum est très riche en thiamine.

**L'albumen** est la partie du grain la plus importante en poids et en volume : 60 à 90%, il contient principalement de l'amidon qui est un glucide de réserve utilisé par les végétaux supérieurs pour stocker de l'énergie sous forme de sucre lent ou complexe. Son organisation complexe en structures cristallines et amorphes conduit à un grain dense permettant le stockage de millions d'unités glucose dans un volume extrêmement réduit. Au sein des cellules de l'albumen délimitées par les parois cellulaires (Figure 1 en jaune), l'amidon forme des grains individuels (Figure 1 en vert) enchâssés dans une matrice protéique (Figure 1 en orange). Ces différents constituants sont retrouvés dans tous les aliments à base de blé : pain, pâtes, semoules, biscuits, etc. Ses teneurs en protéines, lipides, minéraux et vitamines sont plus faibles que celles du germe et des enveloppes. De plus, la qualité nutritionnelle de ses protéines est inférieure à celle des protéines des parties périphériques du grain.



**Figure 1:** différents organes du grain de blé.

## **2.2. Les différentes fractions protéiques du grain**

Osborne en 1907, avait proposé le premier fractionnement des protéines des céréales selon leur solubilité. Elles sont divisées en quatre classes, albumines (solubles dans l'eau), globulines (solubles dans une solution à 10 % de NaCl), prolamines (solubles dans l'éthanol de 70 à 90 %) et gluténines (insolubles dans toutes ces solutions). Bien que ce fractionnement soit encore largement utilisé, il est maintenant reconnu que les quatre classes ne sont pas tout à fait pures et qu'il y a des contaminations d'une classe à l'autre.

Cependant sur la base de résultats biochimiques obtenus, une classification selon la fonction biologique de ces protéines est d'un point de vue scientifique plus acceptable, elles pourraient alors être divisées en deux classes :

### **2.2.1. Protéines cytoplasmiques ou métaboliquement actives**

Elles constituent 12 à 20 % des protéines totales, ce sont les albumines et les globulines, regroupant aussi les enzymes, les protéines membranaires, les protéines de régulation non enzymatiques, les protéines présentes dans les organites cellulaires, etc. (Belitz et Grosh, 1987). Les albumines sont solubles dans l'eau et les globulines dans le sel (Singh et Skerritt, 2001). Parmi les albumines et globulines prédominantes, les inhibiteurs d'alpha amylase (Shewry *et al.*, 1984), les serpins et les purothionines (Østergaard *et al.*, 2000). Ces protéines peuvent jouer un double rôle : d'un côté comme des réserves nutritives pour l'embryon pendant la germination et de l'autre côté comme des inhibiteurs contre les attaques des insectes et des pathogènes fongiques avant la germination. Les puroindolines (de la famille des purothionones) sont impliquées dans des différences de dureté de grain (Morris, 2002). Généralement, on considère que les albumines-globulines ne jouent pas un rôle majeur dans la qualité technologique de la farine, bien qu'il ait été démontré que le rapport albumines / globulines soit corrélé avec à des caractéristiques de panification.

### **2.2.2. Protéines de réserve**

Ce sont les prolamines ; protéines riches en proline et glutamine et qui ne sont présentes que dans l'albumen (Moss, 1962). Les gliadines constituent de 30 à 40% des protéines totales de la farine. Leur masse va de 25 à 80 kDa et elles peuvent être séparées en quatre sous-groupes électrophorétiques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\omega$ - gliadines, chacun contenant de nombreuses protéines proches en composition et structure (Anderson et Greene, 1997). Les polymères de gluténines se composent de sous-unités de faible poids moléculaire (SG-FPM) d'environ de 25 à 45 kDa liées aux sous-unités des gluténines de haut poids (SG-HPM) de 70 à 90 kDa par des liaisons disulfures inter-chaines. Les SG-FPM- possèdent également des  $\beta$ -gliadines (Muller *et al.*,

1998) pouvant également être polymérisées avec les gluténines. Les rôles des différents composants de gluten dans la fonctionnalité de la pâte sont complexes (Gupta *et al.*, 1992 ; MacRitchie *et al.*, 1991 ; Khatkar *et al.*, 2002). Bien que les SG-HPM ne représentent qu'environ 30% des gluténines et moins de 1.8% de la farine totale, elles jouent un rôle déterminant dans la valeur d'utilisation du blé. La diversité allélique des sous unités des gluténines (codés par 6 loci complexes) se caractérise par des combinaisons de sous unités parfois très différentes. De plus, certaines de ces sous unités se distinguent par le nombre de liaisons intermoléculaires qu'elles peuvent établir dans la formation du réseau polymérisé aboutissant au gluten. La mesure des tailles de polymères, rendue possible par « Analysis of Flow Field Flow Fractionation Multi Angular Laser Scanning AFFFF MALS », révèle que la fraction des gluténines va de 600 000Da à plus de 17x10<sup>6</sup> Da (Lemelin *et al.*, 2007).

### **2.2.3. ponts disulfures : leur formation et leur rôle dans la détermination de la structure et des propriétés des protéines du gluten**

Les ponts disulfures jouent un rôle considérable dans la détermination de la structure et des propriétés des protéines du gluten. Ils sont formés entre les groupes sulfhydryl des résidus cystéines au sein de la même protéine et on parle dans ce cas de liaisons intrachaines ou entre les différentes protéines, ce qu'on appelle liaisons interchaines.

Les ponts disulfures sont très importants dans la stabilisation de la conformation des molécules protéiques ou des agrégats protéiques et ils déterminent la taille des polymères de gluténines.

La quantité de cystéines contenant dans la farine mature est autour de 2.5g par 100 g de protéines dont une proportion majeure (environ 95%) est impliquée dans la formation des ponts disulfures (Groch and Wieser, 1999).

La formation des ponts disulfures commence rapidement après la synthèse des protéines dans le lumen du réticulum endoplasmique comme partie intégrale de repliement de protéines (protéines de structure) et ceci peut être assisté par l'enzyme disulfide isomérase (Shewry, 1999). Il est très probable que les ponts disulfures intra chaines se forment plus rapidement que les ponts interchaines ; mais les sous-unités de gluténine ; une fois synthétisées ; ne peuvent pas combiner tous leurs résidus de cystéine pour former des ponts disulfures intrachaines. Quelques uns restent comme des thiols libres ou forment des ponts disulfures interchaines (Kasarda ; 1989). Les groupements thiols libres deviennent oxydés durant la deshydratation du grain qui se coïncide avec la formation des polymères de haut poids moléculaire (Ghazi *et al* ; 2003).

### 2.3. Extraction et séparation des protéines de réserve

Afin de mieux connaître et identifier les protéines de réserve, plusieurs techniques d'extraction et de séparation ont été employées. Ces techniques ont beaucoup évolué depuis l'extraction d'Osborne (1907) basée sur la solubilité permettant ainsi de séparer les gliadines des gluténines, mais il y a toujours des contaminations entre les différentes classes.

En 1990, Graybosch et Morris (*in* Gianibelli, 2001) s'inspirant des travaux de Burnouf et Bietz (1989) ont proposé au lieu de l'extraction des protéines totales une extraction séquentielle basée sur l'élimination des gliadines en les solubilisant dans l'éthanol à 70 % et en lavant le culot résiduel par le diméthylsulfoxyde et l'éthanol 70 %. Mais la méthode la plus souvent utilisée est celle de Singh *et al.*, (1991) adaptée de la méthode de Marchyllo *et al.*, (1989). Elle consiste à extraire de façon séquentielle les gliadines par du propanol-1 à 50% puis les gluténines (FPM et HPM) par du propanol- à 50% additionné d'agents réducteurs et alkylateurs. Les extraits obtenus sont ensuite fractionnés par SDS PAGE pour les gluténines et ACID PAGE pour les gliadines (Morrel,1994). Une autre méthode simple pour extraire les gluténines sans être contaminées par les gliadines. elle est basée sur le principe de la précipitation. En effet l'utilisation des concentrations différentes d'acétone (40% et 80% respectivement) après extraction des gliadines selon la méthode de Singh conduit à une précipitation sélective des SG-HPM et des SG-FPM. Cette précipitation est due aux différences de masse entre les deux groupes des protéines.

Les protéines extraites sont ensuite passées à la phase de séparation, pour cet objectif des techniques de haute résolution ont été employées comme la chromatographie (Bietz,1986; Bean et Lookhart,1997) et l'électrophorèse (Payne et al.,1979 ,Wrigley *et al.*, 1984). En effet les gluténines sont des polymères qui forment un réseau pouvant dépasser 10 millions de Daltons. Avant d'être séparées elles sont réduites par agent réducteur (2-mercaptoéthanol ou dithiothreitol) en sous unités de 25 à130 Kda., séparées par SDS-PAGE deux groupes se distinguent : les SG-HPM et les SG-FPM. Ces dernières sont surtout lisibles en électrophorèse bidimensionnelle (Jackson *et al.*, 1983).

Les gliadines, des monomères de 24 à 80 KDa, elles sont séparées par électrophorèse en gel acid (ACID PAGE) en quatre classes  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\omega$ -gliadines, chaque classe présente plusieurs bandes et donc une grande diversité, ce qui les a laissés comme moyen très efficace pour l'identification variétale. En effet les diagrammes obtenus ne sont pas affectés par les

conditions de cultures. C'est un paramètre qualificatif (Autran, 1973; Bushuk et Zillman, 1978)

#### **2.4. Déterminisme génétique et localisation chromosomique des protéines de réserve**

L'une des avancées les plus importantes chez blé a été l'établissement dès les années 70 de la localisation chromosomique des gènes codant pour les protéines du gluten (Payne, 1987). Mais pour les blés apparentés, le déterminisme génétique des protéines de réserve est très peu étudié. Généralement les études sont focalisées sur les espèces diploïdes et plus particulièrement celles qui ont contribué à la constitution des génomes des blés cultivés.

Pour toutes les espèces de la tribu des Triticées, les sous unités gluténines sont codées par des gènes localisés sur les chromosomes du groupe 1 : les SG-HPM ont leurs gènes sur les bras longs, les loci sont nommés Glu-1. Les SG-FPM ont leur gènes sur les bras courts, les loci sont désignés par Glu-3 (Singh et Shepherd, 1988). Les  $\omega$ -et quelques  $\gamma$ -gliadines sont codés par des gènes localisés sur les bras courts des chromosomes du groupe 1, ainsi les loci sont nommés Gli-1, et sont étroitement liés aux gènes codant pour les SG-FPM. Les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -gliadines sont codées par des gènes localisés sur les bras courts des chromosomes du groupe 6, sur les loci Gli-2 (Payne, 1987).

Ceci a été confirmé par plusieurs équipes. Ainsi, Lawrence et Shepherd (1981), par l'utilisation des lignées d'addition de quelques espèces de la tribu des triticées avec le blé tendre : Chinese spring, ont reporté la localisation chromosomique des gènes codant pour les SG-HPM et les SG-FPM de l'espèce *Secale cereale* sur le chromosome (1R), de l'espèce *Hordeum vulgare* sur le chromosome (5H), de l'espèce *Aegilops umbellulata* sur le chromosome (1U), pour *Aegilops comosa* sur le chromosome (1M) et pour l'espèce *Agropyrum elongatum* sur le chromosome (1E). Aussi, Law et Payne (1983), ont localisé le locus Glu-U1 codant pour les SG-HPM sur le bras long du chromosome U1 de *Aegilops umbellulata*. Ils ont indiqué l'homologie existante entre ce chromosome et les chromosomes du groupe 1 du blé tendre. Cette homologie est confirmée récemment pour toutes les espèces du genre *Aegilops* (Zhang *et al.*, 1998).

### **3. RESSOURCES GENETIQUES DE BLE**

---

#### **3.1. Importance des ressources phylogénétiques**

Les ressources phylogénétiques ont toujours servi à l'homme comme matériel de départ pour répondre aux besoins nutritionnels, médicaux et d'habitat immédiat. Tout lui venait au départ de la cueillette, et c'est par la suite qu'il a commencé à opérer un choix au sein de la multitude d'espèces que lui offrait la nature et entourer de plus de soins certains individus au sein des populations inter et intra spécifiques par la sélection massale. C'est ainsi que l'homme a commencé par privilégier certaines espèces en les éjectant de leur environnement naturel et en les plaçant de plus en plus près de lui et dans des conditions de plus en plus particulières. D'où la naissance de l'agriculture et des semences agricoles. Les paysans ont domestiqué les plantes et les animaux, inventé l'agriculture, affiner leurs connaissances et leur savoir faire, bâti des systèmes durables depuis des siècles en utilisant les ressources génétiques locales. Ainsi donc, le rôle des pratiques agricoles traditionnelles qui utilisent une gamme très variée de ressources génétiques locales a été et demeure encore déterminant dans les processus de la sélection et de l'amélioration variétale, de même que dans la production de semences et le développement agricole. Actuellement, les ressources génétiques en blés sont d'une importance majeure, elles incarnent un éventail de diversité génétique nécessaire pour augmenter et maintenir le potentiel de rendement du blé et fournissent de nouvelles sources de résistance et tolérance face aux différents stress biotiques et abiotiques.

#### **3.2. Diversité des ressources génétiques des blés et leurs apparentés**

Les centres de ressources génétiques ont pour but de décrire, maintenir, et conserver la diversité parmi les différentes espèces de céréales à pailles. Ces ressources sont le patrimoine héréditaire disponible auprès des différents utilisateurs (chercheurs, sélectionneurs privés ou publics, agriculteurs, associations...). C'est également un outil précieux pour les chercheurs qui travaillent dans l'amélioration des plantes et la création variétale.

Les ressources génétiques ont été classées par catégorie (Frankel, 1977 ; FAO, 1983). Bien que cette catégorisation ne soit pas suivie par tous les centres impliqués dans la conservation et l'utilisation des ressources génétiques, ces catégories sont :

- cultivars modernes dont l'utilisation est courante ;
- cultivars désuets, souvent les cultivars d'élite du passé et souvent trouvés dans les pedigrees des cultivars modernes ;

- variétés autochtones ;
- parents sauvages de la tribu de Triticeae ;
- stocks génétiques et cytogénétiques ;
- lignées de multiplication.

### **3.3. Disparition de la diversité génétique**

Depuis 1900, on a perdu les trois-quarts environ de la diversité génétique des plantes cultivées (Braun *et al.*, 1998). Mendel (et plus tard d'autres généticiens pilotes) ont mis en évidence les connaissances de base de la génétique végétale qui ont permis à augmenter considérablement le potentiel de production de l'agriculture. Indéniablement, les merveilles de l'amélioration de production ont eu comme conséquence l'érosion de la diversité génétique de beaucoup de récoltes, y compris le blé, dû au remplacement de cultivars autochtones avec les cultivars modernes à haut rendement. En plus, le déboisement tropical, l'urbanisation, la destruction des terres humides et la mise en culture des terres sèches ont détruit les habitats d'un grand nombre de progéniteurs sauvages des plantes cultivées (Braun *et al.*, 1998). Les espèces végétales des terres sèches sont particulièrement affectées. Selon le Centre de recherches agricoles en zones sèches au Proche Orient, l'ampleur du déboisement et une utilisation médiocre des terres et de l'eau ont provoqué des pertes massives d'habitat naturel. Des régions qui abritaient jadis de précieuses réserves génétiques de blé sauvage sont devenues des déserts (Hawkes, 1991). Selon cette même source, il est possible qu'on voit disparaître d'ici 2025 jusqu'à 60.000 espèces de plantes (soit 25 % du total mondial) . La future sécurité alimentaire pourrait dépendre en partie de nouveaux moyens permettant de conserver des régions à riche diversité de plantes cultivées et d'élargir les collections de plasma germinatif que renferment les banques de semences et les services de cultures tissulaires .

### **3.4. Evaluation des ressources phytogénétiques des blés**

L'identification phénotypique basée sur la description des caractères morphologiques et agronomiques sont largement utilisées pour l'évaluation de la diversité génétique des génotypes de blé (Lee et Kaltsikes, 1973; Cecarelli *et al.*, 1987, Van Hintum et Elings, 1991). Cependant les traits de caractères morphologiques ont de nombreuses limites telles que un faible polymorphisme, une faible héritabilité une expression tardive du caractère et peuvent être contrôlé par des gènes à effets épistatique et pleiotropique (Nakamura, 2001). Tandis que les marqueurs biochimiques et moléculaires comme les isozymes and les protéines de réserve reflètent le génotype d'une façon plus directe, indépendamment des influences de

l'environnement (Brown et Weir, 1983) l'idée de l'identification et la différenciation variétale à l'aide des protéines de réserve est née pour la première fois dans l'institut de recherche « N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry (VIR) (cited by Koranev *et al.*, 1996).

Les glutenines et gliadines sont les deux fractions protéiques les plus importantes du grain de blé qui peuvent être utilisées pour évaluer la diversité génétique des espèces et des variétés (Lafiandra *et al.*, 1990; Pfluger *et al.*, 2001) et identifier les différents génotypes au sein de la même espèce (Bushuk et Zillman 1978; Nevo et Payne 1987).

### **3.5. Préservation et conservation des ressources génétiques**

Le développement agricole a conduit à des variétés très performantes mais s'est accompagné d'une réduction sensible de la diversité génétique. Il est donc nécessaire de constituer une "réserve génétique", comprenant des ressources très diversifiées susceptibles de répondre aux besoins futurs de l'homme. Ces ressources sont matérialisées sous forme de variétés, anciennes et modernes, de populations ou écotypes locaux et espèces sauvages proches des plantes cultivées.

Les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (RPGA) constituent la base biologique de la sécurité alimentaire mondiale et fournissent des moyens de subsistance à tous les habitants de la planète. Ces ressources locales sont la matière première la plus importante pour le sélectionneur et l'intrant le plus essentiel à l'agriculteur. C'est pour cette raison que, la conservation, l'utilisation durable et le partage juste et équitable des avantages tirés de l'utilisation des ressources phytogénétiques sont à la fois une préoccupation et un impératif sur le plan international. Les cas d'utilisation des RPGA sont nombreux aussi bien dans l'amélioration variétale que dans les approches de solutions aux problèmes agronomiques et socio-économiques.

En résumé, la sauvegarde de la diversité biologique des plantes cultivées est nécessaire pour :

- conserver ce patrimoine génétique
- rendre disponible les ressources génétiques
- disposer d'un réservoir permettant d'affronter des problèmes qui pourraient surgir dans le futur.
- assurer la continuité des améliorations génétiques des cultures alimentaires.

Durant les années 1960, par exemple, quand une épidémie de rouille du blé a éclaté aux Etats-Unis, ce sont des gènes provenant d'un blé sauvage de Turquie qui ont apporté la résistance. Plus étonnant encore, quand un fléau violent a dévasté le sixième des cultures de maïs aux

Etats-Unis, en 1970, les sélectionneurs ont trouvé deux ancêtres du maïs moderne au Mexique. Une fois développées, ces deux variétés de maïs sauvage ont donné une résistance contre sept graves maladies du maïs cultivé. Ce qui est remarquable, c'est que les seuls progéniteurs qu'on ait pu trouver étaient quelques plantes dans une petite parcelle qui allait être développée (Hawkes, 1991).

Les ressources génétiques peuvent être conservées dans leur milieu naturel (conservation *in situ*) ou en dehors de leur habitat d'origine, de manière statique (conservation *ex situ*) ou dynamique:

#### **a- Conservation *in situ***

Les ressources génétiques d'espèces sauvages se conservent de préférence dans leur milieu naturel. Ce mode de gestion permet de maintenir les potentialités d'adaptation et d'évolution, face aux variations du milieu. Pour les espèces d'intérêt agricole *et* alimentaire, la gestion *in situ* est surtout utilisée pour les espèces sauvages apparentées aux espèces cultivées.

#### **b- Conservation *ex situ***

Les ressources génétiques peuvent être conservées de manière stable en dehors de leur habitat d'origine:

- \* sous forme de semences — par exemple, grains de blé de différentes lignées;
- \* sous forme d'organes ou de plants *in vitro* — par exemple, méristèmes de caféier en tubes;
- \* sous forme de plantes rassemblées en collection conservatoire au champ - par exemple, verger de pommiers.

On parle alors de conservation *ex situ*.

#### **c- Conservation dynamique**

Pendant des millénaires, les agriculteurs ont utilisé leurs propres semences, ou celles de leurs voisins. Leurs variétés évoluaient ainsi en permanence. Cette conservation à la ferme perdure dans certaines régions du monde. En France, elle n'est plus pratiquée pour la plupart des espèces.

Pour certaines espèces sélectionnées, on peut recréer des situations analogues en soumettant des populations composites à des pressions de sélection proches de celles de leurs milieux naturels. On parle de gestion dynamique, l'objectif étant de conserver la capacité de l'espèce à évoluer dans le temps et à s'adapter aux variations du milieu.

## 4. CULTURE BIOLOGIQUE DE BLE

---

### 4.1. Evolution des surfaces de la culture biologique

Au niveau mondial, les céréales représentent la part la plus importante des surfaces arables biologiques (soit 35 % des terres arables) (Willer et Yussefi, 2007). Les rendements des céréales biologiques sont très variables et en général inférieurs de 7 à 40 % à ceux observés dans des systèmes conventionnels (Badgley *et al.*, 2007 ; El-Hage Scialabba, 2007). En France, afin d'accroître la durabilité de l'agriculture, le Grenelle de l'Environnement a récemment défini des objectifs d'augmentation des surfaces agricoles cultivées en agriculture biologique, en incitant notamment à les localiser de préférence dans les zones de captage d'eau potable. L'objectif est d'atteindre 6 % en 2010, 15 % en 2013 et 20 % d'ici 2020 (Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire, MEDDAT, 2007). En Europe, des mesures de soutien financier ont été mises en place dans le but de favoriser la conversion mais aussi, dans certaines régions, de maintenir la production biologique. Malgré la mise en place d'un premier plan de développement de l'agriculture biologique dès 1997 (Riquois, 1997), les objectifs d'augmentation de surfaces cultivées en agriculture biologique n'ont pas été atteints. En 1997, l'objectif était de « parvenir à 25 000 exploitations et 1 million d'ha en 2005 ». Or en 2005, seulement 11 400 exploitations, représentant 550 500 ha (soit 1,99 % de la SAU nationale), étaient certifiées en agriculture biologique ou en conversion (Agence BIO, 2007).

### 4.2. Problèmes et limites de l'agriculture biologique du blé

En effet, de nombreux problèmes sont liés à la production de blé biologique.

#### 4.2.1. Des rendements limités et fluctuants

Les rendements du blé biologique sont, en moyenne, de 20 à 40% inférieurs à ceux obtenus en agriculture conventionnelle (Offermann et Nieberg, 2000). Ces résultats sont essentiellement expliqués par la coexistence de nombreux facteurs limitants, difficilement maîtrisables, tels que le déficit en azote, la concurrence des adventices et la pression des maladies (Taylor *et al.*, 2001). En outre, la production de blé biologique se caractérise par une forte fluctuation des rendements pouvant osciller, au sein d'une même région, de moins d'1 T/ha à plus de 6,5 T/ha (Le Clech et Hachler, 2003). Enfin, on note, depuis 10 ans, une stabilisation des rendements moyens en blé biologique en Europe, situés autour de 4 T/ha, induite principalement par le manque de recherches dans le domaine de la production de céréales biologiques (ENOF, 1999).

#### **4.2.2. Une nécessaire amélioration de la qualité et de la sécurité sanitaire**

Selon le dernier rapport de la Commission européenne, « il importe que les consommateurs perçoivent que la qualité des produits biologiques est plus élevée que celle des produits conventionnels » (EU Commission, 2002). L'agriculture biologique doit alors passer d'une obligation de moyens à une maîtrise des résultats visant à garantir la qualité des produits (propreté des lots, qualité technologique et nutritionnelle), mais aussi l'absence de contaminations.

##### ***Qualité technologique et nutritionnelle***

L'amélioration de la qualité technologique et nutritionnelle du blé biologique nécessite le développement de recherches dans les domaines de la sélection variétale (Lammers van Bueren *et al.*, 2002), la maîtrise de la nutrition azotée (David *et al.*, 2003) mais aussi l'adaptation des processus de fabrication. Un des enjeux principaux est de mettre en place des bassins d'approvisionnement (Le Bail, 2003) intégrant des systèmes de culture affectés, pour partie, à la production de blés biologiques améliorants (choix de cultivar, mode de fertilisation, rotation...). Face à une augmentation croissante des volumes de blé biologique collectés (ONIGC, 2006), les collecteurs sont de plus en plus exigeants vis-à-vis de la qualité boulangère des céréales produites. Le seuil de teneur en protéines exigé par les minotiers et les industriels de la panification a augmenté récemment et se situe actuellement entre 10 et 11,5 % (David *et al.*, 2007). Lorsque les lots n'atteignent pas le seuil exigé (généralement 10,5 %), le blé est alors déclassé et vendu aux filières d'alimentation animale à un prix inférieur de 30% en moyenne à celui des filières de panification. De plus, les collecteurs mettent en place une politique de modulation des prix d'achat (au maximum de 25 %) en fonction de la teneur en protéines. Il y a donc un réel enjeu pour les agriculteurs d'arriver à produire des blés biologiques avec des teneurs en protéines suffisamment élevées afin d'avoir un accès assuré au marché de la panification. Les teneurs en protéines obtenues étant très variables, il ne s'agit pas seulement d'augmenter mais aussi de stabiliser la qualité : la maîtrise technique de la production doit permettre de limiter la variabilité d'une année à l'autre et d'une parcelle à l'autre. Les blés biologiques se caractérisent par de faibles teneurs en protéines et gluten (Gooding *et al.*, 1993 ; Woese *et al.*, 1997) suite à la présence de forts déficits azotés au printemps. Dans de nombreux cas, le niveau seuil de panification, fixé à 10,5% pour le taux de protéines et 220 pour la note de panification, n'est pas atteint. Par ailleurs, on note une forte variabilité des résultats au sein d'un même cultivar en fonction des conditions édaphiques, climatiques et culturales.

Les farines biologiques présentent une tolérance réduite au pétrissage ainsi qu'un gonflement limité de la pâte (Dlouhy, 1981). Haglung *et al.*, (1998) confirment qu'une farine dont le taux de protéines est inférieur à 12% nécessite une durée de pétrissage et de gonflement plus important pour garantir un développement optimal. De même, ils démontrent qu'il est impossible de produire des pains ayant un volume suffisant avec des blés dont le taux de protéines est inférieur à 8%.

### ***Qualité sanitaire***

Il convient de garantir la sécurité du produit face aux risques de contaminations par les produits phytosanitaires environnants, les organismes génétiquement modifiés (OGM) et, enfin, les mycotoxines (Woese *et al.*, 1997 ; Bourn et Prescott, 2002). Dans les deux premiers cas, les contaminations par voisinage sont possibles dans le contexte actuel où la réglementation incite pas ou peu à l'isolement des cultures biologiques (EU Commission, 2003). Il convient alors de développer des recherches dont le but serait de garantir l'absence de contaminations des cultures biologiques (définition de zones de protection, développement de méthodes biologiques ou agronomiques limitant les flux génétiques, par exemple). La contamination par les mycotoxines des grains de blés présente un risque sanitaire important en agriculture biologique (Rotter *et al.*, 1996), notamment suite à l'incorporation de sons dans les farines. Le contrôle de *Fusarium spp.* s'effectue par l'utilisation de variétés résistantes et de mélanges variétaux (Vallavielle-Pope *et al.*, 2001), mais aussi par la limitation des plantes hôtes du pathogène (adventices, cannes de maïs, par exemple) et l'adaptation du systèmes de culture (Champeil *et al.*, 2003). Bien que certains travaux (Birzele *et al.*, 1998 ; Schollenberger *et al.*, 1999 ; 2002) concluent à des teneurs en déoxynivalénol (DON) moindres dans des lots de blés biologiques comparativement à des lots issus de l'agriculture intégrée et/ou conventionnelle, il convient de développer de nouvelles recherches visant à limiter les risques de contamination induits par le système de culture (effet de la rotation, du travail du sol...).

### **4.3. Expression différentielle des protéines du grain liée aux différents modes de culture**

La composition et la teneur en protéines sont sous la dépendance du génotype et des facteurs externes (Daniel, 1999). Ainsi, les modifications de climat ou des conditions de culture (fertilisation azotée, température, sécheresse, etc.) entraînent des variations considérables de la teneur azotée et de la composition en protéines, surtout de la richesse en gliadines et gluténines. Les variations (quantitatives et qualitatives) de la teneur en protéines

s'accompagnent de modifications de la composition (Triboi et Leblevenec, 1995) qui ne sont pas sans conséquences sur la valeur d'utilisation. Les grains de blé issus de la culture biologique (organique) diffèrent de ceux issus de la culture conventionnelle en plusieurs aspects. Selon plusieurs auteurs, les différences majeures résident dans le contenu des grains en protéines totales. Dans l'agriculture biologique, avec l'absence des engrais industriels ayant des effets rapides, un déficit d'azote et une accumulation inférieure des protéines de réserve du blé sont fréquemment observés (Prugar, 1999).

De nombreuses études mentionnent que les conditions environnementales, en particulier l'engrais et la température, affectent la quantité, la composition et même la polymérisation des protéines de gluten (Panozzo et Eagles, 2000; Johansson *et al.*, 2001). En présence d'un excès d'engrais azoté, Wieser et Seilmeier (1998) et Zhu *et al.*, (1999) ont observé des augmentations de la teneur en protéines de grain notamment des gliadines par rapport aux gluténines et des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire SG-HPM par rapport à celles de faible poids moléculaire SG-FPM. L'insuffisance en soufre induit à des augmentations considérables en  $\omega$ -gliadines et des augmentations plus ou moins élevées en SG-HPM (Wrigley *et al.*, 1984).

Wieser et Seilmeier (1998) ont entrepris une étude quantitative détaillée sur les effets des engrais azotés sur les différents composants de gliadines et de gluténines dans 13 variétés de blé tendre analysées par RP-HPLC. Ils ont observé qu'avec de l'engrais riche en magnésium, la quantité d' $\omega$ -gliadines a augmenté de 44 à 68% et celle des SG-HPM de 56 à 101%, tandis que peu de changement a été noté dans les  $\alpha$  et  $\gamma$ -gliadines et SG-FPM. Dans la même étude, la quantité d'albumines et globulines n'a pas changé.

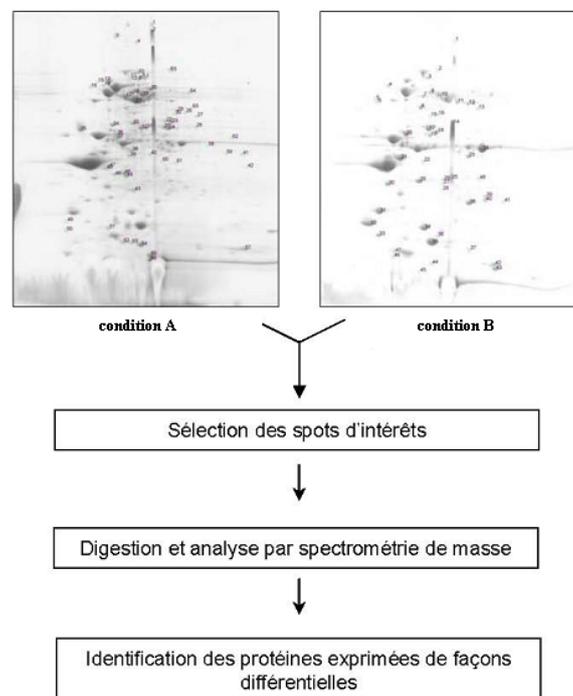
Pour d'autres études, les quantités relatives des albumines et globulines ont été rapportées comme diminuées par rapport à la quantité totale de protéines dans le grain (Wieser et Seilmeier, 1998 ; Doekes et Wennekes, 1982).

#### **4.4. L'utilisation de l'outil protéomique dans la détermination de la synthèse différentielle des protéines liée aux conditions de culture**

La protéomique s'intéresse à l'étude du protéome, c'est-à-dire à l'ensemble des protéines exprimées dans un organisme vivant, dans un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire (Kenyon *et al.*, 2002). L'approche protéomique vise aussi à établir l'identité, la quantité et la fonction de ces protéines, et à en déterminer l'expression en fonction des conditions environnementales (Patterson et Aebersold, 2003). Lors de ces dernières années, les biologistes ont séquencé plusieurs génomes, aussi bien bactériens et végétaux que

mammifères. Mais le fait d'avoir séquencé ces différents génomes ne permet pas de connaître les protéines exprimées dans une cellule à un instant donné de sa vie.

De plus, la complexité de ces systèmes biologiques ne repose pas uniquement sur l'expression des gènes codants pour les diverses protéines, mais aussi sur leur quantité, les modifications post-traductionnelles, l'épissage différentiel ainsi que les différentes interactions des protéines et métabolites. Ainsi, l'analyse protéomique propose de donner des cartes protéiques les plus globales d'un système biologique à un moment donné de son existence en fonction des conditions physiologiques, environnementale et pathologiques. Mais ce type d'approche n'aurait pas été possible sans le développement simultané de différentes techniques allant de la préparation de l'échantillon et de la résolution de sa complexité (gel d'électrophorèse, chromatographie liquide, etc.) à l'étude bio-informatique (banques de données génomique et protéique, clusters d'ordinateurs, etc.), en passant par l'analyse par spectrométrie de masse (Pandey et Mann, 2000). Le deuxième aspect important souvent pratiqué dans l'approche protéomique est l'analyse différentielle qui consiste par exemple à comparer les protéomes de deux états distincts (malade/sain ; traitement / pas de traitement ; ...) en observant l'apparition, la disparition ou les variations des quantités des protéines. L'approche de quantification la plus classique consiste à séparer les mélanges protéiques sur des gels d'électrophorèse bidimensionnelle et après coloration à faire apparaître les différences entre les gels. Les spots contenant les protéines exprimées de façon différentielle seront analysés par spectrométrie de masse (Figure 2).



**Figure 2:** Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.

---

# **CHAPITRE 2 :**

# **MATERIEL ET METHODES**

---

## 1. PRESENTATION DU MATERIEL VEGETAL

---

### 1.1. Collections de blés tendre et dur cultivés en Algérie

L'estimation de la variabilité génétique a porté sur deux collections de blés durs (120 génotypes) et tendres (71 génotypes) cultivés en Algérie dont certains sont des variétés alors que d'autres sont des lignées. Ces collections proviennent de l'ITGC (Khroub-Constantine) (tableaux 3 et 4)

### 1.2. Collection de 17 variétés de blés botaniques collectés en Algérie

La plus grande partie de cette étude est consacrée à l'estimation de la variabilité des SG-HPM et SG-FPM d'une collection importante de blés durs botaniques collectés en Algérie avec un total de 856 accessions (tableau 5). Ce germoplasme a été collecté gracieusement par l'Institut Techniques des Grandes Cultures (Constantine, Algérie) et le centre international des recherches agronomiques des régions sèches (Alep, Syrie), durant l'année 1988-1989. Les accessions originaires de différentes régions d'Algérie (Figure 1) sont groupées a priori en 17 variétés en fonction de leurs caractères morphologiques.

Une taxonomie intraspecificque fut proposée par Koerniche et Werner (1885 *in* Laumont et Erroux 1961) où 22 variétés sont distinguées.

Dans cette importante collection, cinq variétés botaniques sont absentes, il s'agit de: - var. *coerulescens*: épis noirs pubescents, barbes noires bleuâtres et grains blancs - var. *lybicum*: épis noirs pubescents, barbes noires et grains rouges. - Var. *niloticum*: épis rouges pubescents, barbes noires et grains rouges. - var. *erythromelan*: épis rouges glabres, barbes noires et grains rouges. - var. *provinciale*: épis noirs glabres, barbes noires ou bleuâtres longues et grain blancs. L'étude des caractères morphologiques des 17 variétés a été déroulée à l'ITGC (Khroub, Constantine) durant les campagnes agricoles 1995/1996, 1996/1997, 1997/1998 (Boudour, 2005). Certains caractères morphologiques d'ordre quantitatif, à savoir : la hauteur de la tige, la longueur du col, la longueur d'épi, le nombre d'épis par plante, le nombre d'épillets par épi, le nombre de grains par épi, le poids des grains par épi, le poids des 1000 grains, la longueur d'épi et la surface de la feuille étendard, ainsi que qualificatif lié à la morphologie du maître-brin, sont choisis pour étudier les similarités entre les variétés. Ces caractères sont mesurés sur des échelles allant de 1 à 5 et de 1 à 9 selon les caractères de l'épi.

### **1.3. Collection de blés apparentés**

Il s'agit d'un ensemble de 30 accessions de lignées sœurs obtenues à partir de croisements inter-spécifiques entre deux variétés syriennes de blé dur cultivé (*T. Turgidum ssp durum*) : Cham et Oum Rabi et deux espèces différentes de blé dur apparenté: *T. polonicum*, *T. dicoccum*, dont le génome est AABB (tableau 6). Des variétés témoins rentrant ou non dans les croisements effectués ont été aussi utilisés, à savoir : *T.dicoccum*3, Cham1, Oum Rabi5, Mohamed Ben Bachir, Waha, Ardente, Cirta et Hedba.

### **1.4. Collection de blés sauvages du genre Aegilops**

L'étude a porté sur huit espèces du genre Aegilops dont quatre diploïdes: *Ae.tauschii* (7 accessions), *Ae. umbellulata* (6), *Ae.caudata* (6), *Ae.comosa* (5) et quatre tétraploïdes: *Ae.geniculata* (10), *Ae.ventricosa* (10) , *Ae. triuncialis* (10 ) et *Ae. neglecta* (6) qui peut être hexaploïde.

Les 60 Aegilops ont pour la plupart une origine géographique connue. En majorité ils sont de la région méditerranéenne, mais on trouve des représentants d'une douzaine de pays. Ces informations sont portées dans le tableau 7. La collection des 60 Aegilops provient en grande partie de l'ICARDA.

### **1.5.Variétés utilisées dans l'étude comparative entre modes de culture**

Pour étudier les différences apportées par la culture biologique par rapport à la culture conventionnelle sur les processus de synthèse des protéines du grain de blé, deux variétés françaises de blé tendre d'hiver ont été utilisées (Ataro et Renan). Elles ont été cultivées dans la région de Clermont Ferrand (France) en mode conventionnel en 2008 en parcelles expérimentales où fut pratiquée une fertilisation azotée selon la méthode des bilans et une protection phytosanitaire complète. Sur le lieu de Parray Sous Brialle, ces deux variétés furent cultivées sur une exploitation pratiquant l'agriculture biologique. Aucun intrant ne fut apporté à ces deux variétés.

La variété Renan est un blé de qualité, tolérante à l'ensemble des maladies. Elle est recommandée par la Meunerie. Cette variété sélectionnée par l'INRA est également cultivée en Autriche et en Allemagne en Agriculture biologique. De type très hiver, elle doit être semée tôt pour exprimer son potentiel de rendement. Renan apporte un très bon compromis qualité/productivité, notamment lorsque des hivers vigoureux lui permettent d'exprimer sa résistance au froid. Valeur sûre, Renan est la première variété cultivée en agriculture biologique (29% des surfaces en blé en 2007) (ITAB, 2007). La variété Ataro est une variété

suisse issue de la sélection spécifique pour l'agriculture biologique de Peter Kuntz. Il s'agit d'une variété de bonne qualité mais avec des rendements faibles, de type hiver et demi tardif à épiaison. Cette variété est jusqu'ici peu cultivée en mode biologique.

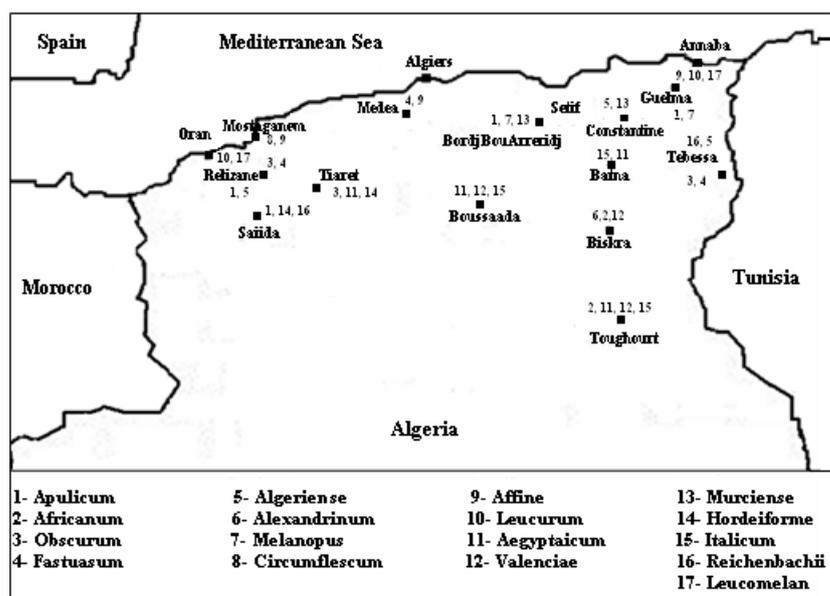
**Tableau 3:** liste des 71 blés tendres

N°	cultivars	N°	cultivars
1	- HIDHAB (HD1220)	37	-DHARWAR DRY / NESSER
2	-MAHON DEMIAS	38	-PASTOR//SITE/MO/3/CHEN/...
3	-ANZA	39	-CHEN/Ae.squarrosa(tous)//BCN/3/BAV92
4	-ARZ	40	-PASTOR/BAV92
5	-AIN ABID (AS)	41	-IRENA/BABAX//PASTOR
6	-ZIAD	42	-CROC-1/Ae. Squarrosa(224)//OPATA/3/ PASTOR
7	-FLORENCE AUREORE	43	-GEN*2//BUC/FLK/3/2*PASTOR
8	-SAHEL	44	-FILIN/2*PASTOR
9	-GIZA 163	45	-VEE/MJI//2*TUI/3/2*PASTOR
10	-GIZA 164	46	-ATTILA*2//CHIL/BUC
11	-WH542	47	-PBW65/2*PASTOR
12	-INQILAB 91	48	-BL 1724
13	-SAKHA69	49	-WEAVER/PRINIA
14	-TUI	50	-BOW/PRL//BUC/3/WH576
15	-SAGITARIO	51	-PRL/SARA//TSI/VEE # 5/3/DUCULA
16	-IRENA	52	-CHOIX / STAR/3/HE 1/3*CNO79//2* SERI
17	-SUPER SERI # 2	53	-KAUZ/PASTOR
18	-JAGGER	54	-WEAVER/4/NAC/TH.AC//3*PVN/3/MIRLO /BUC
19	-BAVIACORA-M92	55	-CHEN/Ae. Squarrosa(tous)//BCN/3/2*KAUZ
20	-BACANORA	56	-BOW/URES//2*WEAVER/3/BOW/PRL//BUC
21	-PUNJAB,96	57	-FALK*2/BISU/3/CHEN/...
22	-PINZON	58	-BENMABROUK
23	-SULTAN,95	59	-HPO/TAN/VEE/3/2*PGO/4/MILAN/5/SERI1
24	-CHAM-6	60	-MILAN/587230//HNITES
25	-SUPER SERI # 1	61	-MILAN/587230//BABAX
26	-MEXIPAK	62	-RANZ//ALTA84/ACS/3/MILAN/KANZ /4/HNITES
27	-CHAM-4	63	-REH/HARE//2*BCN/3/CROC -1/Ae.squarrosa 213 //PGO/4 HNITES
28	-NESSER TALL	64	-ATTILA/3*BCN//BAV92/3/TILHI
29	-SONALIKA	65	-CAL/NH/H56771/3/SERI/4/CAL/NH/H56771 /5/2*KANZ/6/ PASTOR
30	-PAVON TALL	66	-OASIS/SKANZ//4*BCN*2/3/PASTOR
31	-CHIL/PRL	67	-MILAN/LOTUS//ATTILA/3*BCN
32	-NESSER DWARF	68	-NAC/THAC//3*PRN/3/MIRLO/BNC/4/2* PASTOR
33	-PASTOR	69	-WBLL1/KAMB1//PASTOR
34	-HXL 7579/*2BAU	70	-KAMB1*2/KUKUR
35	-TRIDENT	71	-WBU1*2/TUKURU
36	-PBW343		

**Tableau 4:** liste des 120 blés durs

N°	Cultivars	N°	cultivars
1	HEIDER	61	T. POLONICUM ZB//CH 6/CETO
2	MEXICALI (ACSAD65)	62	UVEEYIK 126-61
3	9203118	63	CHANST 2
4	WOLLAROI	64	BELIKH 2
5	TITAN	65	BIDI 17/ KHROUB 76*2
6	KRONOS	66	HAURANI
7	CHACAN	67	920405
8	CAPEITI 8	68	9200314
9	WAHA	69	OUED ZENATI/OM RABI SH
10	ENTE MARIO/CETO	70	SAHEL
11	FG/PALEST, 20C/606//MEXI/3/RABI	71	BIDI 17/ SYRICA
12	SABIL-1	72	LANGDON
13	MRB 5	73	OCCOTILLO
14	MASSARA-01	74	DURBELL
15	REZZAK	75	ARDENTE
16	MRB 17	76	ZB/FG
17	TELSET	77	KEBIR
18	920777	78	SENATORE-CAPELLI
19	SILLIANA	79	T. POLONICUM X ZB
20	TEZ/FRI//WULP	80	CLAIRDOC
21	CANNIZARA	81	AGHTHE
22	CAMILLAROI	82	MOHAMED BEN BACHIR
23	CHEN'S	83	MONT PELLIER
24	AWL 2/BIT	84	HEDBA-03
25	T. POLONICUM ZB//GDO VZ 578/SWAN	85	BIDI-17

26	OMSNINA-1	86	OUED ZENATI
27	CAMADI ABOU 73 N°7510	87	USDA 7317
28	JORDAN COLLECT SEN N°53	88	DJENNAH-KHETIFA
29	JORI C69	89	GUEMGOUM RKHEM
30	SEBOU	90	GLOIRE DE MONT GOFLIER
31	GUERO-1	91	BELIOUNI
32	OM RUFF 2	92	GTA X DUR
33	HOGGAR (VITRON)	93	SIMETO
34	KORIFLA=SHAM-3	94	KUCUK
35	GRANIZO	95	DUKEM-12/2*RASCON-21
36	CHEN 'S'/ALTAR 84	96	PLATA-1/SNM//PLATA-9
37	CHEN 'S'/AUK	97	GIDARA-2
38	TELL 76	98	SOOTY-9/RASCON-37
39	TASSILI (RABI/FG)	99	YAVAROS-79
40	INRAT 69	100	AJAIA-12/F3LOCL (sel.ethio.135)//PLATA-13
41	920616	101	BARBA DE LOBE
42	M1084	102	KARASU
43	BIDI 17/WAHA//BIDI17	103	JORDAN COLLECTION 86
44	DAKI	104	NEODUR
45	DT 869	105	ORJANNE
46	920351	106	OUM RABI-6
47	900453	107	BOUSSELEM
48	CHAHABA 88	108	AHLAL
49	920273	109	CARNAVACA COLORADO
50	JORDAN COLLECT 8 's''N°42	110	D94-567
51	HEDBA-03/T. POLONICUM ZB	111	904 'S'/ LOG 'S'
52	HEDBA-03/GDO VZ 619	112	POGGIO
53	AWL 1/SEL 4	113	V1 CIMMYT
54	COCORIT C 71	114	V2 CIMMYT
55	KYPEROUNDA	115	OFANTO
56	BD1 / 94	116	AMMAR 1
57	OMTEL 5	117	AMMAR-6
58	ROMANOU	118	ACSAD-1103
59	STR/ AA//21563	119	BELTAG/-2
60	ARALDUR	120	ERUFTEL



**Figure 3 :** répartition géographique des variétés de blé dur botaniques collectées en Algérie

**Tableau 5 : variétés et accessions de blés botaniques incluses dans cette étude**

Variety	Genotype identifier <sup>a</sup>
<b>1) Apulicum Koern. Koern. (3)</b>	IG6884, IG6355, IG6356
<b>2) Africanum Koern. Koern. (3)</b>	IG5805, IG5806, IG5808
<b>3) Obscurum Koern. Koern. (3)</b>	IG7752, IG7755, IG7756
<b>4) Algeriense Koern. Koern. (6)</b>	IG6766, IG6775, IG6778, IG6781, IG6782, IG6795
<b>5) Fastuosum (Lag.) Koern. (Lag.) Koern. (6)</b>	IG10228, IG11049, IG11944, IG11945, IG 12202, IG12203 IG22413, IG22414, IG22415, IG22416, IG22417, IG22503, IG22583, IG22629
<b>6) Alexandrinum Koern. Koern. (8)</b>	IG6933, IG6937, IG6998, IG7015, IG7053, IG7054, IG7055, IG7056, IG7056, IG7752, IG7755, IG7756,
<b>7) Melanopus (Alef.) Koern. (11)</b>	IG17559, IG17562, IG17563, IG17564, IG17565, IG17566, IG17567, IG17568, IG17569, IG17570, IG17571, IG17572,
<b>8) Circumflescum Koern. Koern. (14)</b>	IG17574, IG17575; 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, IG14301, IG14302, IG14303, IG14304, IG14305, IG14306, IG14307, IG14308, IG14309; IG14310, IG14311, IG14313, IG14314, IG14315, IG14316, IG14317, IG14318, IG14319, IG14320, IG14321, IG14322, IG14323, IG14324, IG14325, IG14326, IG14328, IG14329, IG14330, IG14331; 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; 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; IG16596, IG16599, IG16600, IG16601, IG16602, IG16603, IG16604, IG16605, IG16606, IG16607, IG16608, IG16609, IG16610, IG16683, IG16684, IG16685, IG16686, IG16687, IG16688, IG16689, IG16691, IG16692, IG16694, IG16695, IG16696, IG16697, IG16698, IG16699, IG16700, IG16701, IG16702, IG16703, IG16704, IG16705, IG16706, IG16707, IG16708, IG16709, IG16714, IG16716, IG16717, IG16718, IG16719, IG16721, IG16722, IG16723, IG16724, IG16725, IG16726, IG16727, IG16730, IG16731, IG16732, IG16733, IG16734, IG16735, IG16736, IG16737, IG16738, IG16739; 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; 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, 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, IG17045, IG17079, IG17086, IG17087, IG17088, IG17089, IG17090, IG17091, IG17093, IG17094, IG17095, IG17058, IG17059, IG17071, IG17072, IG17073, IG17074; 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; IG17316, IG17317, IG17318, IG17319, IG17320, IG17321, IG17322, IG17323, IG17324, IG17325, 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, IG17708, 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, IG17529, IG17531, IG17532, IG17533, IG17534, IG17535, IG17536, IG17537, IG17538, IG17539, IG17540, IG17541, IG17542, IG17543, IG17544, IG17546, IG17547, IG17547, IG17547, IG17548, IG17549, IG17550, IG17551, IG17552, IG17553, IG17556, IG17557, IG17558
<b>9) Affine Koern. Koern. (26)</b>	
<b>10) Leucurum (Alef.) Koern. (Alef) Koern. (28)</b>	
<b>11) Aegyptiacum Koern. Koern.(42)</b>	
<b>12) Valenciae Koerne Koern. Koern. (50)</b>	
<b>13) Murciense Koern. Koern. (58)</b>	
<b>14) Hordeiforme (Host.) Koern. (Host.) Koern. (Host) Koern. (75)</b>	
<b>15) Italicum (Alef.) Koern. (Alef) Koern. (142)</b>	
<b>16) Reichenbachii Koern. Koern.i Koern. (176)</b>	
<b>17) Leucomelan (Alef.) Koern. (Alef) Koern. (206)</b>	

<sup>a</sup> les numeros de référence sont les codes des accessions de la banque de germoplasqm de l'ICARDA

**Tableau 6 : liste des blés apparentés**

variétés ou lignées	pedigree	génération	variétés ou lignées	pedigree	génération
T.polonicum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-34	T.dicoccum3 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-12
T.polonicum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-34	T.dicoccum3 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-12
T.polonicum1 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-30	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-07
T.polonicum1 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-30	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-07
T.polonicum1 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-29	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-07
T.polonicum1 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-29	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-05
T.polonicum9 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-22	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-05
T.polonicum9 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-22	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-04
T.polonicum9 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-21	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-04
T.polonicum9 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-2k	F4-21	T.dicoccum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-04
T.polonicum9 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-21	T.dicoccum x cham1	F7 ble dur appa	F6-10
T.dicoccum3 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-19	T.dicoccum x cham1	F7 ble dur appa	F6-04
T.dicoccum3 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-19	T.dicoccum x cham1	F7 ble dur appa	F6-02
T.dicoccum3 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-14	T.dicoccum x cham1	F7 ble dur appa	F6-01
T.dicoccum3 x mrb5	Mpt-0kb-0kb-0kb-1k	F4-14	T.polonicum1 x cham1	Mpt-0kb-0kb-0kb-3k	F4-34

**Tableau 7 : Liste de la collection des *Aegilops*.**

Constitution génomique	Nom latin	Pays d'origine	Provenance	Longitude	Latitude	Altitude	
Espèces diploïdes	DD	<i>Ae. tauschii</i>	Pakistan	Balochiston	E67 01	N30 40	1,490
		<i>Ae. tauschii</i>	Syrie	Raqqa	E38 45 26	N35 31 22	400
		<i>Ae. tauschii</i>	TKM	Ashkhabad	E58 10	N37 55	340
		<i>Ae. tauschii</i>	Syrie	Aleppo	E38 14 19	N36 53 27	470
		<i>Ae. tauschii</i>	Arménie	Sjunik	E46 11 44	N39 03 10	1.750
		<i>Ae. tauschii</i>	Algérie	Constantine	-	-	-
	MM	<i>Ae. comosa</i> var. <i>comosa</i>	Turquie	Denizli	E40 00	N37 51	180
		<i>Ae. comosa</i> var. <i>comosa</i>	Grèce	Peloponnesus	E22 59	N37 51	-
		<i>Ae. comosa</i> var. <i>comosa</i>	Turquie	Izmir	E27 02	N38 39	-
		<i>Ae. comosa</i> var. <i>heldreichii</i>	Grèce	Epirus	-	-	-
		<i>Ae. comosa</i>	Grèce	Attica	E23 36	N38 23	200
	CC	<i>Ae. caudata</i>	Turquie	Édirme	E26 44	N41 53	240
		<i>Ae. caudata</i>	Liban	-	-	-	-
		<i>Ae. caudata</i>	Syrie	Damascus	E36 01 00	N33 40 55	1.150
		<i>Ae. caudata</i>	Grèce	Thessalia	E22 50	N39 42	140
		<i>Ae. caudate</i>	Grèce	Peloponnesus	E22 02	N37 05	-
		<i>Ae. caudate</i>	Algérie	Constantine	-	-	-
	Espèces tétraploïde	UUCU	<i>Ae. triuncialis</i>	Syrie	Idlib	E36 33 10	N36 13 50
<i>Ae. triuncialis</i>			Pakistan	Balokistan	E68 26	N30 43	1.560
<i>Ae. triuncialis</i>			Turquie	Diyarbakir	E40 00	N38 03	650
<i>Ae. triuncialis</i>			Liban	-	-	-	-
<i>Ae. triuncialis</i>			Maroc	Marrakech	W07 26	N31 30	900
<i>Ae. triuncialis</i>			Algérie	Tiaret	-	-	-
<i>Ae. triuncialis</i>			Algérie	M'sila	-	-	-
<i>Ae. triuncialis</i>			Algérie	Constantine	-	-	-
<i>Ae. triuncialis</i>			Algérie	Souk-Ahras	-	-	-
MMUU		<i>Ae. geniculata</i>	Algérie	Tlemcen	W01 25	N35 06	70
		<i>Ae. geniculata</i>	Libye	Ghryan	E12 53	N32 02	750
		<i>Ae. geniculata</i>	Algérie	Tizi Ouzou	E03 47	N36 30	500
		<i>Ae. geniculata</i>	Liban	Baabda	E35 31	N33 51	-
		<i>Ae. geniculata</i>	Syrie	Damascus	E36 01 00	N33 40 55	1.150
		<i>Ae. geniculata</i>	Algérie	Constantine	-	-	-
		<i>Ae. geniculata</i>	Algérie	Oum El Bouagui	-	-	-
		<i>Ae. geniculata</i>	Algérie	Tiaret	-	-	-
		<i>Ae. geniculata</i>	Algérie	Medea	-	-	-
DDNN		<i>Ae. ventricosa</i>	Maroc	Oujda	W02 25	N34 51	1.160
		<i>Ae. ventricosa</i>	Egypte	Marsa Matruh	E27 14	N31 17	20
		<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie	Medea	E03 48	N34 51	1.190
		<i>Ae. ventricosa</i>	Libye	Al Marj	E20 54	N32 33	320
		<i>Ae. ventricosa</i>	Maroc	Fes	W04 52	N33 41	1.390
		<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie	Setif	-	-	-
		<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie	Souk-Ahras	-	-	-
		<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie	Constantine	-	-	-
		<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie	Tiaret	-	-	-
UUMM ou UUMMNN		<i>Ae. neglecta</i>	Portugal	Setubal	W09 02	N38 28	90
		<i>Ae. neglecta</i>	Turquie	Diyarbakir	E40 00	N38 03	650
		<i>Ae. neglecta</i>	Maroc	Meknes	W05 43	N34 47	300
	<i>Ae. neglecta</i>	Bulgarie	Sofiya	E23 17	N41 27	200	
	<i>Ae. neglecta</i>	Grèce	Peloponnesus	E22 18	N36 55	-	
	<i>Ae. neglecta</i>	Algérie	Khenchla	-	-	-	

## 2. METHODES D'ANALYSE

---

### 2.1. La technique SDS-PAGE pour l'évaluation de la variabilité des gluténines

#### 2.1.1. Extraction des protéines

Les protéines de réserve sont extraites à partir de la farine d'un grain entier, selon la méthode de Singh *et al.*, (1991), adaptée de la méthode de Marchyllo *et al.*, (1989). Cette méthode se base sur l'extraction séquentielle et nécessite l'utilisation de trois solutions de base: Solution (A) 50 % v/v 1 propan-1-ol ; solution (B) 50 % v/v propanol-1-ol, 0,08 M Tris Hcl pH 8,8 et solution (C) la solution tampon 2 % p / v SDS, 40 % p/v 2 glycérol, 0,02% p/v bleu de bromophénol 0,08 de Tris Hcl pH=8.

Les gliadines sont extraites en premier dans 1 ml de la solution A, pendant 30 minutes à 60°C, avec deux agitations intermédiaires toutes les dix minutes, suivie d'une centrifugation pendant 1 minute. Le surnagent est ensuite récupéré dans un autre eppendorf et mis à l'évaporation toute une nuit à 65°C, on obtient ainsi la fraction gliadine. D'un autre côté le résidu est lavé dans 0,5ml de la solution A, à 65°C pendant 30 minutes, cette fois sans vortex intermédiaire, puis centrifugé à 10000 g pendant 1 minute, le surnagent est éliminé par aspiration. Et pour s'assurer de l'élimination complète des gliadines, et afin d'éviter toute contamination des préparations ultérieures des gluténines, on réintroduit au résidu, pour la troisième fois 0,5 ml de la solution A, on vortex, on centrifuge à 10000 g pendant 5 minutes, et le surnagent contenant le reste des gliadines est éliminé par aspiration. Le résidu obtenu forme le matériel de départ de la procédure d'extraction des gluténines (annexe 1). Les gluténines sont extraites, en rajoutant au résidu 0,1ml de la solution B et d'un agent réducteur, le dithiothreitol (DTT) à 1 %. Après incubation et centrifugation, on rajoute encore de la solution A et un agent alkylant, le 4- vinylpyridine. Le mélange est incubé puis centrifugé. Et un aliquote (0.1 ml) de surnagent est transféré à un autre eppendorf contenant de la solution C, le mélange est bien agité et ensuite incubé pour une compléxation du SDS avec le polypeptide des gluténines réduites *et alkylées*, et après une centrifugation les échantillons sont prêts pour une révélation des SG-HPM et SG-FPM par SDS-PAGE.

#### 2.1.2. Electrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE

Toutes les techniques d'électrophorèse sont basées sur le principe de la mobilité séquentielle des molécules protéiques dans un support soumis à un courant électrique. Cette mobilité est fonction de : (1) La charge électrostatique fournie par les cinq acides aminés acides ou

basiques ; (2) La dimension et la forme des protéines ; (3) L'intensité du champ électrique (tension aux électrodes et conductibilité de support) ; (4) La taille des mailles du support ; (5) La température de l'électrolyte.

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemli (1970) modifiée par Payne *et al.*, (1979) et Singh *et al.*, (1991). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, en présence d'un détergent ionisé, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).

En effet le DDT dénature les protéines en rompant les ponts disulfures, et le SDS détruisant les liaisons faibles. Ceci aboutit à la formation d'un complexe SDS-protéines dénaturé avec une charge négative qui masque la charge nette intrinsèque des protéines et annule ainsi la différence de migration due à la charge électrique. Il permet donc une séparation selon la taille, la conformation et la masse moléculaire. La vitesse de migration des protéines dépend surtout de la taille des mailles du gel et de la température de l'électrolyte. Le protocole est détaillé en annexe 2.

### 2.1.3. Lecture génétique des diagrammes et analyse statistique

Elle consiste à établir une nomenclature génétique des SG-HPM et SG-FPM pour chaque génotype. Pour les Aegilops, une typologie des SG-FPM (zone B) a été proposée pour chaque espèce. Pour ce faire les mobilités relatives des différents composants révélés par électrophorèse sont calculées.

La mobilité relative de chaque bande est calculée, à partir de la mobilité réelle (la distance parcourue par la bande entre le point d'application de l'échantillon et la position de la bande correspondante dans le gel) et à l'aide d'une bande témoin commune à toutes les accessions analysées. Nous avons utilisé la bande une du kit comme témoin, à laquelle, on a convenu d'attribuer la mobilité relative 50. La mobilité relative de chaque bande est déterminée par rapport à la bande 50, par l'application de la formule :

$$\text{Mobilité relative (Mr)} = \frac{\text{Mobilité en mm d'une bande particulière}}{\text{Mobilité en mm de la bande de référence}} \times 50$$

Les fréquences des allèles codant pour les gluténines sont calculées au niveau de chaque locus de l'ensemble des génotypes analysés. La diversité génétique a été évaluée pour la collection de blés botaniques, en calculant l'indice de diversité (Weir, 1996), par l'utilisation de la formule:  $D_i = 1 - \sum p_{ij}^2$ , où  $p_i$  est la proportion de l'allèle  $j^{th}$  au niveau du locus  $i^{th}$ . La distance de Roger (Roger, 1972) est calculée en fonction de la matrice des fréquences alléliques. Les dendrogrammes sont confectionnés en utilisant le logiciel BIOSTAT-1.

les allèles appartenant aux génomes A, B et D, codant pour les sous unités gluténines de haut poids moléculaire sont identifiés en utilisant la nomenclature de Payne et Lawrence (1983) complétée par Branlard *et al.*, (1989), Pour la nomenclature allélique des SG-HPM des espèces : *Ae.umbellulata*, *Ae. comosa* et *Ae.caudata*, nous avons opté pour celle proposée par Rodriguez-Quijano *et al.*, (2001). Les allèles codant pour les sous unités gluténines de faible poids moléculaire sont identifiés en utilisant la nomenclature de Nieto-Taladriz *et al.*,(1997) pour le blé dur et celle de Branlard pour le blé tendre. Les nouvelles sous unités et leurs allèles codant sont désignées selon McIntosh *et al.*, (2008).

## **2.2. Détermination du nombre de groupements thiols du nouvel allèle trouvé *Glu-B1e1* codant pour les sous unités 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub>**

Les accessions Leucurum (Alef.) Koern. (Alef.) Koern. IG-14303 et IG-14326 qui contiennent le nouvel allèle détecté nommé *Glu-B1e1* codant pour les sous unités 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub>, sont analysées pour déterminer le nombre de groupements thiols. Les gluténines totales sont réduites à partir de 200 mg de farine en utilisant la technique de Singh *et al.*,(1991). Les SG-HPM sont ensuite précipitées selon la methodede Sutton (1991). L'alkylation des SG-HPMest accomplie en utilisant deux alkylants différents (4- vinylpyridineet Iodoacetic Acid) en créant un gradient de différentes concentrations, selon le protocole de Morel et Bonicel (1996). Les SG-HPM alkylées sont ensuite séparées par la technique électrophorétique Acid-urea-PAGE décrite par Morel (1994), tout en modifiant la concentration du gel à 13%. Pour les protéines qui ont x résidus cystéines, un nombre de bandes de  $x+1$  est obtenu à cause des différences de charge entre le 4-VP (charge nulle) et l'IAA (charge négative). Le protocole détaillé est présenté en Annexe 3.

## **2.3. Méthodes utilisées pour les comparaisons de l'expression protéique en fonction de types de culture**

### **2.3.1. Comparaison des teneurs en protéines des grains**

La teneur en protéines déterminée par la méthode de Dumas permettant une combustion complète sous oxygène de la matière organique et dosage de l'azote en % de la matière sèche. On utilise le coefficient 5.7 pour obtenir la teneur en protéines dans le grain.

## **2.3.2. Comparaisons des profils électrophorétiques monodimensionnels et bidimensionnels des gluténines, gliadines et des albumines-globulines**

### **a. Extraction des protéines**

L'extraction des gliadines a été réalisée sur mouture entière de 10 grains appartenant à une classe de taille donnée avec une solution éthanolique à 70% selon le protocole de l'INRA de Clermont-Ferrand (Annexe 4).

L'extraction des gluténines, comme il est décrit dans la première partie de cette étude, est réalisée selon la méthode séquentielle de Singh *et al.*, (1991) après extraction des albumines/globulines et gliadines également sur une mouture complète de 10 grains (annexe 1).

Pour les électrophorèses bidimensionnelles (E2D), plusieurs méthodes d'extraction existent selon que l'on souhaite extraire les protéines totales ou seulement une famille de protéines. Les protéines totales et les albumines globulines ont été mises en solution dans un tampon qui se compose:

- de 3[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), détergent zwitterionique (charge globale nulle) qui facilite la solubilisation des protéines et rompt les liaisons peptidiques non spécifiques, en préservant leur forme native et en conservant leurs propriétés isoélectriques,
- d'urée (7 M), détergent neutre, utilisée à haute molarité pour dénaturer l'échantillon protéique, solubiliser les protéines, inhiber les protéases et baisser l'électroendosmose qui perturbe la migration des protéines. Les liaisons faibles (hydrogènes et hydrophobes) sont éliminées lorsque la molarité est supérieure à 6 et l'activité enzymatique de certaines protéines est inactivée, empêchant ainsi toute modification de la protéine,
- de dithiothreitol (DDT), agent réducteur, qui maintient la protéine dans un état réduit. Dans le cas de protéines basiques, l'utilisation de l'agent réducteur Destreak (GE Healthcare) permet d'améliorer la séparation en éliminant les trainées horizontales.
- de thiourée, qui augmente la solubilité des protéines, notamment celle des protéines membranaires,
- d'ampholytes (IpG buffer), qui piègent les ions isocyanates (produits de décomposition de l'urée), ceci pour éviter la carbamylation des polypeptides. Leur rôle est aussi d'assurer une conductivité uniforme durant la focalisation, sans altérer le gradient de pH présent sur le gel d'IEF,
- de 4-vinylpyridine essentielle à l'alkylation des protéines (ajoutée après l'étape de réduction).

- des inhibiteurs de protéases afin de maintenir l'intégrité des protéines

Les protocoles d'extraction des protéines totales et des albumines-globulines sont donnés en détails en annexes 5 et 6 respectivement.

#### **b. L'estimation de la quantité de protéines à déposer**

La comparaison de l'expression des protéines du grain entre deux modes de culture nécessite un dosage préalable des protéines après leur extraction. Ceci permet de déterminer précisément la quantité déposée sur chaque piste de gel (quantité constante) ou sur les bandelettes d'IEF ; exigence requise pour les comparaisons par analyse d'image. Dans cette perspective, la méthode de dosage des protéines par le colorant Bradford a été mise en œuvre (Annexe 7). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon. Le dosage des échantillons à analyser se fait à partir d'un étalonnage d'une solution de BSA (Bovin Serum Albumine) de concentration connue et préparée simultanément dans les mêmes conditions.

#### **c. Electrophorèses monodimensionnelles**

Dans notre travail deux techniques ont été utilisées : SDS-PAGE pour séparer les gluténines et les albumines/globulines, cette technique est la même utilisée dans la première partie (Singh *et al.*, 1991) et Acid-PAGE pour la séparation des gliadines. Les protocoles sont détaillés en annexes 2 et 4 respectivement.

#### **d. Analyse d'image et comparaisons statistiques**

Les profils monodimensionnels des trois familles (albumines-globulines, gliadines et gluténines) ont été analysés à l'aide du logiciel Quantity One (BioRad). Les contours de chaque bande d'un profil donné sont délimités et les données sont exprimées en % des protéines de la famille analysée ou en % de protéines par grain. Pour les gluténines ces expressions ont été obtenues également sur les SG-HPM et SG-FPM. Toutes les analyses statistiques des quantités de protéines ont été obtenues sur 2 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques (soit 4 profils électrophorétiques).

## **e. Analyse protéomique**

### **- Electrophorèse bidimensionnelle (Annexe 8).**

Dans cette partie, nous donnons les principes des principales étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle.

#### **La première dimension : l'isoélectrofocalisation (IEF)**

L'IEF sépare les protéines selon leur pI, pH pour lequel la protéine considérée possède une charge nette nulle. Cette séparation se fait dans un gradient de pH formé par migration, sous l'effet d'un champ électrique, de substances amphotères ou immobilines, dans un gel de polyacrylamide. Il s'agit de gels très fins (~2 mm) composés d'acrylamide et d'immobilines, précoulés sur gel bond (feuilles de polyester) et déshydratés. Le tout formant ce que l'on appelle un strip ou bandelette.

Avant l'IEF, il faut procéder à la réhydratation passive (sans courant) durant toute la nuit à température ambiante des strips par une solution contenant Urée 7M, Thiourée 2M, Chaps 4%, IpG buffer pH 3-11 1% et Destreak (12µl/ml). L'extrait protéique à analyser préparé dans cette même solution avec du DTT 70 mM à la place du Destreak de manière à avoir environ 100 µg de protéines (estimés par le dosage) dans un volume total de 100 µL est, quant à lui, déposé via une cupule. Cette technique est en effet préconisée lors de l'utilisation de strip basique (au-delà de pH 10 afin d'optimiser la séparation des protéines basiques et d'éviter les trainées dans cette zone).

Après l'étape de réhydratation, la migration peut avoir lieu. Elle est effectuée dans une cuve d'électrophorèse Ipphor (Ge, Healthcare) selon le protocole décrit en annexe. Les conditions de focalisation utilisées sont :

Extraits protéines de réserve, 100µg de protéines/strip, strips 3-11, 18 cm, 60 kVh

Extraits Albumines-globulines, 150µg protéines/strip, strips 3-11, 24 cm, 90 kVh

L'équilibration des bandelettes « strips » après isoélectrofocalisation

Après l'étape de première migration, les gels sont mis en contact avec une solution d'équilibration dans le but d'éliminer certains constituants, dont les ampholytes, et de charger les protéines de SDS. Le premier bain est effectué dans une solution contenant Urée 6 M, Tris-HCL 50 mM pH 8.8, glycerol 30%, DTT 1% et SDS 2%, pour saturer le gel en SDS et en agent réducteur (DTT). Le SDS se complexe aux protéines et leur donne une charge négative utile pour la réalisation de la deuxième dimension. L'urée présente également dans cette solution, en association avec le glycérol, intervient dans l'augmentation de la viscosité du

tampon. Le SDS et l'urée combinée facilitent l'élution des protéines durant la deuxième dimension.

Il est nécessaire, ensuite, d'effectuer un deuxième bain avec de l'iodoacétamide (2.5%, p/v) à la place du DTT, qui a pour rôle d'alkyler les protéines et le DTT résiduel ceci pour minimiser les traînées verticales au cours de l'électrophorèse. Une fois l'équilibration terminée, les strips sont placés à  $-80^{\circ}\text{C}$  sous emballage cellophane.

### **La deuxième dimension: SDS-PAGE**

Cette électrophorèse en gel de polyacrylamide avec présence de SDS, assure la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire (PM). Le SDS se fixe aux protéines pour les transformer en polyanions. De ce fait, les complexes SDS-polypeptides migrent selon leur PM et non plus selon leur charge électrique. La concentration en polyacrylamide dans le gel varie selon la catégorie de protéines que l'on souhaite séparer : gels à 12 % (T : 12,5%, C : 0,97%) pour les protéines de réserve, gels à 14% (T : 14%, C : 2.1%) pour les albumines-globulines.

### **La mise en évidence des protéines**

Après l'électrophorèse en deuxième dimension, les gels sont placés dans des solutions qui permettront de révéler les protéines sur le gel.

Les gels sont tout d'abord mis au contact d'une solution de fixation au moins 1 heure afin de limiter la diffusion des protéines et d'enlever en partie les composés introduits lors de la préparation de l'échantillon, tels que les réducteurs, les ampholytes et détergents. Ceux-ci donnent une coloration excessive du fond du gel et des traînées horizontales peuvent apparaître. Ensuite les gels sont immergés dans la solution de coloration à base de bleu de Coomassie Colloïdal (Coomassie Brilliant Blue G250). Les gels sont laissés durant toute la nuit dans la solution de coloration au bleu de Coomassie sous agitation lente. Les gels sont ensuite rincés pendant plusieurs heures à l'eau toujours sous agitation lente. Ils peuvent alors être mémorisés par l'intermédiaire d'un scanner GS 800 (Biorad) en vue de l'analyse d'image ultérieure. Les gels sont conservés dans 5% d'acide acétique pour réaliser ensuite le prélèvement de spots d'intérêt pour l'analyse en spectrométrie de masse.

### **L'analyse d'image**

Cette étude a pour objectif de mettre en évidence les variations qualitatives (présence/absence de taches protéiques) et quantitatives (intensité des spots pouvant être reliée à la concentration relative des protéines) de polypeptides de la variété de blé Ataro en fonction du mode de

culture et/ou de la taille des grains. L'analyse de chaque gel est réalisée avec le logiciel Samespots v 3.2 (NonLinear Dynamics).

La première étape, après avoir sélectionné les gels à analyser et le gel de référence, est de faire l'alignement.

La deuxième étape est destinée à la vérification de l'appariement des gels 2 à 2. Une fois *cet* alignement validé, une détection automatique des spots présents est appliquée à l'ensemble des gels. Le logiciel donne alors des informations sur chacun des groupes selon des paramètres quantitatifs (volume) et permet de comparer les protéines selon leur expression.

Dans le cadre de cette étude, l'analyse d'images a été faite pour l'ensemble des gels obtenus pour la variété Ataro pour les protéines de réserve et pour les albumines-globulines. Pour chacune des conditions (conventionnel ou biologique), l'analyse a été réalisée à partir de 4 gels (2 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques). Ces gels effectués dans les mêmes conditions correspondent à des répétitions qui sont nécessaires par la suite pour l'analyse statistique.

### **L'analyse statistique**

L'étude statistique a été conduite dans le but de s'assurer qu'un changement au niveau de l'expression protéique soit bien lié à l'action d'un effecteur particulier, qui est dans notre étude l'influence du mode de culture. L'analyse statistique a été réalisée avec le module statistique associé au logiciel d'analyse d'images

Le volume des spots est normalisé et standardisé par le logiciel (en prenant en compte le volume de l'ensemble des spots présents sur le gel). Cette procédure de normalisation et standardisation permet de corriger d'éventuelles variations entre gels (coloration ou numérisation). Une analyse qualitative et quantitative des variations est alors possible. Les tests statistiques sont réalisés sur les valeurs calculées par le logiciel. Les critères retenus pour considérer qu'une variation est significative sont: la p value de l'ANOVA ( $<0.05$ ), au moins un ratio de 1.7 entre les valeurs de volumes normalisés et une q value  $<0.05$  pour éliminer les faux positifs. Une deuxième analyse statistique a été réalisée dans le cas d'une expression de la teneur en protéines par grain en utilisant la procédure GLM (General Linear Models) du logiciel SAS (Statistical Analysis System) dans le but de comparer les valeurs moyennes avec un seuil de probabilité d'erreur de 5 %. Au cours de cette étude, l'analyse statistique n'a porté que sur les données obtenues par le logiciel d'analyse d'image concernant les valeurs de volume normalisé. Ce paramètre apparaît comme le plus représentatif de l'ensemble du gel puisqu'il ramène le volume d'un spot à la totalité des volumes des spots du gel.

### **- L'analyse des protéines par spectrométrie de masse**

L'identification des protéines demeure possible par la spectrométrie de masse. Cette technique est basée sur l'estimation très précise des masses moléculaires des peptides obtenus après digestion par une protéase. Afin de procéder à l'identification des protéines qui se sont révélées significativement différentes entre les 2 modes de culture, il faut tout d'abord prélever sur les gels les spots à identifier. Ces spots sont ensuite lavés dans le but de les décolorer dans diverses solutions de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  et de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Les morceaux de gel sont séchés sous vide pendant 30 à 45 minutes. Après réhydratation dans 15  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  à 50 mM contenant 150 ng de trypsine modifiée (Promega), les échantillons sont incubés toute la nuit (16 h) à 37° C. Le lendemain après l'extraction des peptides avec de l'acétonitrile, l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Voyager DE-Pro, Perspective BioSystems) est possible. L'extrait est déposé avec une matrice  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinamique à 5 mg/mL dans de l'acétonitrile (50%) et de l'acide trifluoroacétique (0.1%). Les spectres de masse sont été obtenus en mode réflectron (mode positif). Une calibration externe est effectuée dans un premier temps en utilisant une gamme de masses comprises entre 900 et 3 000 Da. Une calibration interne est obtenue à l'aide des masses des peptides de la trypsine. La gamme de masses étudiées s'étend de 500 à 4 000 Da.

### **- L'identification des protéines à partir des bases de données**

Une protéine séparée sur gel peut être identifiée par comparaison avec les protéines répertoriées dans les bases de données. Ceci permet de caractériser la protéine en lui attachant une ou des fonctions, en l'associant à une famille de protéines, en l'incluant dans une chaîne de réaction. Les masses de peptides obtenues par spectrométrie de masse ou empreintes peptidiques massiques sont utilisées pour interroger la base NCBI par l'intermédiaire du logiciel Mascot v2.2 (Matrix Science). Les critères d'interrogation sont les suivants : taxonomie plantes vertes (viridiplantae), tolérance de masse 30 ppm, un «miss cleavage » et des modifications possibles des cystéines et des méthionines. Les protéines, correspondant au mieux au profil des masses peptidiques sont classées en fonction de leur probabilité de similarité et du résultat de niveau de confiance (score). De bonnes protéines cétidates doivent posséder un résultat de niveau de confiance élevé (score correspondant à  $p < 0.05$ ), un nombre de peptides suffisants ( $>4$ ), une couverture de séquence suffisante ( $>20\%$ ) et une bonne correspondance en terme de pI/PM.

---

# **CHAPITRE 3 :**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

## PREMIERE PARTIE

### EVALUATION DE LA VARIABILITE GENETIQUE DES GLUTENINES DES BLES ORIGINAIRES ET/OU CULTIVES EN ALGERIE ET DE LEURS APPARENTES

---

Dans cette première partie, nous cherchons à :

1. Évaluer la diversité des ressources génétiques des blés collectés en Algérie par l'étude du polymorphisme des SG- HPM et des SG-FPM
2. Mettre en évidence des allèles d'intérêt qui pourraient éventuellement rentrer dans les programmes de sélection pour la qualité

C'est la technique décrite par Singh *et al.*, (1991) qui a été utilisée pour estimer la diversité des sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire (SG-HPM et SG-FPM). Cette méthode basée sur l'extraction séquentielle des gluténines, suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE à pH 8,8 avec T=12.8%, nous a permis d'obtenir des profils très clairs, ainsi trois groupes de bandes avec des mobilités différentes sont distingués (lente, intermédiaire et rapide).

En effet, l'obtention des bandes bien distinctes est le résultat de l'étape d'alkylation des protéines par le 4-vinyl pyridine. Cette alkylation empêche les chaînes peptidiques de se relier et de reformer la protéine native.

En se basant sur la mobilité et la preuve génétique, les bandes lentes correspondent aux sous unités gluténines HPM (zone A) tandis que les bandes intermédiaires et rapides correspondent aux sous unités gluténines FPM (zone B et C).

Pour la lecture des diagrammes, nous avons procédé par zone. Nous nous sommes intéressés aux sous unités gluténines de HPM (zone A) et de FPM de la zone B qui renferment la majorité des gluténines et représentent une diversité importante.

D'après Autran et Boudret (1975), la lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité relative de chacune des bandes présentées, pour tenir compte des variations de mobilités observées entre les gels.

# 1. VARIABILITE DES SG-HPM ET DES SG-FPM DES BLES CULTIVES EN ALGERIE

---

## 1.1. Variabilité trouvée dans les cultivars de blé tendre

Chez les espèces hexaploïdes, trois génomes contribuent à l'expression des sous unités gluténines de haut et de faible poids moléculaire, c'est pour cela la variabilité détectée chez ces espèces est beaucoup plus importante que celle trouvée chez les espèces tétraploïdes (2 génomes) et diploïdes (un seul génome) avec quelques exceptions.

L'analyse électrophorétique des gluténines par la technique SDS-PAGE a donné des gels de bonne qualité avec une séparation des bandes très satisfaisante. La Figure 4 montre les profils de quelques variétés analysées.

### 1.1.1. Variabilité génétique des SG-HPM

Aux loci Glu-1, codant pour les SG-HPM, un total de 14 variants alléliques est détecté. Trois, 6 et 5 allèles sont identifiés aux Glu-A1, Glu-B1, et Glu-D1 respectivement. La composition et les fréquences alléliques sont présentées aux tableaux 8 et 9 respectivement.

Au locus Glu-A1, l'allèle Glu-A1b codant pour la sous unité 2\* est le plus répandu, on le trouve chez 39 cultivars (soit une fréquence de 54.93%). Vient en deuxième position, l'allèle Glu-A1a (sous unité 1) avec une fréquence de 38.03%. Quant à l'allèle Glu-A1c (allèle nul), il est faiblement exprimé dans cette collection (7.04%).

Le locus Glu-B1 présente une importante variation allélique avec un total de 6 allèles identifiés. Les allèles Glu-B1c (codant pour 7+9) et Glu-B1i (codant pour 17-18) sont les plus fréquents (trouvés dans 40.84% et 39.43% d'accessions respectivement). Ils sont suivis par l'allèle Glu-B1b (codant pour 7+8) trouvé dans 14.08% de la collection. Les trois autres allèles à savoir: Glu-B1f (13+16), Glu-B1a (7) et Glu-B1e (20x-20y), sont considérés comme rares, chacun d'entre eux est trouvé seulement dans 2, 1, 1 accessions respectivement.

Au locus Glu-D1, nous avons dénombré cinq formes alléliques : Glu-D1a (2-12), Glu-D1b (3-12), Glu-D1d (5-10), Glu-D1h (10) et Glu-D1m (11). Les deux allèles les plus fréquents sont Glu-D1d et Glu-D1a avec 54.93% et 38.03% respectivement. Il a été démontré que ces allèles sont corrélés avec une bonne qualité technologique (Payne *et al.*, 1984). Les trois autres allèles (Glu-D1b, Glu-D1h et Glu-D1m) sont beaucoup moins fréquents (2.81%, 2.81% et 1.41% respectivement) et sont considérés comme rares (Caballerro *et al.*, 2004).

Ce résultat se concorde avec celui trouvé par Xueyan Shan *et al.*, (2007). En analysant une collection composée de 111 blés tendres d'hiver, ces auteurs ont trouvé qu'au locus Glu-A, l'allèle Glu-A1b est le plus fréquent (76.1%) suivi par les allèles Glu-A1a et Glu-A1c (21.2% et 2.7% respectivement), et au locus Glu-B1, les allèles Glu-B1c (7+9) et Glu-B1b (7+8) sont les plus fréquents (47.7% et 33.3% respectivement), suivis par les allèles Glu-B1e (20x+20y), Glu-B1i (17+18) et Glu-B1w (6\*+8\*) avec les fréquences 7.7%, 6.3% et 5% respectivement. Ces mêmes auteurs ont trouvé qu'au locus Glu-D1, 80.6% de la collection est caractérisé par l'allèle Glu-D1d (5+10), 11.3% par l'allèle Glu-D1a (2+12), 7.2% par l'allèle Glu-D1b (3+12), et enfin 0.9% par l'allèle Glu-D1e (2+10).

La diversité des SG-HPM dans les variétés de blé tendre décrite ici est similaire à celle trouvée dans de nombreux germoplasm mondiaux. La fréquence élevée de l'allèle nul au locus Glu-A1 est confirmée par de nombreuses données précédentes (Payne et Lawrence, 1983 ; Branlard et Le Blanc 1985 ; Hamer *et al.*, 1992).

Plusieurs analyses effectuées sur des germoplasms mondiaux de blé tendre cultivé, révèlent que les allèles Glu-B1c, Glu-B1b et Glu-B1i sont les plus fréquents, ce qui se concorde parfaitement à nos résultats. Par contre, l'allèle Glu-B1d codant pour la sous unité 6+8 qui est aussi décrit comme très commun (Payne et Lawrence, 1983, Lawrence, 1986, Igrejas *et al.*, 1999), se trouve complètement absent dans notre collection.

Payne *et al.*, (1984) ont rapporté que les sous unités 17-18, 7-8 et 13-16 sont associées à une bonne qualité boulangère et technologique.

### **1.1.2. Variabilité génétique des SG-FPM**

La composition et les fréquences des variants alléliques aux loci Glu-3 et Glu-2 sont présentées dans les tableaux 8 et 9 respectivement.

Notre collection a montré une variabilité considérable des sous unités gluténines de faible poids moléculaire. Un ensemble de 16 allèles sont détectés aux différents loci.

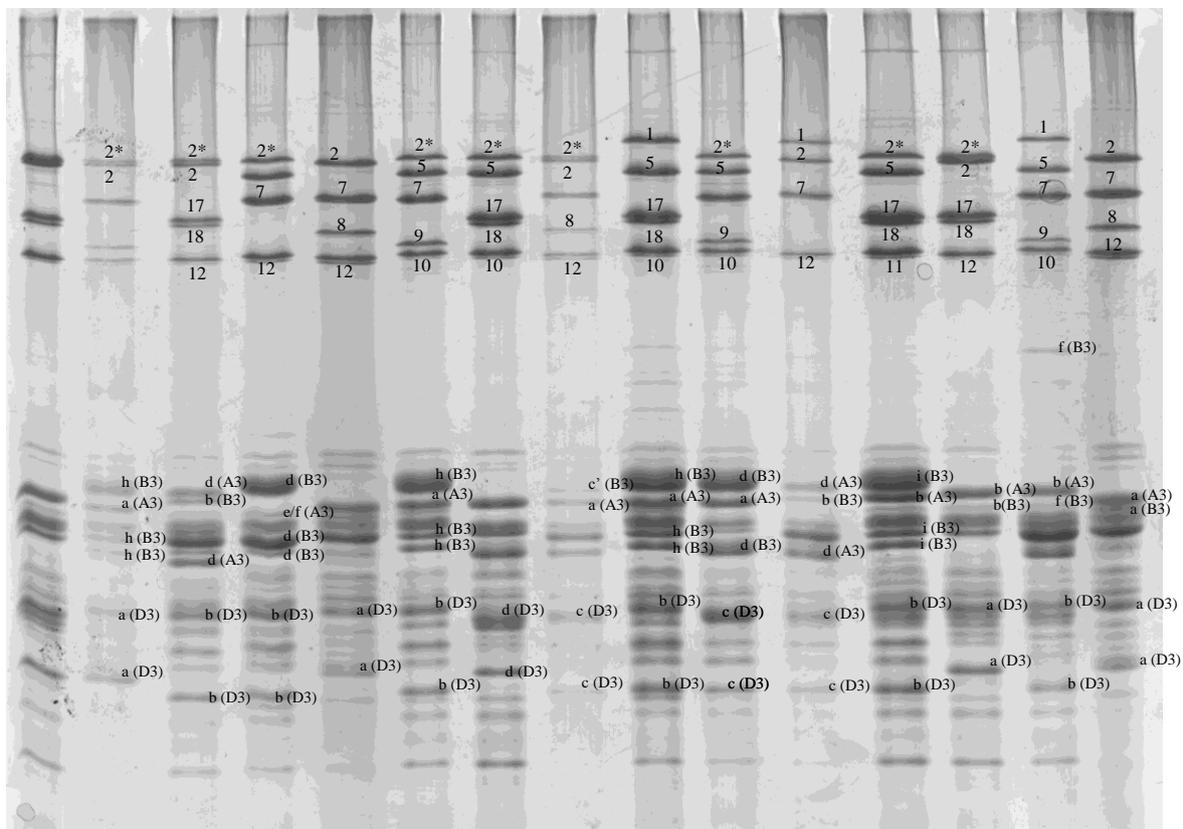
Quatre allèles sont dénombrés au locus Glu-A3 où le plus fréquent est l'allèle a (70,42 %) suivi par les allèles b (14,08 %), e/f (8,4 %) et d (7,04 %).

Le locus Glu-B3 est le plus polymorphe. Nous avons pu dénombrer un ensemble de 9 allèles. Plus de 70.41% des variétés étudiées possèdent les trois allèles Glu-B3b, Glu-B3h et Glu-B3j. Les 6 autres allèles (Glu-B3a, Glu-B3b', Glu-B3d, Glu-B3f, Glu-B3g et Glu-B3i) sont très faiblement exprimés dans cette collection (à titre d'exemple, les allèles a et g sont présents uniquement dans 2.8% de la collection).

Au Glu-D3, 3 allèles sont identifiés. L'allèle le plus fréquent est le Glu-D3b (87.32%) suivi par les allèles Glu-D3c (9.85%) et Glu-D3d (2.81%).

Nos résultats se concordent à moitié à ceux trouvés dans la collection de blés tendres cultivés au Portugal (Iglesias *et al.*, 1999). Dans les deux collections, les allèles GluA3a Glu-B3b et Glu-B3j sont très fréquents. Par contre, les allèles Glu-A3d et Glu-A3g, Glu-D3a sont fréquents dans les blés tendres du Portugal alors qu'il sont complètement absents des blés cultivés en Algérie.

Selon Jackson *et al.*, (1996), de nombreux germoplasms de pays européens sont caractérisés par l'abondance des allèles Glu-A3a ou Glu-A3d et Glu-D3a ou Glu-D3c aux loci Glu-3 positionnés sur les bras courts des chromosomes 1D et 1A. Dans les cultivars d'Algérie, comme leurs analogues des germoplasms d'Europe, les allèles Glu-A3a et Glu-D3a sont abondants, contrairement aux Glu-A3d et Glu-D3c qui sont complètement absents.



**Figure 4 :** Electrophorogrammes des SG-HPM et SG-FPM de quelques variétés de blé tendre cultivé en Algérie :1. PBW65/2\*PASTOR ; 2. Témoin : Démocrat ; 3. CHAM-4 4. BOW/PRL//BUC/3/WH576 5. Témoin : Chinesse Spring ; 6. CHIL/PRL- ; 7. WEAVER/PRINIA ; 8. Témoin : Courtout ; 9. WBL1/KAMB1//PASTOR ; 10. MILAN/587230//BABAX ; 11. Témoin : Copain ; 12. SONALIKA ; 13. BL 1724 ; 14. FILIN/2\*PASTOR ; 15. Témoin : Chinesse Spring.

**Tableau 8 :** composition allélique aux loci Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1 (codant pour les SG-HPM) et GluA3, Glu-B3, Glu-D3 (codant pour les SG-FPM) des 71 variétés de blé tendre cultivées en Algérie

Cultivars	SG-HPM			SG-FPM		
	GluA1	Glu-B1	Glu-D1	GluA3	Glu-B3	Glu-D3
1- HIDHAB (HD1220)	a	i	a	b	h	b
2-MAHON DEMIAS	b	e	a	e/f	d	c
3-ANZA	c	b	a	a	b	b
4-ARZ	b	b	a	e/f	j	c
5-AIN ABID (AS)	a	b	a	a	a	b
6-ZIAD	a	c	d	a	j	b
7-FLORENCE AURORE	b	c	d	a	b	b
8-SAHEL	b	b	d	a	b	b
9-GIZA 163	a	i	a	b	j	b
10-GIZA 164	a	c	d	a	j	b
11-WH542	b	c	d	a	j	b
12-INQILAB 91	b	i	a	a	b	b
13-SAKHA69	b	f	d	e/f	j	c
14-TUI	a	c	b	a	i	b
15-SAGITARIO	a	c	b	a	b	b
16-IRENA	b	c	d	a	j	b
17-SUPER SERI # 2	a	c	d	a	i	b
18-JAGGER	a	i	d	a	i	b
19-BAVIACORA-M92	b	c	d	a	i	b
20-BACANORA	b	c	d	a	j	b
21-PUNJAB,96	b	b	d	a	b	b
22-PINZON	b	b	h	a	b	d
23-SULTAN,95	c	i	a	a	b	b
24-CHAM-6	a	c	a	a	b	b
25-SUPER SERI # 1	a	i	a	d	b'	b
26-MEXIPAK	b	i	a	a	b	b
27-CHAM-4	b	i	a	d	b'	b
28-NESSER TALL	b	c	a	a	i	d
29-SONALIKA	b	i	d	a	h	b
30-PAVON TALL	b	i	d	a	h	b
31-CHIL/PRL	b	c	d	a	h	b
-NESSER DWARF	b	b	a	a	b	b
33-PASTOR	a	i	d	a	b	b
34-HXL 7579/*2BAU	c	c	a	e/f	h	c
35-TRIDENT	a	c	d	d	d	b
36-PBW343	a	a	h	a	j	b
37-DHARWAR DRY / NESSER	c	b	a	e/f	g	b
38-PASTOR//SITE/MO/3/CHEN/...	a	b	d	a	h	b
39-CHEN/ <i>Ae. squarrosa</i> (tous)//BCN/3/BAV92	b	c	m	a	h	b
40-PASTOR/BAV92	a	i	d	a	b	b
41-IRENA/BABAX//PASTOR	b	i	d	a	h	b
42-CROC-1/ <i>Ae. Squarrosa</i> (224)//OPATA/3/ PASTOR	a	i	a	a	b	b
43-GEN*2//BUC/FLK/3/2*PASTOR	a	i	d	a	b	b
44-FILIN/2*PASTOR	a	c	d	d	b'	b
45-VEE/M1/2*TU1/3/2*PASTOR	a	i	d	a	b	b
46-ATTILA*2//CHIL/BUC	a	i	d	a	b	b
47-PBW65/2*PASTOR	b	i	a	b	j	b
48-BL 1724	b	i	a	b	j	b
49-WEAVER/PRINIA	b	i	d	b	b	c
50-BOW/PRL//BUC/3/WH576	b	a	d	a	h	b
51-PRL/SARA//TSI/VEE # 5/3/DUCULA	b	c	a	b	f	b
52-CHOIX / STAR/3/HE 1/3*CNO79//2* SERI	a	c	d	a	j	b
53-KAUZ/PASTOR	b	i	a	a	h	b
54-WEAVER/4/NAC/TH.AC//3*PVN/3/MIRLO /BUC	b	i	a	a	h	b
55-CHEN/ <i>Ae. Squarrosa</i> (tous)//BCN/3/2*KAUZ	b	c	d	a	j	b
56-BOW/URES//2*WEAVER/3/BOW/PRL//BUC	a	c	d	a	f	b
57-FALK*2/BISU/3/CHEN/...	a	c	d	e/f	d	b
58-BENMABROUK	c	b	a	a	d	b
59-HPO/TAN/VEE/3/2*PGO/4/MILAN/5/SERI1	a	i	a	a	h	b
60-MILAN/587230//HNITES	b	c	d	b	j	b
61-MILAN/587230//BABAX	b	c	d	d	d	b
62-RANZ//ALTA84/ACS/3/MILAN/KANZ /4/HNITES	b	i	d	a	f	b
63 -REH/HARE//2*BCN/3/CROC -1/ <i>Ae.squarrosa</i> 213 //PGO/4 HNITES	b	c	a	b	j	b
64-ATTILA/3*BCN//BAV92/3/TILHI	b	c	d	b	b	c
65-CAL/NH/H56771/3/SERI/4/CAL/NH//H56771 /5/2*KANZ/6/ PASTOR	b	c	a	b	j	b
66-OASIS/SKANZ//4*BCN*2/3/PASTOR	a	i	d	a	f	b
67-MILAN/LOTUS//ATTILA/3*BCN	b	i	d	a	f	b
68-NAC/THAC//3*PRN/3/MIRLO/BNC/4/2* PASTOR	b	c	a	a	d	c
69-WBLL1/KAMB1//PASTOR	b	i	d	a	h	b
70-KAMB1*2/KUKUR	b	c	d	a	h	b
71-WBU1*2/TUKURU	a	i	d	a	h	b

**Tableau 9:** fréquences alléliques des SG-HPM et SG-FPM de la collection de blé tendre cultivée en Algérie

SG-HPM				SG-FPM			
locus	Sous unités	allèles	Fréquences (%)	locus	Sous unités	allèles	Fréquences (%)
Glu-A1	1	a	38.03	Glu-A3	-	a	70.42
	2*	b	54.93		b	14.08	
	Null	c	7.04		d	7.04	
e/f					8.4		
Glu-B1	7	a	2.82	Glu-B3	-	a	1.4
	7+8	b	14.08		b	26.76	
	7+9	c	40.84		b'	4.22	
	17+18	i	39.43		d	8.4	
	20x-20y	e	1.41		f	7.04	
	13-16	f	1.41		g	1.4	
					h	21.12	
			i		7.04		
			j		22.53		
Glu-D1	2-12	a	38.03		Glu-D3	-	b
	5-10	d	54.93	c		9.85	
	3-12	b	2.81	d		2.81	
	10	h	2.81				
	11	m	1.41				

## 1.2. Variabilité trouvée dans les cultivars de blé dur

### 1.2.1. Variabilité génétique des SG-HPM

Les principales SG-HPM observées dans les 120 génotypes et leurs fréquences alléliques sont présentées dans les tableaux 10 et 11 respectivement. La figure 5 illustre quelques exemples d'électrophorogrammes.

Au locus Glu-A1, 118 sur les 120 cultivars analysés (soit 98.33%) sont caractérisés par l'allèle nul, dit silencieux (Glu-A1c). Seuls les deux génotypes: GTA X DUR et Carnavaca Colorado expriment deux autres allèles, à savoir : Glu-A1a (codant pour les sous unités1) pour le premier et Glu-A1o (V) (codant pour la 2\*\*) pour le deuxième. Nos résultats s'avèrent se concorder à certains trouvés auparavant dans d'autres germoplasms mondiaux (Pogna *et al.* 1989; Branlard *et al.*, 1989, Branlard et Le Blanc, 1985) et s'opposer à d'autres comme pour les 114 génotypes de blé dur sicilien provenant de l'ICARDA (Raciti *et al.*, 2003).

Au locus Glu-B1, un ensemble de sept différentes compositions alléliques sont exprimées. Les paires de sous unités les plus fréquentes sont: 20x-20y codées par l'allèle Glu-B1e, 6-8 codées par Glu-B1d et 7-8 codées par Glu-B1b, elles représentent respectivement, 41.67%, 35% et 17.5% de l'ensemble des variétés de blé dur analysées.

Selon de nombreuses recherches, les sous unités 7+15 (allèle Glu-B1z) sont généralement rarement exprimées. Dans notre collection, cet allèle a été détecté seulement dans trois accesions: ARDENTE, PLATA-1/SNM//PLATA-9 et V1 CIMMYT. Les bandes 13-16 correspondantes à l'allèle Glu-B1f sont aussi très rarement exprimées dans cette collection. En effet, une seule variété possède cet allèle, il s'agit de MOHAMED BEN BACHIR.

### 1.1.1. Variabilité génétique des SG-FPM

La séparation électrophorétique des SG-FPM, bien qu'elle soit difficile en gels monodimensionnels à cause de leur complexité, hétérogénéité et leur similarité à certaines gliadines, a montré l'existence d'une variation allélique importante (tableau 10). Un ensemble de 12 variants alléliques sont détectés.

Au locus Glu-A3, nous avons pu resenser cinq allèles: Glu-A3a (codant pour la bande 6) qui est le plus fréquent (59.16%), suivi par Glu-A3c (sous unités 6-10) (20.83%), Glu-A3b (sous unité 5) (12.5%) et Glu-A3h (nul) (6.66%). Quant à l'allèle Glu-A3e (codant pour la sous unité 11), il est détecté dans une seule accession (0.83%)

Six allèles sont identifiés au locus Glu-B3. Selon leurs fréquences d'expression, ces allèles sont: Glu-B3a (2-4-15-19) le plus exprimé (64.16%), suivi par Glu-B3b (8-9-13-16) (10.83%), Glu-B3c (6.66%), Glu-B3f (2-4-15-17) (5.83%), Glu-B3d (2-4-15-17-19) (4.16%) et Glu-B3g (2-4-15-16) (2.5%).

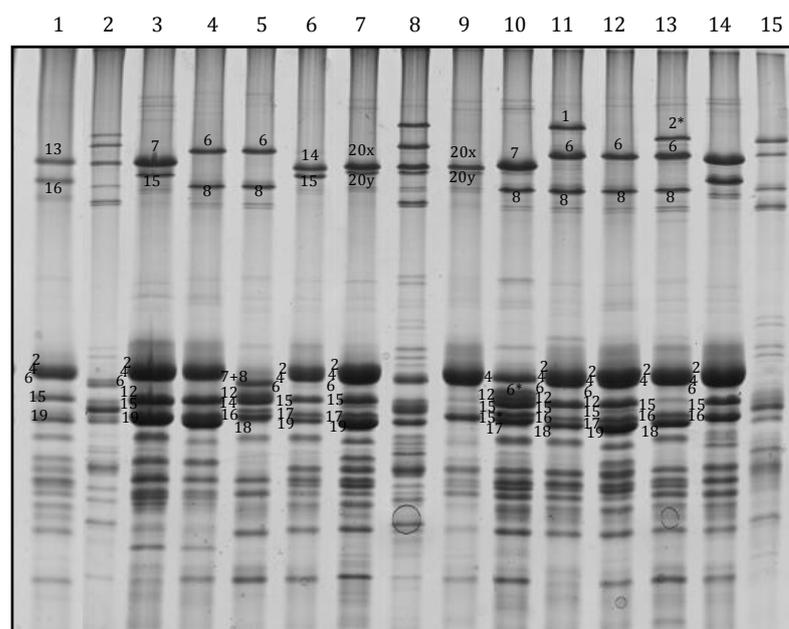
Au locus Glu-B2, nous avons dénombré deux allèles : Glu-B2a (sous unité 12) qui caractérise la quasitotalité de la collection (85%) et Glu-B2 b (nul) qui est peu fréquent (15%).

Deux autres nouveaux allèles, non détectés jusqu'ici, sont trouvés dans cette collection. Le premier exprime exactement les mêmes sous unités que l'allèle Glu-B3i à savoir :7+8+14+18 (Nieto-Taladriz *et al.*, 1997), mais avec la sous unité 16 de plus (figure 5, ligne 5). Cet allèle est répertorié dans quatre lignées : *T. polonicum* zb//gdo vz 578/swan, beltag/-2, ammar 1, ammar-6. et beltag/-2. Le deuxième nouvel allèle code pour les sous unités : 4+6\*+12+15+15\* (figure 5, ligne 10) où la sous unité qu'on a nommé 15\* est exprimée pour la première fois. Cette bande se situe entre et les bandes 15 et 16 (figure 14 ligne 10). Ce nouvel allèle caractérise deux lignées seulement : guero-1, joric 69. Quant à la 6\*, codée par l'allèle Glu-B3j, elle est déjà identifiée par Lerner *et al.*, (2004).

Le locus Glu-A3 des blés durs cultivés en Algérie est moins polymorphe que son parallèle des blés durs cultivés en Espagne (Nieto-Taladriz *et al.*, 1997) et des blés durs autochtones d'Algérie (Cherdouh *et al.*, 2005). A ce locus nous avons trouvé que l'allèle Glu-A3a est le plus fréquent, ce même résultat est rapporté par Nieto-Taladriz *et al.*, (1997), Igrejas *et al.*, (1999) et Cherdouh *et al.*, (2005). Par contre, l'allèle Glu-A3h qui est peu fréquent dans notre collection et celle d'Espagne (Nieto-Taladriz *et al.* 1997), il est complètement absent des blés durs portugais (Igrejas *et al.*, 1999) et très fréquent chez les blés autochtones d'Algérie (Cherdouh *et al.*, 2005).

Le polymorphisme détecté au locus Glu-B3 (avec 6 allèles) est presque similaire à celui de locus Glu-A3. L'allèle Glu-B3a est répertorié dans 64.16% des variétés analysées, ceci se concorde aux résultats trouvés par Cherdouh *et al.*, (2005) et par Nieto-Taladriz *et al.*, (1997). La faible variabilité du locus Glu-B3 peut être due au fait que ces loci sont étroitement liés à des gènes d'importance agronomique incluant les gènes de résistance aux stress biotiques et abiotiques (McIntosh *et al.*, 1998).

Nous avons pu constater que la majorité des allèles trouvés dans de nombreuses collections modernes (Autrique *et al.*, 1996, Igrejas *et al.*, 1999; Nieto-Taladriz *et al.* 1997, 2000) sont présents dans les blés durs cultivés en Algérie. En parallèle, il y a des allèles désignés par rares (comme Glu-A3f, Glu-A3g, Glu-A3i, Glu-B3h, Glu-B3i, Glu-B3j, Glu-B3k), qui ont été identifiés avec des fréquences faibles, dans certaines collections mondiales (Nieto-Taladriz *et al.*, 1997, Brites et Carrillo 2000), sont complètement absents dans notre collection. De point de vue qualité, les blés durs cultivés en Algérie ont un pourcentage élevé d'allèles codant pour les gluténines de FPM (de la zone B), liés à une bonne qualité de gluten, tels que Glu-A3a, Glu-A3c, Glu-A3h et Glu-B3a et Glu-B3c (Vazquez *et al.*, 1996, Nieto-Taladriz *et al.*, 1997, 2000, Carrillo *et al.*, 2000).



**Figure 5 :** Electrophorogrammes des SG-HPM et SG-FPM de quelques variétés de blé dur cultivés en Algérie: 1. Mohamed Ben Bachir ; 2. BT : soisson ; 3. PLATA-1/SNM//PLATA-9 4. TITAN ; 5. *T. polonicum* zb//gdo vz 578/swan; 6. HEDBA-03 7. HEIDER 8. BT : Insigna ; 9. BOUSSELEM; 10. guero-1; 11. BELIOUNI; 12. DT 869; 13. CARNAVACA COLORADO; 14. OMTEL 5; 15. BT : Clément.

**Tableau 10:** composition allélique aux loci Glu-A1, Glu-B1 (codant pour les SG-HPM) et GluA3, Glu-B2, Glu-B3 (codant pour les SG-FPM) des 120 variétés de blé dur cultivées en Algérie

	Cultivars	SG-HPM		SG-FPM		
		GluA1	Glu-B1	Glu-A3	Glu-B3	Glu-B2
1	HEIDER	c	e	h	c	a
2	MEXICALI (ACSAD65)	c	b	a	a	a
3	9203118	c	b	c	a	a
4	WOLLAROI	c	b	a	a	a
5	TITAN	c	d	c	a	a
6	KRONOS	c	b	a	a	b
7	CHACAN	c	b	a	a	a
8	CAPEITI 8	c	b	a	a	a
9	WAHA	c	b	b	b	a
10	ENTE MARIO/CETO	c	e	a	a	a
11	FG/PALEST, 20C/606/MEXI/3/RABI	c	b	b	b	a
12	SABIL-1	c	b	a	a	a
13	MRB 5	c	e	a	a	a
14	MASSARA-01	c	e	a	a	a
15	REZZAK	c	e	a	a	a
16	MRB 17	c	e	a	a	a
17	TELSET	c	e	a	a	a
18	920777	c	b	a	a	a
19	SILLIANA	c	b	b	b	a
20	TEZ/FRI//WULP	c	e	a	d	a
21	CANNIZARA	c	b	b	b	a
22	CAMILLAROI	c	e	a	a	a
23	CHEN'S	c	b	a	a	b
24	AWL 2/BIT	c	b	c	a	a
25	T. POLONICUM ZB//GDO VZ 578/SWAN	c	b	h	new	a
26	OMSNINA-1	c	d	a	a	a
27	CAMADI ABOU 73 N°7510	c	b	c	a	a
28	JORDAN COLLECT SEN N°53	c	b	a	a	a
29	JORI C69	c	e	h	new	a
30	SEBOU	c	b	a	a	a
31	GUERO-1	c	d	h	new	a
32	OM RUFF 2	c	e	a	a	a
33	HOGGAR (VITRON)	c	e	a	d	a
34	KORIFLA=SHAM-3	c	d	h	d	a
35	GRANIZO	c	d	b	b	a
36	CHEN 'S'/ALTAR 84	c	b	a	a	a
37	CHEN 'S'/AUK	c	b	c	a	a
38	TELL 76	c	b	b	b	a
39	TASSILI (RABI/FG)	c	b	a	a	b
40	INRAT 69	c	e	b	e	a
41	920616	c	b	a	a	a
42	M1084	c	e	c	a	a
43	BIDI 17/WAHA/BIDI17	c	e	a	a	a
44	DAKI	c	b	b	b	a
45	DT 869	c	d	c	a	a
46	920351	c	b	a	a	a
47	900453	c	d	a	a	a
48	CHAHABA 88	c	d	c	a	a
49	920273	c	b	c	a	b
50	JORDAN COLLECT 8 's''N°42	c	b	c	c	a
51	HEDBA-03/T. POLONICUM ZB	c	e	b	b	a
52	HEDBA-03/GDO VZ 619	c	b	b	b	a
53	AWL 1/SEL 4	c	e	a	a	a
54	COCORIT C 71	c	d	c	a	a
55	KYPEROUNDA	c	e	c	a	a
56	BD1 / 94	c	e	a	g	b
57	OMTEL 5	c	ac (xiii)	a	f	a
58	ROMANOU	c	b	a	a	a
59	STR/ AA//21563	c	b	b	b	a
60	ARALDUR	c	e	a	g	b
61	T. POLONICUM ZB//CH 6/CETO	c	b	a	a	a
62	UVVEYIK 126-61	c	e	a	a	a
63	CHANST 2	c	d	a	a	a
64	BELIKH 2	c	b	c	a	a
65	BIDI 17/ KHROUB 76*2	c	d	b	b	a
66	HAURANI	c	ac (xiii)	a	f	a
67	920405	c	e	a	a	b
68	9200314	c	e	a	a	a
69	OUED ZENATI/OM RABI SH	c	e	c	a	a
70	SAHEL	c	e	a	f	b
71	BIDI 17/ SYRICA	c	e	a	a	a
72	LANGDON	c	d	b	b	a
73	OCCOTILLO	c	b	a	a	a
74	DURBELL	c	e	a	a	a
75	ARDENTE	c	z (vii)	e	f	a
76	ZB/FG	c	b	c	c	a
77	KEBIR	c	b	a	a	a
78	SENATORE-CAPELLI	c	e	a	a	a

79	T. POLONICUM X ZB	c	e	a	a	a
80	CLAIRDOC	c	e	a	a	a
81	AGHTHE	c	e	a	a	a
82	MOHAMED BEN BACHI	c	f	a	a	b
83	MONT PELLIER	c	e	c	a	a
84	HEDBA-03	c	h	a	a	a
85	BIDI-17	c	e	a	a	a
86	OUED ZENATI	c	e	a	a	a
87	USDA 7317	c	e	a	a	a
88	DJENNAH-KHETIFA	c	e	a	a	b
89	GUEMGOUM RKHEM	c	e	c	c	b
90	GLOIRE DE MONT GOFLIER	c	d	a	a	a
91	BELIOUNI	a	d	a	a	a
92	GTA X DUR	c	e	a	a	b
93	SIMETO	c	b	c	c	a
94	KUCUK	c	b	a	a	a
95	DUKEM-12/2*RASCON-21	c	d	a	a	a
96	PLATA-1/SNM//PLATA-9	c	z (vii)	a	a	a
97	GIDARA-2	c	d	a	a	a
98	SOOTY-9/RASCON-37	c	d	a	c	a
99	YAVAROS-79	c	e	b	f	a
100	AJAIA-12/F3LOCL (seI.ethio.135)//PLATA-13	c	d	a	a	a
101	BARBA DE LOBE	c	e	a	f	b
102	KARASU	c	d	b	b	a
103	JORDAN COLLECTION 86	c	e	c	d	a
104	NEODUR	c	e	a	f	a
105	ORJANNE	c	b	c	d	b
106	OUM RABI-6	c	e	a	c	a
107	BOUSSELEM	c	e	a	g	b
108	AHLAL	c	b	c	a	a
109	CARNAVACA COLORADO	b	d	a	a	b
110	D94-567	c	b	c	a	a
111	904 'S'/ LOG 'S'	c	e	a	a	a
112	POGGIO	c	d	c	c	a
113	V1 CIMMYT	c	z (vii)	c	a	b
114	V2 CIMMYT	c	e	a	a	a
115	OFANTO	c	e	c	a	a
116	AMMAR 1	c	e	h	new	a
117	AMMAR-6	c	e	h	new	a
118	ACSAD-1103	c	b	a	a	a
119	BELTAG/2	c	e	h	new	a
120	ERUFTEL	c	b	a	a	b

**Tableau 11** : fréquences alléliques des SG-HPM et SG-FPM de la collection de blé dur cultivée en Algérie.

SG-HPM				SG-FPM			
locus	Sous unités	allèles	Fréquences (%)	locus	Sous unités	allèles	Fréquences (%)
Glu-A1	1	a	0.83	Glu-A3	6	a	59,16
	2**	o (V)	0.83		5	b	12,5
	Null	c	98.33		6-10	c	20.83
			11		e	0,83	
			Null		h	6,67	
Glu-B1	7+8	d	17.5	Glu-B3	2-4-15-19	a	64.16
	6+8	b	35		8-9-13-16	b	10,83
	20x-20y	e	41.67		2-4-14-15-19	c	6,67
	14+15	h	0.83		2-4-15-17-19	d	4,17
	13+16	f	0.83		2-4-15-16-18	e	0,83
	7+15	z (VII)	2.5		2-4-15-17	f	5,83
	6+16	ac (XIII)	1.67		2-4-15-16	g	2,5
					7+8+14+16+18	new1	3.33
					4+6*+12+15+15*	new2	1.66
			Glu-B2	12	a	85	
				Null	b	15	

## 2. VARIABILITE DES SG-HPM ET DES SG-FPM DES BLES DURS BOTANIQUES

---

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 (Monneveux, 1991).

A travers cette étude, nous avons estimé la variabilité génétique des gluténines d'une collection de 17 variétés botaniques, de blé dur local, collectées en Algérie.

Le tableau 12 résume la composition et les fréquences alléliques des sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire codées par les loci Glu-1 et Glu-2, Glu-3 respectivement. Quelques exemples de profils électrophorétiques sont illustrés par la figure 6.

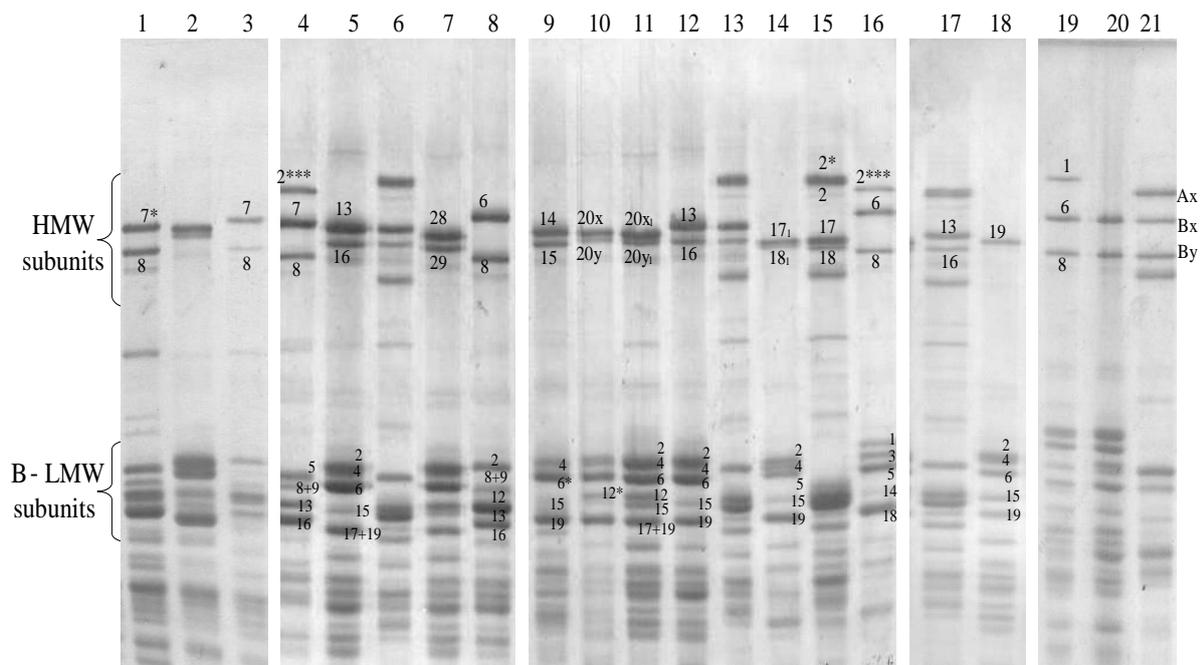
Dans notre interprétation des résultats, nous considérons comme rares, tous les allèles dont la fréquence est inférieure à 5% (Caballerro *et al*, 2004).

### 2.1. Variation allélique des SG-HPM

Une variabilité allélique importante a été trouvée aux loci Glu-1 codant pour les SG-HPM. Un total de 16 formes alléliques est détecté.

Quatre allèles sont observés au Glu-A1, dont l'allèle nul (Glu-B1c) est majoritaire (présent dans 97.78% de la collection). Les trois autres allèles, à savoir : Glu-A1a, Glu-A1b et Glu-A1VI (codant pour les sous unités 1, 2\* et 2\*\*\* respectivement), sont très peu fréquents (<5%), et considérés comme rares (Caballerro *et al*, 2004).

Au locus Glu-B1, 12 allèles sont recensés: Glu-B1e (codant pour la paire de sous unités 20x-20y), Glu-B1d (sous unités 6-8), et Glu-B1f (sous unités 13-16) sont les plus fréquents (31.54%, 25.70% et 21.38% respectivement). Les fréquences élevées de ces allèles sont dues au fait qu'ils sont répons dans les trois variétés possédant le plus grand nombre d'accessions, à savoir : *Italicum* (Alef.) Koern. avec 142 accessions, *Reichenbachii* Koern. Koern.i avec 176 accessions et *Leucomelan* (Alef.) Koern. avec 206 accessions. Une autre fréquence relativement élevée (12.73%) de l'allèle Glu-B1h (codant pour la paire 14-15) est enregistrée. Les 6 autres formes alléliques identifiées: Glu-B1b, Glu-B1u, Glu-B1z, Glu-B1i, Glu-B1r, Glu-B1ag codant pour les sous unités 7-8, 7\*-8, 7-15, 17-18, 19 et 28-29, respectivement, sont très peu exprimés dans ce germoplasm.



**Figure 6:** Electrophorogrammes des SG-HPM et SG-FPM de quelques accessions de certaines variétés de blé dur botanique collectées en Algérie: 1. Africanum Koern. IG5806, 2. Circumflescum Koern. IG17564, 3. Fastuasum (Lag.) Koern. IG11049, 4. Hordeiforme (Host.) Koern. IG16802, 5. Fastuasum (Lag.) Koern. IG11945, 6. T1: Atlas 66, 7. Leucomelan (Alef) Koern. IG17409, 8. Melanopus (Alef.) Koern. IG17565, 9. Algeriense Koern. IG6766, 10. Reichenbachii Koern. IG17112, 11. Leucurum (Alef.) Koern. IG14311, 12. Affine Koern. IG14287, 13. T1: Atlas 66, 14. Affine Koern. IG14288, 15.T2: Prinqual, 16. Leucurum (Alef.) Koern. IG14320, 17. T1: Atlas 66, 18. Aegyptiacim Koern. IG16420, 19. Murciense Koern. IG16684, 20. Italicum (Alef.) Koern. IG16893, 21. T3: Clément.

Parmi les allèles recensés, 2 sont décrits pour la première fois. Ces nouveaux allèles sont rarement exprimés dans ce germoplasme. Le premier est présent uniquement dans les deux accessions IG-14303 et IG-14326 de la variété Leucurum (Alef.) Koern.. Il code pour deux nouvelles bandes, l'une a une mobilité relative un peu plus rapide que la bande 20x exprimée par l'allèle Glu-B1e, et l'autre migre un peu plus rapidement que la bande 20y exprimée par l'allèle Glu-B1e et la bande 16 exprimée par l'allèle Glu-B1f, (Figure 6, lignes 10 et 11). Ces sous unités et leur allèle codant sont désignés par 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub> et Glu-B1e<sub>1</sub> respectivement. Le deuxième nouvel allèle est détecté dans les accessions IG-14311 et IG-14331 de la variété Leucurum (Alef.) Koern. et IG-14288 de la variété Affine Koern. (Figure 6, ligne 14), il code aussi pour deux nouvelles sous unités avec des mobilités situées entre les bandes 17-18 codées par l'allèle Glu-B1i (Figure 6, ligne 15). Nous avons attribué à ces nouvelles bandes la nomenclature 17<sub>1</sub> et 18<sub>1</sub> et leur allèle codant Glu-B1i<sub>1</sub>.

Dans cette collection, les fréquences élevées des allèles Glu-B1e et Glu-B1d codant pour les paires (20x-20y et 6-8 respectivement) se concordent à celles trouvées dans une collection composée de 502 variétés de blé dur originaires de 23 pays, analysée par Branlard *et al.*,

(1989), et une autre collection de 63 blés durs autochtones du bassin méditerranéen étudiée par Moragues *et al.*, (2006). Contrairement à l'allèle Glu-B1b, codant pour les sous unités 7-8, trouvé répondu par ces mêmes auteurs, alors que nous l'avons trouvé très peu fréquent (3.03%). Aussi, les allèles Glu-B1f (13-16) et Glu-B1h (14-15), que nous avons trouvés communs (21.3% et 12.7%, respectivement), sont rarement exprimés dans la collection mondiale analysée par Branlard *et al.*, (1989) avec seulement 5.5% et 0.6%, respectivement. Nos résultats se rapprochent aussi à ceux trouvés dans une collection composée de 200 variétés de blé dur autochtones d'Espagne analysée par Carrillo, (1995) et s'opposent aux résultats de Hailu *et al.*, (2006) qui, en analysant une collection de 120 blés tétraploïdes originaire d'Éthiopie, ils ont trouvé que la paire 7+8 est la plus fréquente alors que la paire 6+8 s'est avérée rare.

La diversité enregistrée dans la collection de blés durs botaniques est beaucoup plus importante que celle trouvée dans le germoplasme de blés durs autochtones d'Algérie (Cherdouh *et al.*, 2005) et de blés durs cultivés en Algérie (la suite de cette partie).

Notre collection de blés durs botaniques peut être considérée comme une source de gènes d'intérêt, permettant de développer des nouvelles lignées de meilleure qualité, sachant que de nombreux allèles ayant un effet positif sur la qualité technologique sont répertoriés : Glu-B1b (7+8), Glu-B1d (6+8) (Du Cros, 1987) et Glu-A1a (sous unité 1) (Kaan *et al.*, 1993; Aghai *et al.*, 1996). Cette information peut être utilisée avantageusement dans les programmes de sélection variétale locale.

## **2.2. Variation allélique des SG-FPM**

Ce germoplasme de blé dur botanique est caractérisé par un polymorphisme important des SG-FPM. Un ensemble de 19 allèles est identifié (Tableau 12) : Six au locus Glu-A3 (Glu-A3a, Glu-A3b, Glu-A3c, Glu-A3d, Glu-A3e, et Glu-A3h), 10 au locus Glu-B3 (Glu-B3a, Glu-B3b, Glu-B3d, Glu-B3e, Glu-B3f, Glu-B3g, Glu-B3h, Glu-B3i, Glu-B3j, Glu-B3ab) -le dernier (codant pour 2-8-9-13-16) est considéré comme nouveau-, et trois au locus Glu-B2 (Glu-B2a, Glu-B2b, Glu-B2c). Toutes les sous unités de faible poids moléculaire trouvées sont déjà décrites par Nieto-Taladriz *et al.*, (1997) excepté la sous unité 12\* (Figure 6, ligne 10) qui a été identifiée par Martinez *et al.*, (2004) et 6\* (Figure 6, ligne 9) codée par l'allèle Glu-B3j identifiée par Lerner *et al.*, (2004).

La composition allélique la plus fréquente (39%) est la Glu-A3a-Glu-B3a-Glu-B2a codant pour le diagramme (2-4-6-12-15-19).

Au locus Glu-A3, l'allèle le plus commun est le Glu-A3a (83.06%) codant pour la sous unité 6. Cet allèle est présent dans toutes les variétés analysées. Il est suivi par l'allèle nul Glu-A3h qui, malgré sa faible fréquence (10.5%), est présent dans 15 variétés. Les cinq autres allèles sont classés comme rares et sont tous détectés avec des fréquences très faibles variant entre 0.58% et 2.22%.

Au locus Glu-B3, l'allèle Glu-B3a est le plus fréquent (80.05%), il est présent dans toutes les variétés analysées exceptée *Africanum Koern*.

La variabilité trouvée aux loci Glu-A3, Glu-B3 et Glu-B2 est presque similaire, à celle rapportée par Nieto-Taladriz *et al.*, (1997) qui, en analysant une collection composée de 88 cultivars de blé dur cultivé en Espagne, ont trouvé que la composition allélique la plus commune est Glu-A3a, Glu-B3a, Glu-B2a (36%).

De nombreuses compositions alléliques trouvées dans notre collection telles que Glu-B3a (2+4+15+19), Glu-B3c (2+4+14+15+19), Glu-A3h (nul), Glu-A3a (6) apportent un effet positif sur la qualité (Carrillo *et al.*, 2000) et peuvent éventuellement être utilisées dans les programmes de sélection.

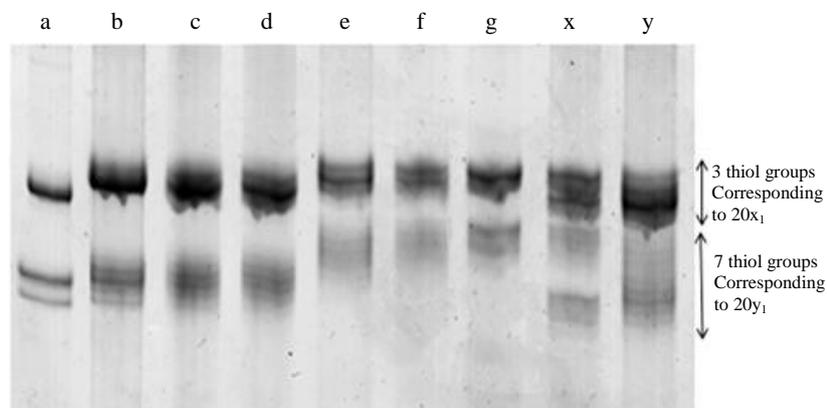
### **2.3. Analyse des liaisons cysteines des nouvelles bandes détectées 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub>**

La technique électrophorétique Ureé-Acid-PAGE utilisée pour la détermination de nombre de groupements thiols des nouvelles bandes 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub>, nous a permis d'obtenir une meilleure séparation. Trois bandes sont détectées (Figure 7, ligne a) au lieu de deux révélées par la technique SDS-PAGE (Figure 6, ligne 10).

Les gluténines totales sont extraites et réduites à partir de 200g de farine selon la méthode de Singh *et al.*, (1991). Les SG-HPM sont ensuite précipitées selon la méthode de Sutton (1991). L'alkylation des SG-HPM réduites est faite par la création d'un gradient de différentes concentrations à base de deux alkylants différents (4- vinylpyridine et acide Iodoacétique) selon la méthode de Morel et Bonicel (1996). Les SG-HPM alkylées sont ensuite analysées par la technique électrophorétique Acid-urea-PAGE décrite par Morel (1994) en modifiant la concentration du gel à 13% au lieu de 12%. Pour les protéines avec x résidus cysteines, x+1 bandes sont obtenues sur le gel à cause des différences de charges entre 4-VP (charge zero) et IAA (charge négative).

La technique utilisée a permis de dénombrer trois groupements thiols (4 bandes présentes sur le gel) pour la sous unité 20x<sub>1</sub> et sept (8 bandes) pour la 20y<sub>1</sub>. Contrairement aux sous unités 20x et 20y analysées par Morel and Bonicel (1996), où 2 et 8 résidus cysteines ont été trouvés respectivement.

Etant donné que les sous unités  $20x_1$  et  $20y_1$  sont composées d'un nombre impair de cystéines (3 et 7 respectivement), leur allèle codant (Glu-B1e<sub>1</sub>) est potentiellement favorable pour l'élongation de polymère de glutenine et donc pour l'amélioration des propriétés rhéologiques du gluten en formant des liaisons interchaines avec d'autres SH- appartenant à d'autres gluténines.



**Figure 7 :** profils électrophorétiques des SG-HPM  $20x_1$ - $20y_1$  obtenus à partir d'une Urée-Acid-PAGE suivi d'une alkylation mixte de l'accession Leucurum (Alef.) Koern. IG 14311. (a) 40mM 4-VP (b) 40mM 4-VP et 0.5 mM IAA, (c) 40mM 4-VP et 1 mM IAA, (d) 40mM 4-VP et 2 mM IAA, (e) 20mM 4-VP et 8 mM IAA, (f) 10mM 4-VP et 8 mM IAA, (g) 10mM IAA. (x) Mixture de volumes égaux des échantillons (a) et (g). (y) Mixture de tous les échantillons: 1 volume des échantillons (a) et (g) et 3 volumes des échantillons de (b) à (f).

#### 2.4. Indices de la diversité génétique

Les indices de la diversité génétique ( $D_i$ ) des cinq loci et des 17 variétés botaniques sont présentés dans le tableau 13. La moyenne générale de l'indice de diversité génétique ( $D_i$ ) est relativement élevée (0.34).

Au niveau des loci, la valeur la plus basse de l'indice de diversité (0.04) caractérise le locus Glu-A1. Ce locus est monomorphe dans sept variétés différentes (expression d'un seul allèle,  $D_i=0$ ). Le locus Glu-B1 présente l'indice génétique de diversité le plus élevé avec une moyenne totale de 0.57. Ce locus est polymorphe chez toutes les variétés analysées.

En comparant la diversité des variétés entre elles, nous constatons que la valeur la plus élevée de l'indice  $D_i$  (0.50) caractérise la variété Leucurum (Alef.) Koern. qui pour 28 accessions seulement, 10 allèles sont recensés au Glu-1 et 9 au Glu-3. Cette variété contient tout de même les trois nouveaux allèles détectés aux Glu-1 et Glu-B2. Contrairement aux variétés Italicum (Alef.) Koern., Reichenbachii Koern. et Leucomelan (Alef.) Koern., qui malgré le nombre élevé de leurs accessions (142, 176 et 206 accessions, respectivement), elles

présentent les indices de diversité génétique les plus faibles (0.14, 0.22 et 0.20 respectivement).

### **2.5. Analyse en Cluster basant sur les fréquences alléliques des SG-HPM et SG-FPM**

Le dendrogramme (figure 8) obtenu à partir des distances génétiques de Roger's (1972) révèle de nombreux groupes. La variété *Africanum* Koern. est très différente des autres variétés et constitue un groupe à part.

A la distance Røge's 0.32, l'ensemble des variétés est divisé en deux groupes : le premier contient deux variétés (*Italicum* (Alef.) Koern. et *Aegyptiacum* Koern.) avec des niveaux élevés de similarité, tandis que le second est divisé à son tour en deux sous groupes où l'un est composé de la seule variété *Valenciae* Koern, tandis que l'autre est divisé aussi en deux autres sous groupes : le premier comprend les deux variétés *Affine* Koern. et *Apulicum* Koern. et l'autre contient le reste des variétés de la collection.

La valeur moyenne des distances de Roger's est 0.30 (figure 8); à cette distance, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la diversité génétique des protéines de réserve de presque toutes les variétés.

A la distance 0.15, le dendrogramme montre que la majorité des variétés peuvent être clustrées en deux sous groupes, le premier comprend la variété *Hordeiforme* (Host.) Koern. et le deuxième est un groupe majeur contenant les neuf variétés restantes: *Leucomelan* (Alef.) Koern., *Reichenbachii* Koern., *Leucurum* (Alef.) Koern., *Circumflescum* Koern., *Murciense* Koern., *Algeriense* Koern., *Melanopus* (Alef.) Koern., *Alexandrinum* Koern., et *Fastuasum* (Lag.) Koern.

La distribution géographique des accessions (Figure 2) et les résultats des analyses en cluster de la variation allélique des SG-HPM et FPM (Figure 8) ne sont pas corrélés. Par exemple, les neuf variétés appartenant au même groupe à la distance 0.18 n'ont pas la même origine géographique et sont issues de climats géographiques complètement différents: quelques unes sont distribuées à travers le climat méditerranéen et le littoral (comme *Leucurum* (Alef.), *Circumflescum* Koern., *Leucomelan* (Alef.) Koern., etc.), d'autres sont issues de l'Atlas Tellien (comme *Melanopus* (Alef.) Koern. et *Murciense* Koern.) ou des zones semi-aride: (*Fastuasum* (Lag.) Koern. et *algeriense* Koern.) ou encore des régions arides sahariennes (*Alexandrinum* Koern. et *Reichenbachii* Koern.). Un autre exemple concerne les deux variétés: *Africanum* Koern. et *Valenciae* Koern., qui sont très distantes de point de vue génétique (composition en SG-HPM et SG-FPM) mais qui sont collectées à partir des mêmes endroits.

## **2.6. Etude des caractères morphologiques de la collection**

Dix caractères morphologiques (Boudour, 2005) sont sélectionnés pour étudier les similarités qui existent entre les variétés. Ces caractères morphologiques sont inclus dans cette étude comme une approche complémentaire pour confirmer le choix des accessions pour la core collection. L'analyse en cluster (figure 9) montre cinq groupes différents, chacun est composé de deux variétés très liées morphologiquement, à savoir: Leucurum (Alef.) Koern. et Valenciae Koern., Hordeiforme (Host.) Koern. et Murciense Koern., Reichenbachi Koern. et Leucomelan (Alef.) Koern., Fastuasum (Lag.) Koern. et Italicum (Alef.) Koern., Alexandrinum Koern. et Algeriense Koern.

## **2.7. Choix des accessions représentatives de la core collection**

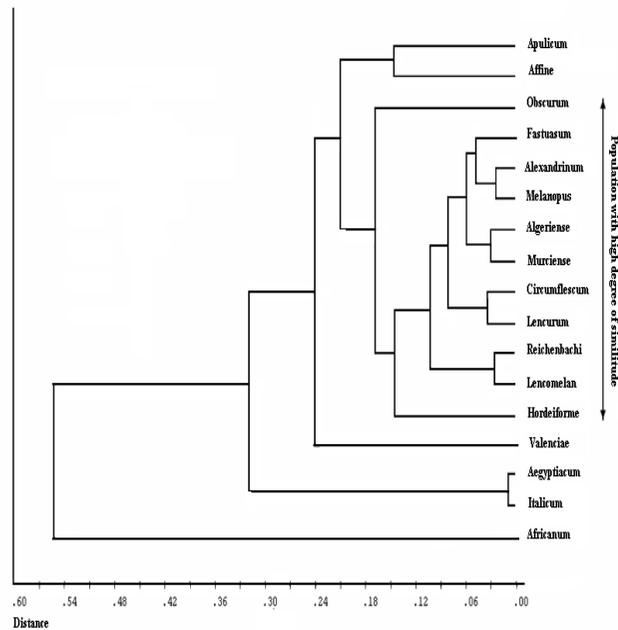
La mise en valeur des ressources phytogénétiques nécessite non seulement leur conservation mais aussi leur utilisation. Le concept de la core collection a été introduit par Frankel and Brown (1984) dans le but de minimiser les coûts et d'améliorer l'exploitation des banques de gènes. La core collection est un échantillon limité issues d'une collection plus vaste et choisies pour représenter au mieux la diversité génétique. Dans le but de constituer une core collection, il est nécessaire de prendre en priorité l'origine géographique des accessions. Dans notre collection, au moins une accession représentative par endroit a été sélectionnée (figure 2). Pour les deux autres facteurs pris en considération pour la constitution des accessions représentatifs de la core collection (Tableau 14), à savoir : les caractères morphologiques et la variabilité génétique des SG-HPM et SG-FPM, la sélection a été faite de manière à couvrir toute la variabilité de ces facteurs. Pour cette raison, nous avons choisi les accessions significativement distantes les unes des autres. Nous avons ainsi pu réduire la collection de 856 à seulement 21 accessions représentatives.

**Tableau 12 :** Fréquences alléliques des sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaires trouvées au sein des 856 blés durs botaniques d'Algérie.

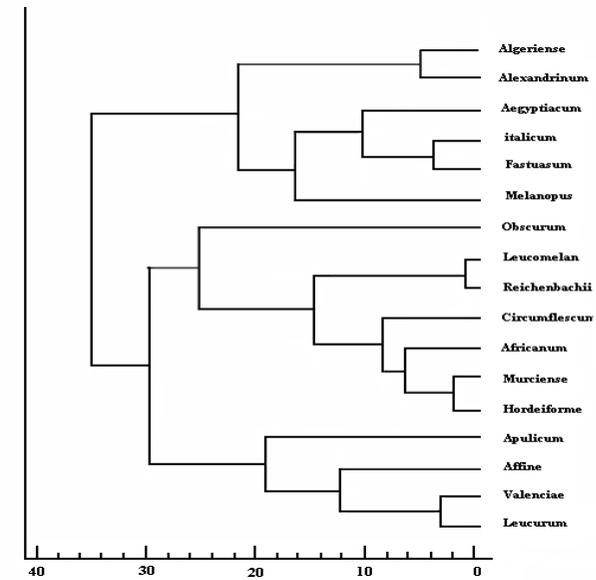
Locus	allèle	subunits	Total (856)	variétés																	
				Apulicum (3)	Africanum (3)	Obscurum (3)	Fastuosum (6)	Algériense (6)	Alexetrium (8)	Melanopus (11)	Circumflescum (14)	Affine Koern. (26)	Leucorum (28)	Aegyptiacum (42)	Valenciae (50)	Murciense (57)	Hordeiforme (75)	Italicum (142)	Reichenbachii (176)	Leucomelan (206)	
<b>Glu-A1</b>	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	
<b>Glu-B1</b>	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 <sub>1</sub>	20x <sub>1</sub> -20y <sub>1</sub>	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.14	-	-	-	-	-	-	10.20	
i <sub>1</sub>	17 <sub>1</sub> -18 <sub>1</sub>	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-	3.84	7.14	-	-	-	-	-	-	-		
<b>Glu-A3</b>	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	
<b>Glu-B3</b>	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	
	<b>Glu-B2</b>	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	-	16.66	-	-	-	-	-	-	-	-	2.27	-	

**Tableau 13 :**Indices de diversité génétique.

<i>Locus</i>	<i>total</i>	<i>Apulicum</i> (3)	<i>Africanum</i> (3)	<i>Obscurum</i> (3)	<i>Fastuasm</i> (6)	<i>Algeriense</i> (6)	<i>Alexet- rinum</i> (8)	<i>Melanopus</i> (11)	<i>Circum- flescum</i> (14)	<i>Affine</i> (26)	<i>Leuc- rum</i> (28)	<i>Aegypt- iacum</i> (42)	<i>Valenc- iae</i> (50)	<i>Murci- ense</i> (58)	<i>Hordeifo- rme</i> (75)	<i>Italic- um</i> (142)	<i>Reiche- nbachii</i> (176)	<i>Leuco melan.</i> (206)
<b>D<sub>Glu-A1</sub></b>	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
<b>D<sub>Glu-B1</sub></b>	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
<b>D<sub>Glu-A3</sub></b>	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
<b>D<sub>Glu-B3</sub></b>	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
<b>D<sub>Glu-B2</sub></b>	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
<b>Di</b>	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



**Figure 8:** dendrogramme obtenu à partir des fréquences alléliques au sein de chaque variété de blé botanique.



**Figure 9:** Dendrogramme obtenu à partir des comparaisons de dix caractères morphologiques.

**Tableau 14 :** Accessions représentatives de la core collection proposée.

Accessions	Localisation géographique	Diagrammes des SG-HPM	Diagrammes des SG-HPM	Caractères morphologiques <sup>a</sup>
1. Apulicum Koern. IG 6355	Guelma, Constantine, BourdjBouarrerdj, Relizane et Saïda	Nul, 20x-20y	2-4-6-12-15-19	Épi rouge pubescent, allongé, de forme triangulaire à pyramidale, légèrement aplati et d'une compacité assez lâche. Les glumelles sont prolongées par des barbes noires fortes, à grain blanc, gros et translucide et à paille creuse.
2. Africanum Koern. IG5806	Toughourt et Biskra	Nul, 7*-8	5-7-8-12-14-18	Épi blanc pubescent, allongé, étroit, légèrement aplati et d'une compacité assez faible. Les glumelles sont prolongées par des barbes noires longues, peu divergentes ou parallèles. Le grain est rouge, gros et bossu et à paille creuse.
3. Obscurum Koern. IG7756	Tebessa, Tiaret et Relizane	1, 17-18	2-6-8-9-12-13-16	Épi noire, glabre, demi compact et de forme pyramidal à fusiforme. Les glumelles sont prolongées par des barbes noires ou bleuâtres, longues et divergentes, à grain rouge, gros, allongé et bossu et à paille généralement creuse à ¼ creuse.
4. Fastuasum (Lag.) Koern. IG11049	Medea et Relizane	Nul, 7-8	2-8-9-12-13-16	Épi blanc pubescent. Les glumelles sont prolongées par des barbes droites ou parallèles, assez longues. Un grain rouge, gros, allongé et bossu et à paille généralement creuse à demi-creuse.
5. Fastuasum (Lag.) Koern. IG11945		Nul, 13-16	2-4-6-15-17-19	
6. Algeriense Koern. IG6766	Relizane et Tebessa	Nul, 14-15	4-6*-15-19	Épi roux, glabre, demi compact. Les glumelles sont prolongées par des barbes noires courbées à la base, parfois divergentes. A grain rouge, gros, bossu et à paille creuse
7. Alexandrinum Koern. IG22415	Annaba	Nul, 6-8	2-8-9-12-13-16	Épi rougros et bossu et à paille généralement creuse à demi-creuse, glabre, compact et fusiforme. Les glumelles sont prolongées par des barbes noires demi divergentes. A grain blanc, allongé,
8. Melanopus (Alef.) Koern. IG17565	Guelma, Constantine, BourdjBouarrerdj	Nul, 6-8	2-8-9-12-13-16	Épi blanc pubescent, allongé, plus ou moins aplati, d'une compacité assez faible, à barbe noire, longue divergente ou parallèle à grain blanc, gros, allongé et bossu et à paille généralement creuse à demi creuse.
9. Circumflescum Koern. IG17564	Mostaganem	Nul, 20x-20y	2-4-6-11-12-15-19	Épi blanc pubescent., fusiforme. Les glumelles sont prolongées par des barbes longues, courbées à la base et divergentes à grain rouge, gros, allongé et bossu. La paille est creuse à demi-creuse.
10. Affine Koern. IG14288	Mostaganem, Annaba et Medea	New (17 <sub>1</sub> -18 <sub>1</sub> )	2-4-5-15-19	Épi blanc, glabre, droit, étroit, lâche, des barbes blanches parallèles, parfois divergentes, le grain rouge allongé et bossu et à paille généralement creuse ou demi-creuse.
11. Affine Koern. IG14299		Nul, 13-16	2-4-11-15-17	
12. Leucurum (Alef.) Koern. IG14311	Oran et Annaba	New (20x <sub>1</sub> -20y <sub>1</sub> )	2-4-6-12-15-17-19	Épi blanc, glabre, droit, presque rectangulaire parfois pyramidal avec une compacité faible, à barbe blanche faiblement divergentes, un grain blanc ou ambré, moyen et bossu et à paille creuse.
13. Leucurum (Alef.) Koern. IG 14320,		2***, 6-8	1-3-5-14-18	
14. Aegyptiacum Koern. IG16420	Setif, Guelma, Constantine, BourdjBouarrerdj	Nul, 19	2-4-6-15-19	Épi rouge pubescent, compact, d'une forme pyramidal. Les glumelles sont prolongées par des barbes rouges peu divergentes à grain rouge, allongé, gros et bossu et avec une forme de paille demi-creuse.
15. Valenciae Koern. IG16554	Tiaret, Bousaada et Toughourt	2*, 17-18	2-4-6-12-15-16	Épi blanc pubescent, rectangulaire, pyramidal ou oval, aplati et compact. Les glumelles sont prolongées par des barbes blanches assez longues, divergentes à grain blanc ou ambré, gros, allongé et bossu et à paille creuse.
16. Murciense Koern. IG16684	Biskra, Bousaada et Toughourt	1, 7-8	2-4-6-12-15-19	Épi rouge, glabre, un peu lâche, avec des glumelles prolongées par des barbes rouges, longue, demi divergentes à grain rouge, gros, moyen et bossu et à paille demi-pleine.
17. Hordeiforme (Host.) Koern. IG16802	Tiaret et Tebessa	2***, 7-8	5-8-9-13-16	Épi rouge glabre, assez lâche, droit, étroit. Les glumelles sont prolongées par des barbes rousses divergentes, à grain blanc, gros et bossu et à paille généralement demi-creuse.
18. Italicum (Alef.) Koern. IG16893	Batna et Bousaada	Nul, 7-8	2-4-6-12-15-19	Épi pubescent, roux, d'une compacité faible. Les glumelles sont prolongées par des barbes rousses, peu divergentes, à grain blanc, moyen et bossu à paille demi-creuse.
19. Italicum (Alef.) Koern. IG16919		Nul, 7-15	2-4-6-10-15-16-18	
20. Reichenbachii Koern. Koern. IG 17112	Saïda et Tebessa	Nul, 20x-20y	2-4-6-12*-15-19	Épi blanc glabre, assez lâche, droit, étroit, à barbes noires faiblement divergentes, à grain rouges, de taille moyenne, et bossu et à paille creuse ou demi-creuse à 3/4 creuse.
21. Leucomelan (Alef.) Koern. IG17409	Oran et Annaba	Nul, 28-29	2-4-6-12-15-19	Épi blanc glabre ou lisse, de forme pyramidal, triangulaire aplatie, parfois carré ou rectangulaire, avec un noircissant sur le dos des glumes glabres, d'une compacité assez faible parfois plus marquée. Les glumelles sont prolongées par des barbes noires faiblement divergentes et fortes. Le grain est blanc gros, allongé et bossu. La paille est généralement creuse ou demi creuse à ¾ creuse.

<sup>a</sup>: selon Boudour, L. (2005)

### 3. VARIABILITE DES SG-HPM ET DES SG-FPM DES BLES APPARENTES

---

#### 3.1. Variabilité génétique des SG-HPM

Les blés durs apparentés sont des espèces tétraploïdes ayant le génome AABB. Les SG-HPM sont codées par des gènes localisés sur les bras longs des chromosomes homologues du groupe 1, les loci sont nommés Glu-A1 et Glu-B1 (Bietz *et al.*, 1975 in Gianebelli *et al.*, 2001). La figure 10 présente l'ensemble des diagrammes types trouvés dans cette collection.

Au locus Glu-A1, une seule protéine a été exprimée par ce locus, il s'agit de la sous unité « 1 » qui, selon la nomenclature de Branlard *et al.*, (1990), est représentée par l'allèle Glu-A1a. Ce dernier est rencontré chez onze accessions sur les 30 analysées. En plus de cet allèle, il y a un deuxième nommé « c » et désigné par l'allèle silencieux (il existe mais il ne s'exprime pas), il caractérise pratiquement la quasi-totalité des blés analysés (19 accessions) (tableau 15). L'allèle Glu-A1a caractérise surtout les accessions obtenues à partir des croisements entre *T. dicoccum* x Cham1. Khan *et al.*, (1989) ont montré que la sous unité 1 est associée à la bonne qualité boulangère des blés.

Au locus Glu-B1, les SG-HPM exprimées sont plus importantes que celles du Glu-A1 (tableau 15). Cinq bandes protéiques différentes sont répertoriées. En se référant à la nomenclature de Branlard *et al.*, (1990) il s'agit des sous unités: 6, 7, 8, 17 et 18. Selon ces mêmes auteurs, l'unité « 7 » peut s'exprimer seule dont l'allèle correspondant est le Glu-B1a, ou avec la « 8 », dans ce cas l'allèle est le Glu-B1b. Quant aux bandes « 6 et 8 », elles viennent toujours ensemble et elles sont représentées par l'allèle Glu-B1d. De même pour les sous unités « 17, 18 » dont l'allèle est nommé Glu-B1i. Nous avons donc recensé quatre allèles seulement sur un total de onze déjà identifiés par Branlard *et al.*, (1990).

Les bandes « 8 et 7 » sont communes presque à tous les diagrammes des variétés analysées avec des fréquences de 66,66% et 60% respectivement. Ces deux bandes ont pour origine l'espèce *T. dicoccum*, suivies par la bande « 6 » dont la fréquence est de 20%. Tandis que les bandes 17 et 18 sont rarement exprimées, on les trouve uniquement chez quatre accessions. Perron *et al.*, (1998) montrent que les sous unités Bx7+By8 sont associés à une force élevée des pâtes qui est mesurée par le mixographe. Aussi Khan *et al.*, (1989) rapportent que les sous unités 7+8 caractérisent les blés de bonne qualité alors que les sous unités 6+8 sont associées aux blés de mauvaise qualité.

Les résultats que nous avons trouvés se concordent à ceux trouvés par plusieurs auteurs: Branlard *et al.*, (1989), en analysant par SDS-PAGE une collection de 502 variétés de blé dur ont trouvé uniquement 29 diagrammes types, 18 bandes de différentes mobilités et un total de 18 allèles sont identifiés. 83% de la collection analysée présente l'allèle nul «Glu-A1c », alors que l'allèle «Glu-B1c » codant pour « 7-9 » très abondant chez les blés tendres, est presque absent de la collection étudiée.

Dans une autre étude portant sur une collection méditerranéenne de 63 variétés autochtones de blé dur, 3 allèles codant pour les SG-HPM localisés au locus Glu-A1 et 14 autres situés sur le locus Glu-B1 ont été répertoriés, dont les plus fréquents sont les « d, b et e » codant pour les bandes « 6+8, 20 et 7+8 » respectivement (Moragues *et al.*, 2006).

Aussi, Randhawa *et al.*, (1997) ont étudié le polymorphisme des SG-HPM d'une collection constituée de 144 blés de différentes espèces sauvages et cultivées, diploïdes et tétraploïdes y compris 25 accessions de *T. dicoccum* et 13 de *T. durum*. Dans cette étude, toutes les lignées du *T. durum* montrent l'absence complète des sous unités codées par le locus Glu-A1. alors que quelques accessions seulement de *T. dicoccum* présentent les deux bandes codées par le locus Glu-A1 (type x- et type y-) mais la majorité expriment uniquement les bandes de type x.

### **1.3. Variabilité génétique des SG-FPM**

Un polymorphisme important caractérise les SG-FPM des blés apparentés. Un total de 13 allèles a été identifié (Tableau 15). Nous avons pu dénombrer 4 formes alléliques au locus Glu-A3 (Glu-A3a, Glu-A3b, Glu-A3c et Glu-A3h), 6 au locus Glu-B3 (Glu-B3a, Glu-B3b, Glu-B3d, Glu-B3e et Glu-B3g, Glu-B3h) et trois au locus Glu-B2 (Glu-B2b, Glu-B2c, Glu-B2d). Toutes les sous unités de faible poids moléculaire trouvées sont déjà décrites par Nieto-Taladriz *et al.*, (1997) .

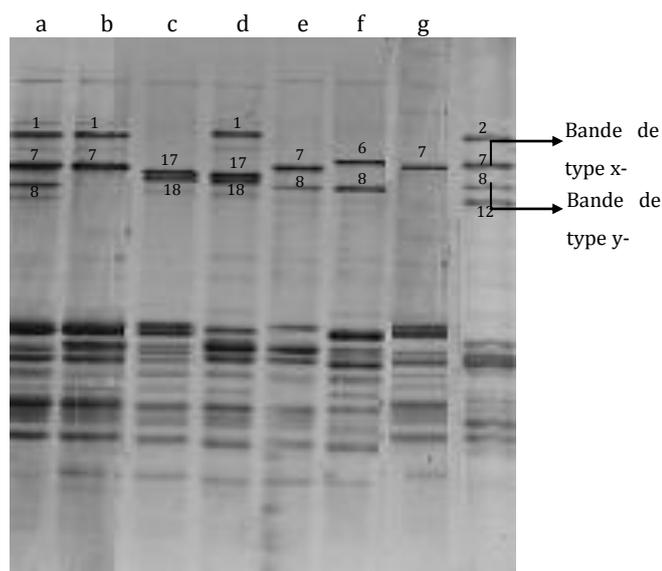
Au locus Glu-A3, les allèles Glu-A3a (codant pour la sous unité 6) et Glu-A3b (sous unité 5) sont les plus fréquents (50% et 23.33% respectivement) suivi par les allèles Glu-A3c (sous unités 6-10) et Glu-A3h (nul). Ce même résultat est trouvé pour les blés durs botaniques et cultivés.

Au locus Glu-B3, l'allèle Glu-B3a (2-4-15-19) est le plus répandu (53.33%) suivi par-B3b (23.33%). Les allèles Glu-B3d (2-4-15-17-19), Glu-B3e (2-4-15-16-18) et Glu-B3h (1-3-14-18), sont très peu exprimés et partagent la même fréquence (6.66%). Quant au Glu-B3g, il est présent dans une seule accession.

Au locus Glu-B2, les fréquences des allèles répertoriés sont dans l'ordre décroissant suivant: Glu-B2b (80%), Glu-B2c (13.33%) et Glu-B2d (6.66%).

**Tableau 15** : Nomenclature allélique des SC-HPM et SG-FPM des blés apparentés

Accessions	Variétés ou lignées	Pedigree	Gen	Glu-A1	Glu-B1	Glu-A3	Glu-B3	Glu-B2
Acc 1	T.POLONICUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-34	c	i	h	c	c
Acc 2	T.POLONICUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-34	c	i	a	a	b
Acc 3	T.POLONICUM1 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-30	a	i	c	a	c
Acc 4	T.POLONICUM1 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-30	c	b	a	a	b
Acc 5	T.POLONICUM1 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-29	c	d	b	b	b
Acc 6	T.POLONICUM1 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-29	c	d	a	a	b
Acc 7	T.POLONICUM9 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-22	a	b	a	b	b
Acc 8	T.POLONICUM9 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-22	c	a	b	a	b
Acc 9	T.POLONICUM9 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-21	c	d	a	a	c
Acc 10	T.POLONICUM9 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-21	c	b	c	a	b
Acc11	T.POLONICUM9 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-21	c	b	a	a	b
Acc 12	T.DICOCCUM3 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-19	c	b	b	a	b
Acc 13	T.DICOCCUM3 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-19	c	d	c	b	b
Acc 14	T.DICOCCUM3 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-14	c	b	a	a	b
Acc 15	T.DICOCCUM3 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-14	c	b	h	a	b
Acc 16	T.DICOCCUM3 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-12	c	a	b	e	b
Acc 17	T.DICOCCUM3 X MRB5	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-12	c	a	a	a	b
Acc 18	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-07	a	a	b	a	d
Acc 19	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-07	a	b	b	b	b
Acc 20	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-07	a	b	a	a	b
Acc 21	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-05	a	a	c	c	b
Acc 22	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-05	a	a	a	b	b
Acc 23	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-04	a	a	a	a	b
Acc 24	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-2K	F4-04	c	d	c	g	b
Acc 25	T.DICOCCUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-1K	F4-04	c	d	h	d	b
Acc 26	T.DICOCCUM X CHAM1	F7 BLE DUR APPA	F6-10	a	b	a	d	b
Acc 27	T.DICOCCUM X CHAM1	F7 BLE DUR APPA	F6-04	c	b	a	b	c
Acc 28	T.DICOCCUM X CHAM1	F7 BLE DUR APPA	F6-02	a	b	a	b	b
Acc 29	T.DICOCCUM X CHAM1	F7 BLE DUR APPA	F6-01	a	b	a	a	b
Acc 30	T.POLONICUM1 X CHAM1	MPT-0KB-0KB-0KB-3K	F4-34	c	i	b	e	d



**Figure 10** : Diagrammes types Correspondant aux SG-HPM rencontrés chez les 30 accessions : a- Acc 29 ; b- Acc 19 ; c- Acc2 ; d- Acc 3 ; f- Acc 6 ; g- Acc 8

#### 4. VARIABILITE DES SG-HPM ET DES SG-FPM DES AEGILOPS

---

Les analyses électrophorétiques des espèces étudiées par SDS-PAGE ont portées au moins sur 5 grains par accession. Les électrophoregrammes obtenus montrent que la majorité des accessions sont homogènes, deux seulement se sont avérées non homogènes, il s'agit d'*Ae. caudata* (Grèce-Thessalia) et d'*Ae. neglecta* (Algérie-Khenchela)

Les deux électrophorégrammes de chacune des deux accessions non homogènes sont donnés à la figure (11A). La différence existe pour tout le spectre électrophorétique (SG-HPM et SG-FPM). Seules les accessions homogènes ont été retenues.

La lecture des diagrammes concerne les zones A et B et consiste à faire une analyse descriptive (nombre de bandes et mobilités). Ensuite une nomenclature allélique a été dressée pour les SG-HPM et une typologie pour les SG-FPM (zone B) (tableaux 16 et 17). La nomenclature allélique des SG-HPM codées par les loci Glu-U1, Glu-M1 et Glu-D1 est établie selon celle proposée par Rodriguez - Quijano *et al.*, (2001). Pour les SG - HPM codées par les locus Glu-D1, la nomenclature de Branlard *et al.*, (1990) a été appliquée. Pour les SG-HPM codées par le locus Glu-N1 une nouvelle nomenclature a été proposée.

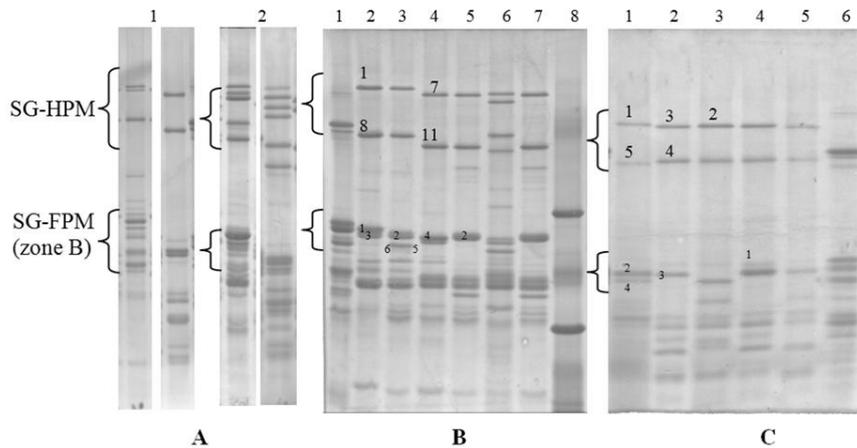
##### 4.1. Variabilité trouvée chez les espèces diploïdes

*Aegilops umbellulata* (figure 11B)

Au niveau de la zone A chaque diagramme renferme deux SG-HPM, différentes par leurs mobilités relatives: la première du type x- et la deuxième de type y-. Selon Rodriguez-Quijano *et al.*, (2001), le poids moléculaire des bandes du type x- se situe entre 125 et 134 KDa et celui des bandes du type y- varie entre 90 et 98 KDa. Toutes les bandes du type x- sont localisées au dessus de la bande 2.2 du témoin utilisé (blé tendre florence aurore). Rodriguez-Quijano *et al.*(2001) ont trouvé que ces sous unités sont localisées dans le gel entre les bandes 1 et 2.2 des blés tendres variétés Danchi et Hope. Alors que les bandes du type y- se trouvent au dessous de la bande 12 de la variété Danchi. Deux diagrammes seulement ont été répertoriés : le premier 1+8 correspond à l'allèle Glu-U1a et le second 7+11 à l'allèle Glu-U1h, sachant que l'accession *Ae. umbellulata* (Syrie-Lattakia) a été éliminée de l'étude. Ces allèles ont été précédemment décrit par Rodriguez-Quijano *et al.*, (2001).

Selon ces derniers auteurs la bande 1 exprimée par l'espèce *Ae. umbellulata* a la même poids moléculaire que la bande 2.2. Cette dernière est rarement exprimée chez les blés tendres (Law et Payne, 1983) et joue un rôle important dans la qualité des blés (Nakamura, 2001). Pour cela

des espèces du genre *Aegilops* ayant cette bande peuvent être utilisées en vue de l'amélioration de la qualité. Au locus Glu-U3 une faible diversité génétique a été enregistrée au niveau de la zone B traduite par l'expression d'un nombre limité de bandes : entre 1 et 3 pour chaque diagramme (tableau 16). Cette variabilité est similaire à celle trouvée par Rodriguez-Quijano *et al.*, (1997) en analysant une collection de 3 espèces diploïdes du génome A : *Triticum boeoticum*, *T. urartu* et *T.monococcum*.



**Figure 11:** **A** Electrophorogrammes des accessions non homogènes: 1- Grèce-Thassalia 2.Algérie- Khenchela. **B** Electrophorogrammes des accessions de *Ae. umbellulata*: 1.blé dur: MBB2.Turquie-Diyarbakir3.Turquie-Elazig4.Liban 5.Syrie-El Hasakah 6.Syrie-Lattakia 7.Algérie 8. Marqueur de poids moléculaire.**C** Electrophorogrammes des accessions de *Ae.caudata* : 1.Grèce-Peloponnesus 2. Syrie-Damascus 3. Algérie-Constantine 4. Liban 5. Turquie-Edirne 6. Blé dur : Mohamed Ben Bachir

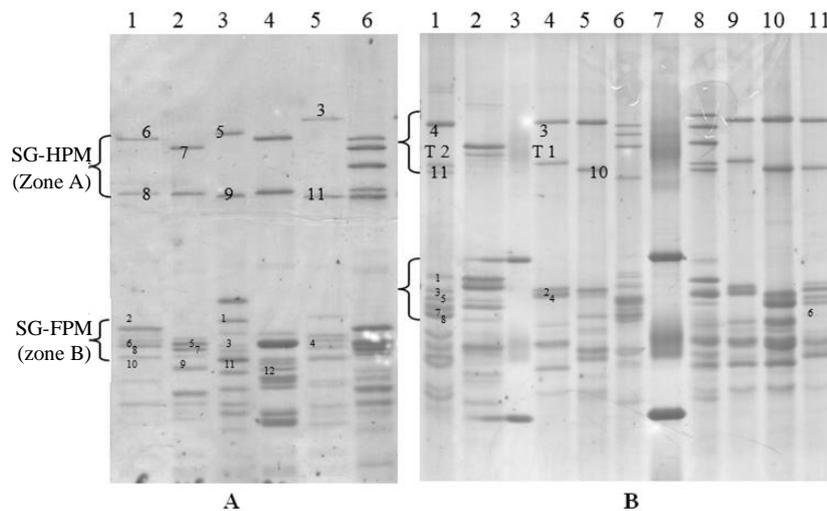
### *Aegilops caudata* (figure 11C)

Les sous unités codées par le locus Glu-C1 ont un poids moléculaire situé entre 123 et 129 KDa pour les bandes du type x- et entre 94 et 98 KDa pour les bandes du type y- (Rodriguez-Quijano *et al.*, 2001). Les accessions analysées présentent une faible variabilité génétique traduite par la présence de trois diagrammes distincts parmi les cinq obtenus : le premier (2+4) correspond à l'allèle Glu-C1b, le deuxième (1+5) correspondant à l'allèle Glu-C1a et le dernier (3+5) correspond à l'allèle Glu-C1c (tableau 16). Les résultats obtenus sont similaires à ceux trouvés par Rodriguez-Quijano *et al.*, (2001). Au locus Glu-C 3 codant pour les SG-FPM une faible variabilité a été trouvée au niveau de la zone A. Chaque diagramme est composé par deux bandes au maximum et sur l'ensemble des sous unités exprimées quatre seulement sont de différentes mobilités (tableau 16).

### *Aegilops comosa* (figure 12A)

Les diagrammes des accessions de l'espèce *Ae. comosa* sont complètement différents l'un de l'autre. Comparativement aux deux espèces décrites ci-dessus (*Ae. umbellulata* et *Ae. caudata*) celles d'*Ae. comosa* semblent plus diversifiées. Le locus Glu-M1 exprime deux sous unités l'une du type x- avec un poids moléculaire situé entre 120 et 137 KDa et l'autre du type y- dont le poids moléculaire varie entre 84 et 101 KDa (Rodriguez-Quijano *et al.*,2001).

Sept types de bandes ont été observés. Ces résultats se rapprochent de ceux trouvés par Rodriguez-Quijano *et al.*,(2001) où sur les 33 accessions analysées, 11 types de bandes ont été dénombrés. Un nouveau allèle non décrit est recensé, il s'agit des sous unités 6+8 auquel on a attribué l'allèle Glu-M1q (tableau 16). Au locus Glu-M 3, une importante variabilité a été relevée, chaque diagramme renferme selon les accessions de 3 à 5 bandes. Sur l'ensemble des bandes exprimées 12 types ont été recensées (tableau 16). Selon Rodriguez-Quijano *et al.*, (1997) cette variabilité est rarement exprimée chez les espèces diploïdes de la tribu des triticées et peut être largement exploitée pour l'amélioration de la qualité des blés cultivés.



**Figure 12:** **A** Electrophorégrammes des accessions de *Ae.comosa*: 1.Turquie-Denizli 2.Grèce-Attica 3. Grèce - Epirus 4.Turquie-Izmir 5.Grèce-Peloponnesus 6. Blé tendre: Florence Aurore **B** Electrophorégrammes des accessions d'*Ae.tauschii* : 1. Algérie - Sétif 2. blé dur : MBB 3. Marqueur de poids moléculaire marqueur 4.Algérie - Constantine 5. Arménie-Sjunik 6. Syrie-Alep 7. Marqueur de poids moléculaire 8. Blé tendre: Ziad 9. TKM-Ashkhabad 10. Syrie-Raqqa 11..Pakistan - Balokistan

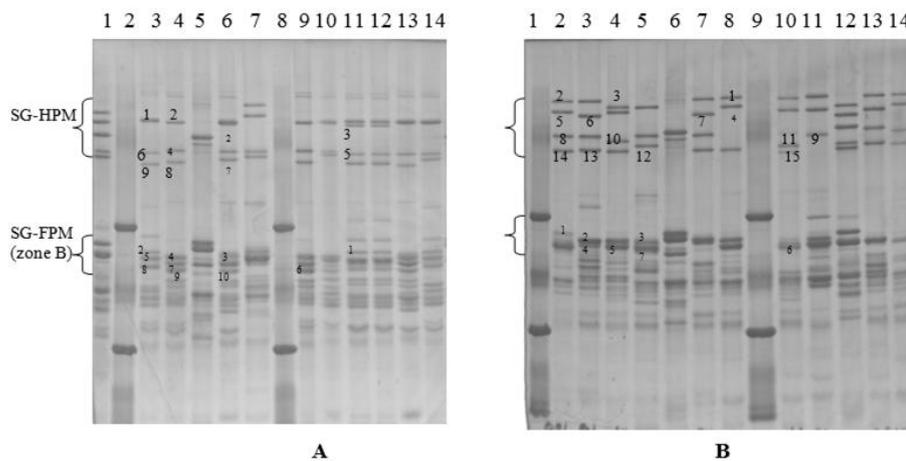
### *Aegilops tauschii* (figure 12B)

Au locus Glu-D1, une faible variabilité génétique a été notée. Six bandes de différentes mobilités ont été dénombrées, sachant que l'accession (figure 12B, ligne 6) n'a pas été retenue du fait l'électrophorégramme obtenu indique nettement qu'il ne s'agit pas d'une espèce diploïde. Ce locus code pour 2 sous unités (types x- et y-) sauf l'accession *Ae. tauschii*

(Algérie-Sétif) où 3 ont été dénombrées. Les sous unités qui n'ont pas été répertoriées chez les blés tendres sont symbolisées par T1 et T2. Lagudah et Halloran (1988) et William *et al.*, (1993) ont décrit les sous unités 2+T1+T2. Au locus Glu-D3, le nombre de bandes varie entre 2 et 5 pour chaque diagramme. La diversité des SG-FPM est plus ou moins importante où 8 types de bande ont été dénombrés (tableau 16). Selon Yan *et al.*, (2002) ce polymorphisme peut être largement exploité pour l'amélioration de la qualité des blés tendres.

#### 4.2. Variabilité trouvée chez les espèces tétraploïdes

Chez les espèces tétraploïdes, deux génomes contribuent à l'expression des sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire. Le polymorphisme détecté est plus important que celui exprimé chez les diploïdes avec quelques exceptions.



**Figure 13 :** **A** Electrophorogrammes des accessions de *Ae.ventricosa* : 1. Blé tendre : Ziad 2. Marqueur de poids moléculaire 3. Algérie-sétif 4. Algérie-Souk Ahras 5. Blé dur : MBB 6. Algérie-Constantine 7. Algérie-Tiaret 8. Marqueur de poids moléculaire 9. Maroc-Oujda 10. Maroc-Fes 11. Libye-El Mardj 12. Algérie-Médéa 13. Egypte-Marsa Matruh 14. Algérie-Kenchela **B** Electrophorogrammes des accessions de *Ae.geniculata* 1. Marqueur de poids moléculaire 2. Algérie-Guelma 3. Algérie-Médéa 4. Algérie-Tiaret 5. Algérie-Oum ElBouagui 6. Blé dur : MBB 7. Algérie-Constantine 8. Syrie-Damascus 9. Marqueur de poids moléculaire 10. Liban- Baabdal 11. Libye-Ghryan 12. Blé tendre : Ziad 13. Algérie- Tizi Ouzou 14. Algérie-Tlemcen

#### *Aegilops ventricosa* (figure 13A)

Cette zone de diagramme est sous la dépendance de deux loci multigéniques: Glu-D1 et GluN1. L'analyse électrophorétique des 9 accessions a permis de distinguer 8 types de diagrammes parce que les accessions *Ae.ventricosa* (libye- El Marj), *Ae ventricosa* (Algérie Média) ont un diagramme commun, chaque diagramme renferme selon l'accession de 3 à 4 bandes électrophorétiques décelables chaque locus exprime une ou deux bandes l'une de type x- et l'autre y-. La majorité des diagrammes sont présentés par 3 bandes. L'absence des

bandes du type y- est déjà rencontré chez d'autres espèces tétraploïdes tels que *Ae. variabilis* (Wang *et al.*, 1997), et *Ae. cylindrica* (Morrison *et al.*, 2002). La non expression des sous unités du type x- ou du type y- est un phénomène très répandu chez les espèces polyploïdes alors que généralement pour les diploïdes ces deux sous unités sont toujours exprimées (Payne., 1987 ; Galili *et al.*, 1988). Sur l'ensemble des bandes décelées 9 sont de différentes mobilités dont la plus fréquente est la bande 1. Aux loci Glu-N3 et Glu-D3 codant pour les SG-FPM, les bandes observées sont nombreuses et le polymorphisme est moins important. 10 types de bandes ont été recensés, tous les diagrammes sont composés de 3 bandes et il convient de remarquer que la majorité des génotypes ont des diagrammes types communs. Ceci pourrait être due soit à un problème de « overlapping » des protéines qui ont le même poids moléculaire, soit à un problème de polyploïdisation qui inhibe l'expression de quelques protéines.

#### ***Aegilops geniculata*** (figure 13B)

Les SG-HPM sont codées par les deux loci Glu-U1 et Glu-M1, chaque locus code pour 1 à 2 bandes. L'analyse des diagrammes a permis de détecter une variabilité plus importante que celle trouvée chez *Ae. ventricosa* malgré que la plupart des accessions proviennent du même pays (Algérie). Dans la majorité des accessions les 2 loci expriment les 2 bandes (types x- et y-) simultanément. Sur l'ensemble des bandes exprimées 15 sont de différentes mobilités.

Les SG-FPM sont codées par les deux loci Glu-M3 et Glu-U3. Les sept types de diagrammes recensés sont constitués d'un nombre limité de bandes (de 1 à 3). Parmi les bandes exprimées sept sont de différentes mobilités. Ces résultats s'avèrent aberrants en comparaison aux diagrammes trouvés aux loci Glu-M3 et Glu-U3 des accessions des deux espèces *Ae. comosa* et *Ae. umbellulata* qui sont caractérisées par un polymorphisme beaucoup plus important. Cela s'explique peut être par le phénomène de « overlapping » qui se manifeste entre les protéines qui ont des poids moléculaires similaires.

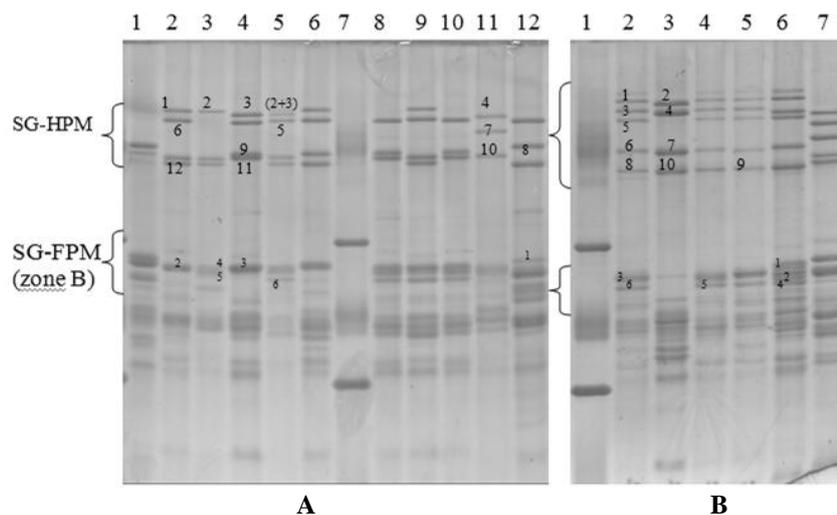
#### ***Aegilops triuncialis*** (figure 13B)

Les deux génomes constitutifs de cette espèce contribuent à l'expression des SG-HPM par les loci : Glu-U1 et Glu-C1. Comme pour les deux espèces tétraploïdes décrites ci-dessus, pour chaque diagramme le nombre de sous unités gluténines varie de 3 à 4 dont chaque locus contribue à l'expression de 1 à 2 bandes. Un total de 12 sous unités de mobilités différentes a été dénombré. Pour les SG-FPM de la zone B six bandes de différentes mobilités ont été

exprimées, chaque diagramme renferme de 1 à 3 bandes et tous les accessions ont des diagrammes types qui leurs sont propre.

### *Aegilops neglecta* (figure 13B)

Concernant les SG-HPM, tous les diagrammes sont composés de 5 à 6 bandes ce qui indique nettement que les différentes accessions sont des hexaploïdes, à l'exception de *Ae. neglecta* (Turquie-Diyarbakir) qui est un tétraploïde où 4 bandes ont été dénombrées. Chacun des trois loci : Glu-U1, Glu-M1 et Glu-N1 contribue à l'expression d'une ou deux bandes (types x- et y-). Sur l'ensemble des bandes exprimées 10 sont de différentes mobilités, dont les plus fréquentes sont les bandes 1 et 7. Concernant la zone B des SG-FPM, l'analyse électrophorétique a montré une très faible diversité. Parmi les quatre types de diagrammes recensés, un seulement présente cinq bandes les trois autres sont composés de 1 à 2 bandes (tableau 17). Sachant que les diagrammes des espèces diploïdes donneurs présentent une variabilité beaucoup plus importante à savoir : *Ae. umbellulata* (de 1 bande à 3), *Ae. comosa* (de 3 à 5 bandes) où il a été recensé chez ce dernier 12 types de bandes.



**Figure 7: A.** Electrophorégrammes des accessions de *Ae. triuncialis* : 1. Blé dur : MBB 2. Pakistan-Balokistan 3. Liban 4. Syrie-Idlib 5. Maroc-Marrakech 6. Turquie-Diyarbakir) 7. Marqueur de poids moléculaire 8. Algérie-Tiaret 9. Algérie-M'sila 10. Algérie-Constantine 11. Algérie-Souk-Ahras 12. Algérie-Sétif **B.** Electrophorégrammes des accessions de *Ae. neglecta* 1. marqueur de pods moléculaire 2. Portugal - Setubal 3. Turquie - Diyarbakir 4. Bulgarie - Sofiya 5. Maroc - Meknes 6. Grèce-Peloponnesus 7. blé tendre : Ziad.

**Tableau 16:** nomenclature allélique des SC-HPM et typologie des SG-FPM des accessions des espèces diploïdes.

Accession	Espèces	origine	Nomenclature allélique des SG-HPM			Typologie des SG-FPM		
			locus	allèles	diagrammes	Locus	Types	diagrammes
IG 47231	<i>Ae. tauschii</i>	Pakistan, Balûchistân	Glu-D1	j	4+10	Glu-D3	2+3+5+6	FPM III
IG 47259	<i>Ae. tauschii</i>	Syrie, Raqqa	Glu-D1	g	3+10	Glu-D3	4+7	FPM V
IG 48488	<i>Ae. tauschii</i>	TKM, Achkhabad	Glu-D1	h	3+T1	Glu-D3	2+4	FPM II
IG 117904	<i>Ae. tauschii</i>	Syrie, Alep	Glu-D1	-	-	Glu-D3	-	-
IG 127015	<i>Ae. tauschii</i>	Arménie, Sjunik	Glu-D1	g	3+10	Glu-D3	3+4	FPM IV
-	<i>Ae. tauschii</i>	Algérie, Constantine	Glu-D1	h	3+T1	Glu-D3	2+4	FPM II
-	<i>Ae. tauschii</i>	Algérie, Sétif	Glu-D1	l	4+T1+T2	Glu-D3	1+3+5+7+8	FPM I
IG 47132	<i>Ae. comosa var comosa</i>	Turquie, Denizli	Glu-M1	q	6+8	Glu-M3	2+4+6+8+10	FPM II
IG 48589	<i>Ae. comosa var. comosa</i>	Grèce, Peloponnesus	Glu-M1	c	3+11	Glu-M3	4+6+8+10	FPM IV
IG 48596	<i>Ae. comosa var. comosa</i>	Turquie, Izmir	Glu-M1	q	6+8	Glu-M3	3+7+11+12	FPM III
IG 48601	<i>Ae. comosa var. heldreichii</i>	Grèce, Epirus	Glu-M1	k	5+9	Glu-M3	1+3+8+9+10	FPM I
IG 107296	<i>Ae. comosa</i>	Grèce, Attica	Glu-M1	h	7+8	Glu-M3	5+7+9	FPM IV
IG 47757	<i>Ae. caudata</i>	Turquie, Edirne	Glu-C1	c	3+4	Glu-C3	3	FPM III
IG 48085	<i>Ae. caudata</i>	Liban, -	Glu-C1	b	2+4	Glu-C3	1+2	FPM I
IG 48733	<i>Ae. caudata</i>	Syrie, Damas	Glu-C1	c	3+4	Glu-C3	3	FPM III
IG 107296	<i>Ae. caudata</i>	Grèce, Peloponnesus	Glu-C1	a	1+5	Glu-C3	2+4	FPM II
IG 107318	<i>Ae. caudata</i>	Algérie, Constantine	Glu-C1	b	2+4	Glu-C3	4	FPM IV
IG 46964	<i>Ae. umbellulata</i>	Turquie, Diyarbakir	Glu-U1	a	1+8	Glu-U3	FPM I	1+2+3
IG 47511	<i>Ae. umbellulata</i>	Syrie, Lattakia	-	-	-	-	-	-
IG 47549	<i>Ae. umbellulata</i>	Turquie, Elazig	Glu-U1	a	1+8	Glu-U3	FPM III	2+3+6
IG 48114	<i>Ae. umbellulata</i>	Liban	Glu-U1	h	7+11	Glu-U3	FPM IV	4+5
IG 110801	<i>Ae. umbellulata</i>	Syrie, Al Hasakah	Glu-U1	h	7+11	Glu-U3	FPM II	2
-	<i>Ae. umbellulata</i>	Algérie	Glu-U1	h	7+11	Glu-U3	FPM II	2

**Tableau 17 :** Nomenclature allélique des SC-HPM et typologie des SG-FPM des accessions des espèces tétraploïdes.

accessions	espèces	origines	SG-HPM			SG-FPM		
			Loci	diagrammes	types	loci	Diagrammes	Types
IG 46571	<i>Ae. triuncialis</i>	Syrie, Idlib	Glu-C1, Glu-U1	6+9+3+11	HPM	Glu-C3, Glu-U3	3	FPM III
IG 46681	<i>Ae. triuncialis</i>	Pakistan, Balûchistân	Glu-C1, Glu-U1	1+6+10+12	HPM III	Glu-C3, Glu-U3	2	FPM II
IG 46945	<i>Ae. triuncialis</i>	Turquie, Diyarbakir	Glu-C1, Glu-U1	1+5+9+12	HPM I	Glu-C3, Glu-U3	2	FPM II
IG 48073	<i>Ae. triuncialis</i>	Liban	Glu-C1, Glu-U1	2+10+12	HPM V	Glu-C3, Glu-U3	4+5	FPM V
IG 48198	<i>Ae. triuncialis</i>	Maroc, Marrakech	Glu-C1, Glu-U1	2+3+5+10+12	HPM IV	Glu-C3, Glu-U3	3+5+6	FPM IV
-	<i>Ae. triuncialis</i>	Algérie, Tiaret	Glu-C1, Glu-U1	6+9+11	HPM IIV	Glu-C3, Glu-U3	3+5+6	FPM IV
-	<i>Ae. triuncialis</i>	Algérie, M'sila	Glu-C1, Glu-U1	1+5+10+12	HPM II	Glu-C3, Glu-U3	3+5+6	FPM IV
-	<i>Ae. triuncialis</i>	Algérie, Constantine	Glu-C1, Glu-U1	6+9+11	HPM IIV	Glu-C3, Glu-U3	3+5+6	FPM IV
-	<i>Ae. triuncialis</i>	Algérie, Souk-Ahras	Glu-C1, Glu-U1	4+7+10	HPM VI	Glu-C3, Glu-U3	4+5	FPM V
-	<i>Ae. triuncialis</i>	Algérie, Sétif	Glu-C1, Glu-U1	6+8+12	HPM VII	Glu-C3, Glu-U3	1+5+6	FPM I
IG 48382	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Tlemcen	Glu-M1, Glu-U1	2+5+9+14	HPM	Glu-M3, Glu-U3	3	FPM V
IG 48465	<i>Ae. geniculata</i>	Libye, Ghryan	Glu-M1, Glu-U1	1+6+9	HPM III	Glu-M3, Glu-U3	2+5	FPM IV
IG 48625	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Tizi-Ouzou	Glu-M1, Glu-U1	2+6+8+13	HPM I	Glu-M3, Glu-U3	3	FPM V
IG 48696	<i>Ae. geniculata</i>	Liban, Baabda	Glu-M1, Glu-U1	2+6+11+15	HPM V	Glu-M3, Glu-U3	4+6	FPM VII
IG 48732	<i>Ae. geniculata</i>	Syrie, Damas	Glu-M1, Glu-U1	1+4+14	HPM IV	Glu-M3, Glu-U3	2+5	FPM IV
-	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Constantine	Glu-M1, Glu-U1	2+8+7+13	HPM IIV	Glu-M3, Glu-U3	2+3	FPM II
-	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Oum-El-Bouagui	Glu-M1, Glu-U1	3+10+12	HPM II	Glu-M3, Glu-U3	3+4+7	FPM VI
-	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Tiaret	Glu-M1, Glu-U1	3+5+10+14	HPM IIV	Glu-M3, Glu-U3	2+5	FPM IV
-	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Medea	Glu-M1, Glu-U1	2+6+8+13	HPM VI	Glu-M3, Glu-U3	2+4	FPM III
-	<i>Ae. geniculata</i>	Algérie, Guelma	Glu-M1, Glu-U1	2+5+8+14	HPM VII	Glu-M3, Glu-U3	1+4+5	FPM I
IG 47229	<i>Ae. ventricosa</i>	Maroc, Oujda	Glu-D1, Glu-N1	2+4+5	HPM VII	Glu-D3, Glu-N3	3+6+10	FPM V
IG 47577	<i>Ae. ventricosa</i>	Egypte, Marsa Matruh	Glu-D1, Glu-N1	1+5+9	HPM V	Glu-D3, Glu-N3	3+7+10	FPM VI
IG 47993	<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie, Medea	Glu-D1, Glu-N1	1+3+5	HPM I	Glu-D3, Glu-N3	1+5+9	FPM II
IG 48174	<i>Ae. ventricosa</i>	Libye, Al Marj	Glu-D1, Glu-N1	1+3+5+8	HPM II	Glu-D3, Glu-N3	1+5+9	FPM II
IG 48224	<i>Ae. ventricosa</i>	Maroc, Fès	Glu-D1, Glu-N1	1+4+5	HPM III	Glu-D3, Glu-N3	3+5+10	FPM IV
-	<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie, Sétif	Glu-D1, Glu-N1	1+6+9	HPM VI	Glu-D3, Glu-N3	2+5+8	FPM III
-	<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie, Souk-Ahras	Glu-D1, Glu-N1	2+4+8	HPM VIII	Glu-D3, Glu-N3	4+7+9	FPM VII
-	<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie, Constantine	Glu-D1, Glu-N1	2+4+7	HPM IX	Glu-D3, Glu-N3	3+6+10	FPM V
-	<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie, Tiaret	Glu-D1, Glu-N1	-	-	Glu-D3, Glu-N3	-	-
-	<i>Ae. ventricosa</i>	Algérie, Khenchela	Glu-D1, Glu-N1	1+4+6	HPM IV	Glu-D3, Glu-N3	1+4+8	FPM I
IG 46686	<i>Ae. neglecta</i>	Portugal, Setubal	Glu-M1, Glu-U1, Glu-N1	1+3+5+6+8	HPM I	Glu-M3, Glu-U3, Glu-N3	3+6	FPM IV
IG 46968	<i>Ae. neglecta</i>	Turquie, Diyarbakir	Glu-M1, Glu-U1, Glu-N1	2+4+7+10	HPM IV	Glu-M3, Glu-U3, Glu-N3	3	FPM II
IG 48246	<i>Ae. neglecta</i>	Maroc, Meknes	Glu-M1, Glu-U1, Glu-N1	1+4+5+7+9	HPM III	Glu-M3, Glu-U3, Glu-N3	3+5	FPM III
IG 48356	<i>Ae. neglecta</i>	Bulgarie, Sofiya	Glu-M1, Glu-U1, Glu-N1	1+3+5+7+8	HPM II	Glu-M3, Glu-U3, Glu-N3	3+5	FPM III
IG 107349	<i>Ae. neglecta</i>	Grèce, Peloponnesus	Glu-M1, Glu-U1, Glu-N1	1+3+5+7+8	HPM II	Glu-M3, Glu-U3, Glu-N3	1+2+3+4+5	FPM I

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Dans nos jours, la variabilité génétique des blés cultivés a considérablement diminué à cause de l'érosion génétique. La recherche de nouvelles formes alléliques au sein des blés anciens, apparentés et sauvages demeure, désormais, une nécessité. De nombreuses études ont été effectuées pour évaluer les germoplasms conservés dans les banques mondiales tels que l'ICARDA et le CYMMIT (Balfourier *et al.*, 2007). 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 (Yan *et al.*, 2003; Pflüger *et al.*, 2001; Vallega et Waines, 1987).

la connaissance des caractères biochimiques est l'un des moyens les plus utilisés pour l'évaluation des ressources phytogénétiques. Les sous unités protéiques révélées par ces techniques constituent des empreintes génétiques permettant de distinguer entre espèces, variétés et même accessions. Selon Branlard *et al.*, (2001), il ressort que les observations des protéines de réserve s'avèrent plus informatives pour identifier les variétés et devenir un critère d'amélioration de la qualité du blé.

Dans ce travail, nous avons engagé un programme d'identification des protéines de réserve de nombreuses collections constituant la base des ressources génétiques des blés cultivés et de leurs apparentés en Algérie. Dans les paragraphes suivants sont synthétisés les résultats obtenus de cette étude :

1. Les blés dur et tendre cultivés en Algérie ont montré une importante variabilité génétique. Chez les variétés de blé tendre 3, 6 et 5 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. Au loci Glu-A3, Glu-B3 et Glu-B2 codant pour les SG-FPM, 5, 9 et 2 allèles sont identifiés respectivement. Il est important de mentionner que des nouvelles formes allélique ont été trouvés chez le blé dur au locus glu-A3. 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 ( Nieto-Taladriz *et al.*, 1997, 2000, Carrillo *et al.*,

2000). 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 (du Cros 1987).

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 (Boeuf, 1932). En 1930, Ducellier a décrit toutes les espèces cultivées en Algérie. A son époque, il a pu identifier 29 variétés locales. Trente ans après, Laumont and Erroux (1961) et Grignac (1965) mentionnent que certaines de ces variétés ont été perdues, et un total de 22 variétés locales sont confirmées.

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. L'analyse des groupement thiols de l'une des nouvelles bandes (20y<sub>1</sub>) a permis de dénombrer sept résidus cystéines au lieu de 6 seulement pour la bande 20y de l'allèle Glu-B1e. L'allèle (Glu-B1e<sub>1</sub>) codant pour cette sous unité est potentiellement favorable pour l'élongation des polymères de gluténines et donc pour l'amélioration des propriétés rhéologiques.

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. Avoir des échantillons représentatif 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. L'analyse des diagrammes électrophorétiques des 30 blés durs apparentés nous a permis de recenser un ensemble de 9 types de diagrammes. Ce nombre plus ou moins élevé reflète le grand polymorphisme des SG-HPM de cette collection.

Il serait bien d'évaluer la qualité technologique de ces blés issus de croisement interspécifique entre blé cultivé et blés apparentés (*T. dicoccum* et *T. polonicum*).

4. Pour les espèces du genre *Aegilops*, les sous-unités-gluténines de haut poids moléculaire sont contrôlées par des gènes portés sur les bras longs des chromosomes homéologues du groupe 1, les loci sont nommés : Glu-U1, Glu-M1, Glu-C1, Glu-D1 et Glu-N1. Un total de 48 allèles a été dénombré pour les 5 loci parmi lesquels 34 sont des nouvelles formes.

En ce qui concerne le locus Glu-U1, la variabilité rencontrée est assez importante par rapport aux autres loci. Au total 16 allèles ont été répertoriés où 13 sont des nouvelles formes qui sont exprimées chez les espèces tétraploïdes. Ce grand polymorphisme s'explique par le nombre élevé d'accessions analysées possédant le génome U (au nombre de 30).

Le locus Glu-M1 est représenté par 20 accessions, 11 allèles ont été identifiés dont 6 sont déjà décrits par Rodriguez-Quijano *et al.*, (2001).

Le génome D est représenté par 16 accessions. Dix allèles se sont exprimés sur le locus Glu-D1, deux (Glu-D1c et Glu-D1d) ont été précédemment décrits par Payne et Lawrence (1983), les huit restants sont de nouvelles formes.

Au locus Glu-C1, il y a moins de variation allélique par rapport aux autres loci car seulement neuf allèles ont été observés, sachant que le génome C est représenté par le nombre le plus faible d'accessions (15 accessions).

Concernant le locus Glu-N1, la description du polymorphisme n'avait jamais été conduite jusqu'ici. Pour cela nous avons proposé notre propre nomenclature composée de six allèles.

La diversité des sous unités gluténines FPM de la zone B a été appréciée. Cette zone est encore difficile à interpréter car les sous unités gluténines de faible poids moléculaire du type B sont souvent agrégées entre elles. Ces raisons nous ont conduit à adopter une démarche différente de celle des sous unités gluténines de haut poids moléculaire. Pour cela, une typologie des *Aegilops* a été établie. Cette zone présente aussi une variabilité importante.

L'identification de ce grand polymorphisme de déterminants génétiques intervenant dans l'expression des sous unités gluténines que présentent ces collections pourrait être utilisée 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. Ladizinsky et Hymowitz (1979) et Kyoko (2001) recommandent 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 leurs 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 rétrissement 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 tous les régions du pays.
- Evaluer ces germplasms 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.
- Pour les espèces d'*Aegilops*, les résultats trouvés doivent être confirmés par l'analyse d'une collection beaucoup plus importante couvrant toute la variabilité allélique existante dans les 11 génomes caractérisant les *Aegilops*.

## **DEUXIEME PARTIE : ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE PROTEINES DANS LE GRAIN SELON DEUX CONDITIONS DE CULTURE**

---

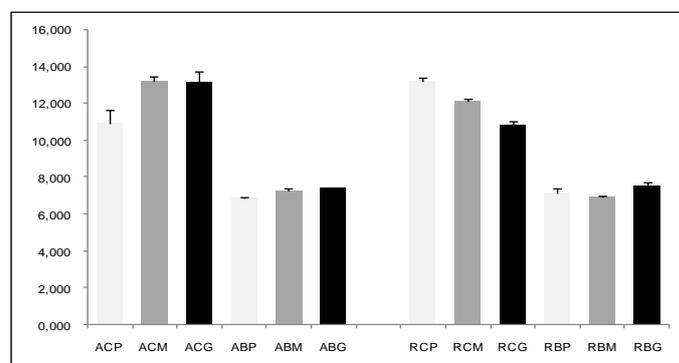
Cette partie de recherche vise principalement à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les différences apportées par la culture biologique par rapport à la culture conventionnelle au niveau des caractéristiques physiques du grain (teneur en protéines)?
- Quelle est l'influence des modes de culture « biologique ou conventionnelle » sur les processus de synthèse des protéines du grain de blé ?
- Peut-on utiliser les protéines détectées comme marqueurs indicateurs de type de culture ?

## 1. COMPARAISON DES TENEURS EN PROTEINES DES GRAINS ISSUS DES DEUX MODES DE CULTURE

Les moyennes de la teneur en protéines des deux variétés cultivées en mode conventionnel sont  $12,47 \pm 0,54$  pour la variété Ataro et  $12,05 \pm 0,2$  pour la variété Renan. En mode biologique, ces moyennes sont beaucoup plus faibles, elles sont de l'ordre de  $7,17 \pm 0,06$  pour la variété Ataro et de  $7,21 \pm 0,18$  pour la variété Renan (Figure 15). L'analyse de la variance a révélé que l'effet mode de culture est très hautement significatif sur la synthèse et l'accumulation des protéines ; la quantité des protéines a presque doublé chez les deux variétés cultivées en conventionnel. Il n'existe pas de différence significative pour un mode de culture donné entre les deux génotypes de notre étude, pour la teneur en protéines, On observe, par contre, une augmentation de la teneur en protéines dans les grains moyens et gros quelque soit la variété et le mode de culture.

Nos résultats se rapprochent de ceux trouvés par Zorb *et al.*, (2009a) qui sur le blé d'hiver (*T. aestivum* L.cv. Runal) cultivé en modes biologique et conventionnel ont trouvé des moyennes de l'ordre de  $10,7 \pm 0,1$  et de  $14,5 \pm 0,2$  respectivement. Selon Hilderman *et al.*, (2009), les rendements et la teneur en protéines des grains produits en agriculture biologique sont



**Figure 15 :** distribution des teneurs en protéines des grains d'Ataro (A) et Renan (R) selon le mode Biologique et Conventionnel (B et C) et leur taille Petit, Moyen et Gros (P, M, G)

généralement très variables et inférieurs à ceux observés en agriculture conventionnelle. Satu *et al.*, (2007) rapportent que les différences dans la teneur en protéines entre les deux modes de culture s'expliquent par la disponibilité de l'azote dans le sol. L'azote minérale appliqué dans l'agriculture conventionnelle est soluble dans l'eau du sol et est immédiatement assimilé par les racines tandis que l'azote fourni pour les cultures biologiques est organique, sous forme de composts, qui contiennent moins de 1% de  $\text{NH}_4$  et  $\text{NO}_3$  soluble dans l'eau. Cet azote ne devient accessible pour les plantes qu'après sa dégradation séquentielle par la microflore du sol.

## 2. COMPARAISON DES PROFILS MONODIMENSIONNELS DES PROTEINES

Les techniques électrophorétiques nous ont permis de déterminer les variations dans la synthèse et l'accumulation des protéines du grain mature, dues aux différents modes de culture. Trois classes de taille de grain (Tableau 18) sont prises en considération dans l'ensemble des analyses effectuées. Les fractions protéiques présentes au stade mature à savoir : les gluténines, les gliadines et les albumines-globulines des variétés Ataro et Renan cultivées en mode biologique et conventionnel sont illustrées sur les profils monodimensionnels de la figure 16. Les analyses statistiques sont faites sur des données qui correspondent à des volumes densitométriques estimés par le logiciel Quantity One après avoir délimité le contour des bandes qui sont bien distinctes sur les gels (exemple figure 7d).

**Tableau 18** : Classes de tailles déterminées selon le poids en mg des grains

	rep	Renan biologique	Renan conventionnel	Ataro biologique	Ataro conventionnel
gros grains	R1	56,55	55,52	51,49	55,05
	R2	55,00	55,42	51,45	54,85
grains moyen	R1	46,60	47,38	46,09	47,46
	R2	46,85	49,04	46,07	47,38
petit grains	R1	35,44	28,38	30,95	27,50
	R2	35,70	28,89	30,91	26,64

Pour minimiser les variations induites par les fluctuations d'intensité de coloration de gel et celles inhérentes à la définition des contours des bandes, les résultats utilisés ont été exprimés en pourcentage de volume et non en volume densitométrique. Le % de volume de la bande considérée est exprimé en rapportant son volume densitométrique au volume total des bandes de la même piste. Ceci nous permet ainsi de comparer plus justement les résultats obtenus pour un groupe de bandes, même si les gels ne sont pas colorés de manière uniforme entre eux.

### 2.1. Analyse des profils électrophorétiques monodimensionnels des protéines de réserve

**Gluténines** : Pour la variété Renan, le mode de culture a un effet global significatif sur l'expression des protéines de réserve dans le grain (tableau 19). Les variations dans l'expression des cinq sous unités gluténines de haut poids moléculaire (2\*, 7-8 et 5-10) de la zone A codées par les allèles Glu-A1b, Glu-B1b et Glu-D1d respectivement (figure 16A) entre les deux modes de culture sont significatives ( $0,01 < F \text{ test} < 0,05$ ) pour la sous unités 5, hautement significatives ( $0,001 < F \text{ test} < 0,01$ ) pour les sous unités 7 et 10 et très hautement significatives ( $F \text{ test} < 0,001$ ) pour les sous unités 2\* et 8.

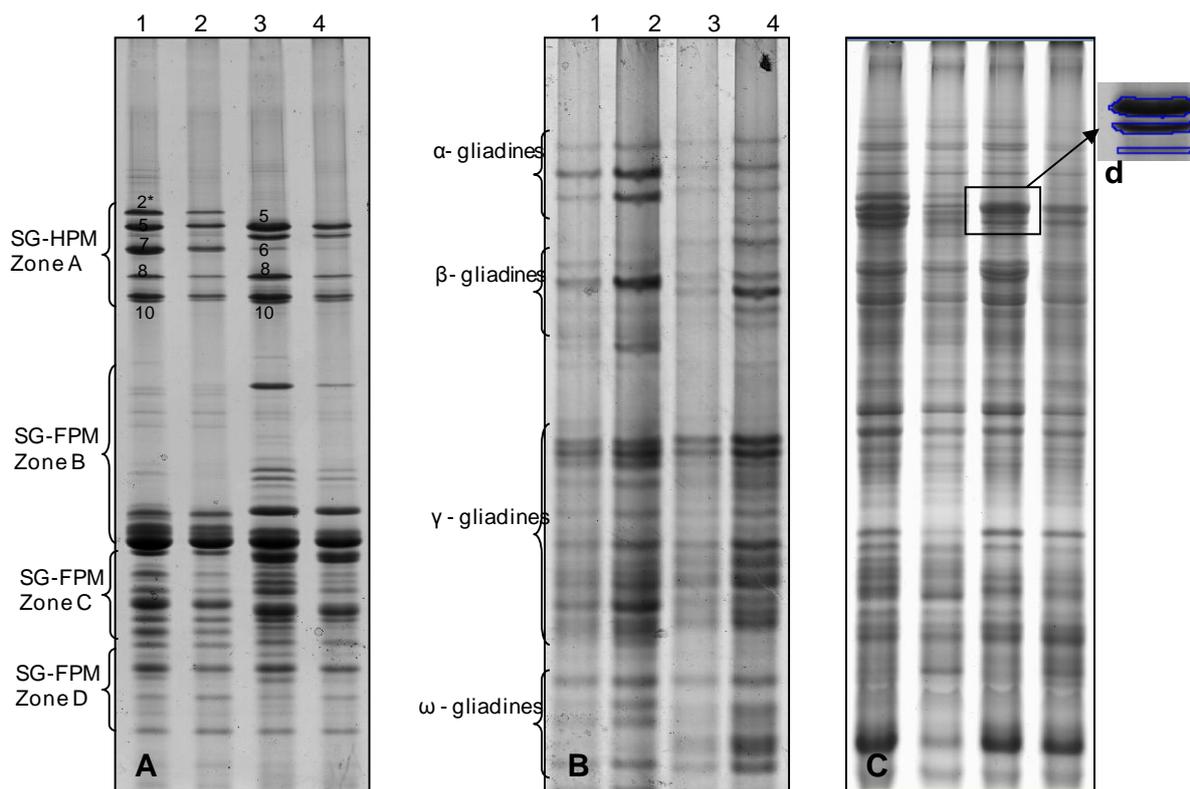
Des variations significatives entre les deux modes de culture sont aussi trouvés pour les sous unités gluténines de faible poids moléculaire de la zone B au nombre de 5 exprimées par les allèles Glu-A3a, Glu-B3c et Glu-D3b. Les bandes recensées dans les zones C et D sont au nombre de 7 dont 4 présentent des variations significatives attribuées au mode de culture.

L'effet de la taille des grains est moyennement significatif. Sur les cinq bandes correspondantes aux SG-HPM de la variété Renan, deux seulement varient significativement tandis que pour les SG-FPM, 8 bandes sur 12 présentent des variations significatives. L'interaction mode de culture x taille a un effet globalement peu important, l'effet est hautement significatif seulement pour deux bandes de FPM.

Comme pour la variété Renan, les SG-HPM de la variété Ataro (tableau 20) à savoir : 5-10 et 6-8 codées par les allèles Glu-D1d et Glu-B1d respectivement, sont significativement différentes entre les deux modes de culture. Il est à noter que le diagramme des SG-HPM codées par chaque allèle renferme deux bandes différentes par leurs mobilités relatives : la première du type x- est plus lente que la deuxième du type y. Les variations présentes par les bandes de type y- (10 et 8) sont très hautement significatives. Quatorze bandes correspondant aux SG-FPM sur les 15 recensées présentent de variations significatives à très hautement significatives. L'effet des trois classes de taille de grain sur l'expression protéique est moyennement significatif. Deux bandes de HPM sur 4 et 4 sur 15 de FPM semblent ne pas être influencées par la taille de grain.

- Gliadines : De nombreuses gliadines chez les deux variété étudiées (figure 16B) se sont avérées affectées par le mode de culture (5 bandes sur 16 chez la variété Renan et 11 sur 22 chez la variété Ataro) (tableau 21 et 22).

Les conditions environnementales, telles que l'apport d'engrais azoté et la température, affectent la quantité, la composition des protéines de gluten (Panozzo et Eagles, 2000; Johansson *et al.*, 2001). Nos résultats sont en accord avec la conclusion de Prugar (1999) et Graveland *et al.*, (1996) qui ont trouvé que la fertilisation azotée utilisée dans les cultures conventionnelles augmente la part des fractions protéiques typiques du gluten (gluténines et gliadines). Une augmentation du pourcentage de ces fractions dans les protéines totales conduit à une amélioration de la qualité technologique des blés mais, par contre, conduit à une diminution de la valeur biologique et nutritionnelle des protéines car les acides aminés essentiels se trouvent principalement dans la fraction albumines-globulines (Bushuk 1989). Krejcirova *et al.*, (2007) ont observé que les pourcentages des volumes des SG-HPM des variétés cultivées en mode conventionnel avaient doublé en comparaison avec ceux des variétés cultivées en mode biologique.



**Figure 16 :** Profils électrophorétiques monodimensionnels des protéines de réserve (Glutamines et Gliadines) et protéines du métabolisme (albumines-globulines) extraites à partir de la farine des grains de taille moyenne.

**A :** Profils électrophorétiques (en SDS-PAGE) des sous-unités glutamines de haut et faible poids moléculaire. 1. Variété Renan en mode conventionnel ; 2. Variété Renan en mode biologique ; 3. Variété Ataro en mode conventionnel ; 4. Variété Ataro en mode biologique.

**B.** Profils électrophorétiques (en Acid-PAGE) des gliadines. 1. Variété Renan en mode biologique ; 2. Variété Renan en mode conventionnel ; 3. Variété Ataro en mode biologique ; 4. Variété Ataro en mode conventionnel.

**C.** Profils électrophorétiques (en SDS-PAGE) des Albumines-Globulines. 1. Variété Renan en mode conventionnel ; 2. Variété Renan en mode biologique ; 3. Variété Ataro en mode conventionnel ; 4. Variété Ataro en mode biologique.

**d :** Exemples de bandes contournées par le logiciel quantity-one

Les différences statistiquement significatives dans l'expression des SG-FPM que nous observons entre les deux modes de cultures, confirment les travaux de Zorb *et al.*, (2009b). Krejcirova *et al.*, (2007) avaient constaté que les SG-FPM ne sont pas très influencées par le mode de culture ; ce que nos résultats ne confirment pas.

Selon Wieser et Seilmeier (1998), la présence d'un excès d'engrais azoté induit des augmentations de la teneur en protéines du grain notamment des gliadines par rapport aux gluténines et des SG-HPM par rapport aux SG-FPM. Ces mêmes auteurs ont entrepris une étude quantitative détaillée sur les effets des engrais azotés sur les différents composants de gliadines et de gluténines, de 13 variétés de blé tendre, analysés la RP-HPLC. Ils ont trouvé qu'avec de l'engrais riche en magnésium, la quantité des ω-gliadines avait augmenté de 44 à 68% et celle des SG-HPM de 56 à 101%, tandis que peu de changement avait été observé dans les α et γ-gliadines et les SG-FPM.

**Tableau 19 : Moyennes des % des volumes et Anova des gluténines de la variété Renan**

	moy	bio	conv	sign	petit	moyen	gros	sign	bio x gros	bio x moyen	bio x petit	conv x gros	conv x moyen	conv x petit	sign
M-H-FPM	bd1	0,048	0,034	***	0,038	0,044	0,040	NS	0,037	0,035	0,03	0,04	0,054	0,047	NS
	bd2	0,064	0,052	*	0,056	0,058	0,060	NS	0,056	0,053	0,05	0,06	0,063	0,063	NS
	bd3	0,085	0,071	**	0,080	0,069	0,086	*	0,087	0,059	0,08	0,08	0,079	0,091	NS
	bd4	0,027	0,017	***	0,019	0,025	0,021	**	0,014	0,021	0,02	0,03	0,03	0,023	NS
	bd5	0,045	0,030	**	0,037	0,040	0,036	NS	0,029	0,033	0,03	0,04	0,047	0,045	NS
S-G-FPM	Bd6	0,048	0,065	*	0,058	0,050	0,061	NS	0,072	0,057	0,07	0,051	0,043	0,051	NS
	Bd7	0,119	0,144	***	0,133	0,129	0,133	NS	0,142	0,145	0,14	0,124	0,113	0,120	NS
	Bd8	0,204	0,218	**	0,236	0,172	0,226	***	0,25	0,19	0,25	0,229	0,165	0,230	NS
	Bd9	0,038	0,046	**	0,037	0,047	0,042	**	0,044	0,049	0,04	0,039	0,045	0,031	NS
	bd10	0,027	0,019	***	0,020	0,031	0,018	***	0,012	0,03	0,02	0,024	0,034	0,023	NS
	bd11	0,032	0,024	***	0,023	0,037	0,024	***	0,019	0,035	0,02	0,029	0,04	0,027	NS
	bd12	0,099	0,092	*	0,094	0,095	0,099	NS	0,095	0,089	0,09	0,103	0,101	0,094	NS
	bd13	0,033	0,035	NS	0,034	0,038	0,030	NS	0,026	0,04	0,04	0,033	0,036	0,03	NS
	bd14	0,032	0,035	NS	0,032	0,039	0,030	*	0,029	0,036	0,04	0,029	0,041	0,026	*
	bd15	0,026	0,031	*	0,027	0,034	0,025	*	0,026	0,041	0,03	0,023	0,027	0,028	NS
	bd16	0,042	0,046	NS	0,042	0,050	0,041	**	0,045	0,051	0,04	0,037	0,05	0,041	*
	bd17	0,015	0,027	***	0,022	0,023	0,017	*	0,02	0,029	0,03	0,014	0,016	0,013	NS

\*, \*\*, \*\*\* significatif au seuil 5%, 1% et 0.1%, respectivement

**Tableau 20: Moyennes des % des volumes et Anova des gluténines de la variété Ataro**

	moy	bio	conv	sign	petit	moyen	gros	sign	bio x gros	bio x moyen	bio x petit	conv x gros	conv x moyen	conv x petit	sign
S-G-H-FPM	bd1	0,073	0,062	*	0,071	0,060	0,071	NS	0,064	0,05	0,075	0,08	0,072	0,068	*
	bd2	0,050	0,029	***	0,039	0,039	0,041	NS	0,026	0,033	0,028	0,056	0,044	0,049	NS
	bd3	0,052	0,033	***	0,039	0,042	0,047	***	0,034	0,033	0,031	0,059	0,050	0,047	**
	bd4	0,040	0,018	***	0,031	0,033	0,022	***	0,013	0,021	0,018	0,03	0,045	0,045	*
	bd5	0,018	0,011	***	0,013	0,019	0,013	***	0,008	0,016	0,009	0,017	0,022	0,016	NS
S-G-FPM	bd6	0,017	0,014	***	0,013	0,020	0,013	***	0,01	0,019	0,0127	0,016	0,021	0,014	***
	bd7	0,091	0,106	**	0,103	0,092	0,100	NS	0,101	0,099	0,12	0,099	0,085	0,089	*
	bd8	0,058	0,072	**	0,061	0,071	0,063	NS	0,071	0,083	0,06	0,055	0,059	0,059	NS
	bd9	0,152	0,172	***	0,167	0,145	0,173	***	0,203	0,152	0,16	0,143	0,139	0,174	***
	bd10	0,058	0,072	**	0,066	0,054	0,076	***	0,081	0,059	0,074	0,070	0,048	0,057	NS
	bd11	0,038	0,059	***	0,045	0,056	0,043	*	0,061	0,066	0,049	0,026	0,046	0,041	*
	bd12	0,025	0,021	*	0,022	0,027	0,019	**	0,014	0,027	0,021	0,024	0,027	0,023	*
	bd13	0,031	0,020	***	0,029	0,027	0,021	**	0,016	0,024	0,022	0,028	0,031	0,036	NS
	bd14	0,045	0,031	**	0,039	0,043	0,031	*	0,02	0,038	0,031	0,038	0,048	0,048	NS
	bd15	0,091	0,099	NS	0,085	0,104	0,096	NS	0,101	0,113	0,084	0,091	0,095	0,087	NS
	bd16	0,030	0,039	***	0,039	0,025	0,038	***	0,042	0,027	0,047	0,035	0,023	0,031	NS
	bd17	0,025	0,031	**	0,031	0,023	0,030	**	0,034	0,026	0,035	0,026	0,021	0,027	NS
	bd18	0,039	0,043	*	0,041	0,041	0,041	NS	0,039	0,041	0,05	0,044	0,0417	0,031	**
	bd19	0,012	0,021	***	0,015	0,022	0,013	***	0,014	0,027	0,02	0,011	0,017	0,009	*

\*, \*\*, \*\*\* significatif au seuil 5%, 1% et 0.1%, respectivement

**Tableau 21: Moyennes des % des volumes et Anova des gliadines de la variété Renan**

	moy	conv	bio	sign	petit	moyen	gros	sign	bio x gros	bio x moyen	bio x petit	conv x gros	conv x moyen	conv x petit	sign
bd1	0,016	0,014	NS	NS	0,012	0,017	0,015	NS	0,016	0,015	0,01	0,014	0,019	0,0146	NS
bd2	0,026	0,016	*	*	0,024	0,021	0,019	NS	0,01	0,012	0,02	0,025	0,029	0,025	NS
bd3	0,020	0,026	NS	NS	0,027	0,021	0,021	NS	0,025	0,019	0,033	0,018	0,022	0,021	NS
bd4	0,032	0,037	NS	NS	0,031	0,041	0,031	*	0,0337	0,041	0,035	0,027	0,040	0,027	NS
bd5	0,060	0,037	***	**	0,044	0,058	0,043	**	0,028	0,044	0,037	0,057	0,071	0,051	NS
bd6	0,089	0,117	***	*	0,109	0,098	0,102	NS	0,13	0,102	0,12	0,076	0,093	0,098	*
bd7	0,095	0,114	*	*	0,113	0,090	0,111	*	0,124	0,092	0,127	0,098	0,087	0,099	NS
bd8	0,040	0,045	NS	NS	0,042	0,042	0,044	NS	0,044	0,044	0,048	0,044	0,039	0,036	NS
bd9	0,078	0,079	NS	NS	0,070	0,080	0,086	NS	0,085	0,072	0,081	0,086	0,088	0,060	NS
bd10	0,103	0,090	NS	NS	0,094	0,104	0,092	NS	0,102	0,0087	0,092	0,107	0,105	0,095	NS
bd11	0,129	0,117	NS	NS	0,111	0,131	0,127	NS	0,121	0,015	0,13	0,097	0,13	0,12	NS
bd12	0,066	0,066	NS	NS	0,066	0,061	0,071	NS	0,069	0,067	0,061	0,073	0,055	0,069	NS
bd13	0,041	0,052	**	*	0,045	0,049	0,045	NS	0,045	0,057	0,052	0,042	0,041	0,039	NS
bd14	0,052	0,044	NS	NS	0,052	0,048	0,045	NS	0,045	0,045	0,042	0,044	0,049	0,062	NS
bd15	0,107	0,090	NS	NS	0,108	0,088	0,100	NS	0,094	0,086	0,091	0,10	0,09	0,125	NS
bd16	0,047	0,054	NS	NS	0,049	0,054	0,049	NS	0,047	0,067	0,048	0,011	0,040	0,051	NS

\*, \*\*, \*\*\* significatif au seuil 5%, 1% et 0.1%, respectivement

**Tableau 22:** Moyennes des % des volumes et Anova des gliadines de la variété Ataro

moy	conv	bio	sign	petit	moyen	gros	sign	Bio x Gros	Bio x Moyen	Bio x Petit	Conv x Gros	Conv x Moyen	C onvx Petit	sign
bd1	0,017	0,014	NS	0,011	0,021	0,014	***	0,010	0,021	0,01	0,017	0,021	0,011	NS
bd2	0,056	0,037	***	0,034	0,062	0,045	***	0,033	0,055	0,023	0,056	0,067	0,04	NS
bd3	0,047	0,020	***	0,027	0,041	0,032	***	0,018	0,023	0,018	0,046	0,058	0,035	**
bd4	0,022	0,029	NS	0,028	0,025	0,024	NS	0,028	0,024	0,033	0,019	0,025	0,022	NS
bd5	0,072	0,041	***	0,054	0,074	0,042	***	0,032	0,059	0,031	0,051	0,088	0,077	NS
bd6	0,028	0,027	NS	0,025	0,035	0,022	*	0,021	0,034	0,025	0,022	0,036	0,02	NS
bd7	0,044	0,023	NS	0,029	0,030	0,042	**	0,029	0,019	0,020	0,054	0,040	0,037	NS
bd8	0,048	0,071	***	0,058	0,059	0,061	NS	0,084	0,066	0,061	0,037	0,050	0,056	**
bd9	0,064	0,093	***	0,080	0,068	0,088	**	0,106	0,076	0,096	0,069	0,058	0,063	NS
bd10	0,052	0,053	NS	0,050	0,049	0,057	NS	0,061	0,052	0,046	0,054	0,046	0,055	NS
bd11	0,037	0,046	*	0,042	0,043	0,039	NS	0,044	0,050	0,044	0,034	0,035	0,040	NS
bd12	0,032	0,034	NS	0,029	0,034	0,036	NS	0,033	0,036	0,033	0,039	0,031	0,026	NS
bd13	0,048	0,051	***	0,053	0,046	0,049	NS	0,047	0,049	0,057	0,051	0,043	0,049	NS
bd14	0,032	0,047	***	0,041	0,043	0,035	NS	0,044	0,05	0,048	0,026	0,036	0,034	NS
bd15	0,056	0,062	NS	0,061	0,054	0,062	NS	0,063	0,058	0,066	0,061	0,05	0,056	NS
bd16	0,101	0,089	NS	0,105	0,084	0,097	NS	0,093	0,079	0,095	0,101	0,087	0,116	NS
bd17	0,071	0,083	*	0,099	0,051	0,081	***	0,086	0,056	0,106	0,077	0,045	0,092	NS
bd18	0,041	0,030	NS	0,032	0,045	0,030	NS	0,019	0,044	0,028	0,042	0,045	0,037	NS
bd19	0,041	0,049	NS	0,049	0,039	0,047	NS	0,052	0,036	0,06	0,043	0,043	0,037	NS
bd20	0,033	0,027	NS	0,028	0,031	0,030	NS	0,025	0,032	0,025	0,035	0,030	0,032	NS
bd21	0,028	0,037	*	0,032	0,034	0,032	NS	0,036	0,037	0,038	0,027	0,031	0,026	NS
bd22	0,031	0,036	*	0,032	0,035	0,035	NS	0,034	0,04	0,035	0,036	0,029	0,028	NS

\*, \*\*, \*\*\* significatif au seuil 5%, 1% et 0.1%, respectivement

## 2.2. Analyse des profils électrophorétiques monodimensionnels des albumines-globulines

Les albumines-globulines sont généralement classées dans ce qu'on appelle les protéines cytoplasmiques. Compte tenu de leur composition en acides aminés, ces protéines ont une qualité nutritionnelle très élevée. Les albumines sont importantes de par leur activité enzymatique et les globulines spécialement par leur effet catalytique (Dupont, 2003) . Selon certains auteurs, ces protéines sont aussi fonctionnelles comme des protéines de réserve qui servent pour la germination de l'embryon.

Les profils électrophorétiques obtenus pour cette fraction protéique sont présentés sur la figure 16C. Seulement 20 bandes ont été prises en considération dans l'analyse statistique pour la variété Renan (tableau 23). L'analyse d'image suivie d'une analyse de variance montrent un effet significatif du mode de culture. Sur les 20 bandes répertoriées, 13 présentent des différences variant de très hautement significatives ( $\alpha=0,001$ ) à significatives ( $\alpha=0,05$ ) les sept restantes ne sont pas influencées par le déficit en amendements azotés.

Le facteur taille des grains a aussi un effet significatif sur le niveau d'accumulation des albumines-globulines. En fonction des moyennes trouvées, on constate que les grains de tailles moyennes ont de nombreuses bandes ayant d'avantage accumulé d'albumines globulines.

Contrairement à la variété Renan, l'effet du mode de culture sur l'expression des albumines-globulines chez la variété Ataro (Tableau 24 ; Figure 16C) est moyennement significatif. Seulement 5 bandes sur 16 ont présenté des différences significatives. Pour cette même variété la taille des grains n'a presque aucun effet sur l'accumulation des albumines-globulines. Une seule bande sur les 16 analysées varie significativement entre les deux modes. D'après ces

résultats, nous pouvons introduire un facteur génotype dans l'interprétation; toutes les variétés ne réagissent pas de la même manière à l'absence de certains éléments minéraux. Selon de nombreux auteurs (Purccino *et al.*, (1998); LeGouis *et al.*, (2000); Masclaux (2001); Laperche *et al.*, 2007), la quantité d'azote absorbée par les racines et la remobilisation des composés azotés à partir des feuilles durant la phase du remplissage des grains sont influencées par le génotype des plantes.

Contrairement à ce que nous avons trouvé, de nombreuses études mentionnent que les quantités relatives des albumines-globulines sont diminuées dans les cultures biologiques (Wieser et Seilmeier, 1998). Tandis que Krejcirova *et al.*, (2007) rapportent que les variétés cultivées en mode organique sont caractérisées par un doublement du pourcentage des albumines-globulines par rapport à celles cultivées en mode conventionnel.

**Tableau 23 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction albumines-globulines de la variété Ataro

moy	conv	bio	sign	petit	moyen	gros	sign	Bio x Gros	Bio x Moyen	Bio x Petit	Conv x Gros	Conv x Moyen	C onvx Petit	sign
bd1	0,026	0,018	NS	0,022	0,022	0,021	NS	0,02	0,024	0,013	0,0253	0,021	0,031	NS
bd2	0,019	0,019	NS	0,015	0,027	0,015	NS	0,014	0,03	0,01	0,016	0,022	0,021	NS
bd3	0,030	0,027	NS	0,028	0,030	0,027	NS	0,022	0,036	0,023	0,032	0,025	0,032	NS
bd4	0,141	0,131	NS	0,116	0,168	0,124	NS	0,11	0,18	0,106	0,14	0,155	0,126	NS
bd5	0,085	0,084	NS	0,082	0,087	0,085	NS	0,078	0,097	0,078	0,091	0,077	0,086	NS
bd6	0,053	0,034	**	0,034	0,044	0,051	NS	0,039	0,027	0,035	0,064	0,061	0,034	NS
bd7	0,100	0,045	**	0,052	0,092	0,075	NS	0,045	0,054	0,037	0,104	0,130	0,066	NS
bd8	0,045	0,036	NS	0,040	0,035	0,046	NS	0,048	0,022	0,037	0,045	0,047	0,042	NS
bd9	0,077	0,058	NS	0,073	0,064	0,066	NS	0,063	0,054	0,058	0,07	0,07	0,09	NS
bd10	0,104	0,093	NS	0,138	0,045	0,113	***	0,103	0,037	0,139	0,124	0,052	0,14	NS
bd11	0,050	0,081	*	0,063	0,056	0,079	NS	0,12	0,061	0,071	0,045	0,050	0,055	NS
bd12	0,043	0,063	**	0,050	0,048	0,060	NS	0,074	0,055	0,059	0,045	0,041	0,041	NS
bd13	0,026	0,030	NS	0,024	0,027	0,033	NS	0,04	0,028	0,019	0,024	0,025	0,029	NS
bd14	0,032	0,046	NS	0,047	0,036	0,034	NS	0,04	0,041	0,056	0,026	0,032	0,037	NS
bd15	0,061	0,063	NS	0,067	0,066	0,053	NS	0,06	0,073	0,057	0,046	0,059	0,077	NS
bd16	0,109	0,171	**	0,149	0,153	0,117	NS	0,14	0,177	0,200	0,099	0,13	0,097	NS

\*, \*\*, \*\*\* significatif au seuil 5%, 1% et 0.1%, respectivement

**Tableau 24 :** Moyennes des % des volumes et Anova de la fraction albumines-globulines de la variété Renan

moy	conv	bio	sign	petit	moyen	gros	sign	Bio x Gros	Bio x Moyen	Bio x Petit	Conv x Gros	Conv x Moyen	C onvx Petit	sign
bd1	0,012	0,014	*	0,011	0,017	0,011	**	0,007	0,007	0,010	0,014	0,016	0,012	NS
bd2	0,013	0,012	NS	0,010	0,019	0,011	**	0,011	0,023	0,009	0,012	0,014	0,011	*
bd3	0,17	0,22	*	0,192	0,239	0,168	NS	0,146	0,359	0,168	0,190	0,118	0,214	***
bd4	0,06	0,03	***	0,037	0,047	0,048	*	0,022	0,030	0,026	0,073	0,065	0,047	*
bd5	0,08	0,04	***	0,060	0,058	0,064	NS	0,040	0,041	0,044	0,088	0,075	0,07	NS
bd6	0,07	0,04	***	0,048	0,063	0,057	*	0,03	0,051	0,034	0,084	0,074	0,063	*
bd7	0,07	0,08	*	0,082	0,067	0,072	*	0,076	0,078	0,084	0,068	0,056	0,079	NS
bd8	0,17	0,16	NS	0,152	0,214	0,140	**	0,116	0,287	0,085	0,164	0,141	0,218	***
bd9	0,35	0,30	NS	0,262	0,442	0,272	NS	0,181	0,557	0,158	0,362	0,328	0,366	*
bd10	0,04	0,05	NS	0,037	0,072	0,030	**	0,038	0,072	0,039	0,021	0,072	0,036	NS
bd11	0,04	0,04	NS	0,041	0,037	0,044	NS	0,042	0,049	0,039	0,047	0,026	0,044	NS
bd12	0,08	0,07	**	0,089	0,049	0,078	***	0,074	0,051	0,075	0,081	0,046	0,102	**
bd13	0,05	0,07	***	0,066	0,061	0,060	NS	0,067	0,071	0,071	0,053	0,051	0,061	NS
bd14	0,03	0,03	*	0,033	0,023	0,034	***	0,04	0,019	0,037	0,028	0,026	0,029	***
bd15	0,02	0,03	**	0,019	0,037	0,020	***	0,020	0,051	0,019	0,020	0,022	0,019	**
bd16	0,05	0,07	***	0,048	0,085	0,045	***	0,054	0,103	0,052	0,036	0,067	0,043	*
bd17	0,04	0,04	NS	0,034	0,045	0,038	NS	0,043	0,038	0,035	0,032	0,051	0,032	NS
bd18	0,07	0,12	**	0,118	0,053	0,120	**	0,151	0,065	0,151	0,088	0,040	0,086	NS
bd19	0,03	0,05	***	0,047	0,041	0,037	*	0,044	0,055	0,057	0,030	0,026	0,038	NS
bd20	0,14	0,13	NS	0,139	0,129	0,148	NS	0,166	0,086	0,153	0,130	0,172	0,124	***

\*, \*\*, \*\*\* significatif au seuil 5%, 1% et 0.1%, respectivement

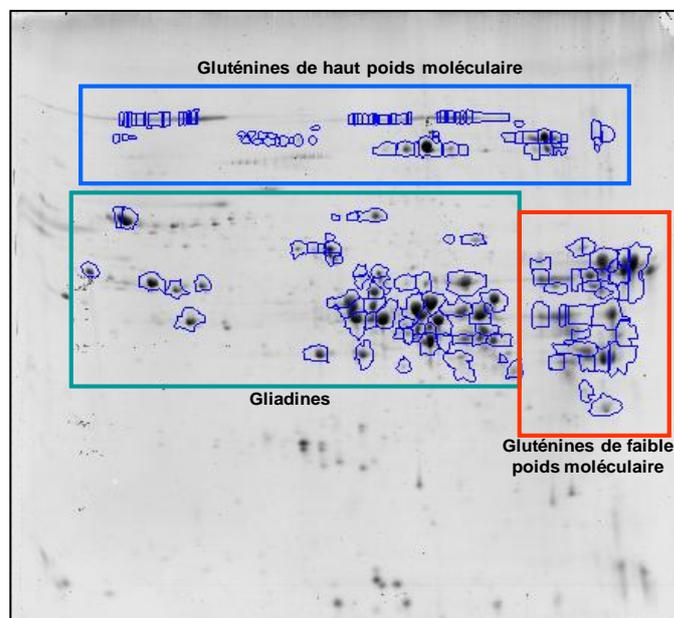
### 3. L'APPROCHE BIDIMENSIONNELLE

---

Pour avoir une vision plus claire sur la nature des protéines qui varient quantitativement voire qualitativement, nous avons entrepris une deuxième démarche afin de mieux séparer les protéines des grains. L'approche bidimensionnelle complète la monodimensionnelle et permet de déterminer la nature des protéines qui présentent des différences quantitatives et/ou qualitatives sous l'effet de mode de culture. D'autres comparaisons selon la taille des grains (tableau 18) sont aussi entreprises. Les analyses bidimensionnelles ont porté uniquement sur la variété Ataro. La variété Renan est en cours d'analyse, par conséquent les résultats finaux ne peuvent pas être rapportés dans ce document. Les analyses d'images et de variance ont été réalisées à partir de 12 gels pour chaque mode de culture (2 répétitions techniques x 2 répétitions biologiques x trois classes de tailles de grain).

#### 3.1. Analyse des protéines totales de l'albumen

Les protéines totales correspondent en majorité aux protéines de réserve (gluténines et gliadines) mais aussi à de nombreuses enzymes. De nombreux travaux antérieurs permettent de repérer les zones du gel correspondant aux gliadines et aux gluténines. Ces deux fractions sont illustrées sur la figure 17.



**Figure 17:** protéines totales (environ 611 spots) présentes chez la variété Ataro, telles que révélées après coloration au bleu de Coomassie sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle (IPG\*SDS-PAGE). Les spots encadrés correspondent aux protéines de réserve

Les albumines-globulines obtenues seront mieux visualisées en appliquant une extraction spécifique (deuxième partie de cette étude).

Dans le cadre de notre étude, l'analyse quantitative et qualitative de la composition en protéines totales d'un grain a été réalisée à partir des pourcentages de volumes de chaque spot mais l'expression des résultats peut être aussi effectuée à partir de la quantité de protéines par grain.

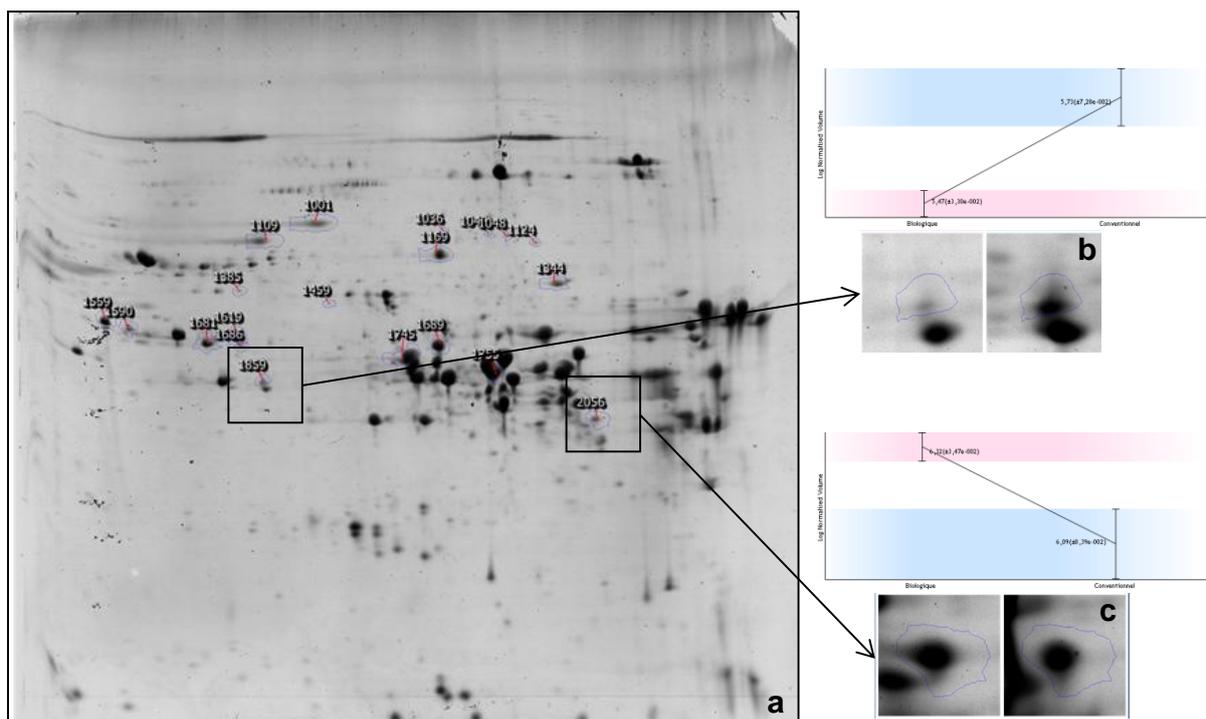
### **3.1.1. Comparaison entre modes biologique et conventionnelle pour toutes tailles de grains confondues**

Expression des protéines en pourcentage de volume pour une même quantité de protéines

La détection des spots par l'analyse d'image a fait apparaître l'ensemble des spots communs entre les 24 gels soit 611 spots pris en compte dans l'analyse de la variance en retenant comme paramètres : probabilité par l'ANOVA attachée à l'effet mesuré  $<0.05$ , variation quantitative entre les % de volume  $\text{fold} > 1.7$ , probabilité de détecter des faux positifs  $q < 0.05$ . Ces critères permettent de dégager sur les 611 spots observés un ensemble de 20 spots significativement différents entre les échantillons issus de la culture biologique et conventionnelle (Figure 18) ; cela indépendamment de l'autre facteur (taille des grains).

Ces 20 spots présentent des variations quantitatives et correspondent à des valeurs moyennes qui sont plus importantes chez le mode conventionnel (pour 17 spots), contre 3 chez le mode biologique (Tableau 25 ). Rappelons que le fold de 1.7 correspond à une augmentation du pourcentage de volume normalisé de 70%. Les trois spots 1385, 1459 et 2056 présentent une augmentation en mode biologique de 70 à 73% de leur volume normalisé alors que les 17 autres augmentent de 70% à plus de 130% en mode conventionnel.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Zorb *et al.*, (2009a) qui, en analysant le blé tendre de printemps (cv. Titlis), ont dénombré 19 spots variants entre les cultures conventionnelle et organique dont deux sont plus exprimés dans le mode biologique. Barneix (2007) a suggéré que la régulation de l'expression des gènes responsables de la synthèse des protéines de réserve serait étroitement liée aux conditions environnementales.



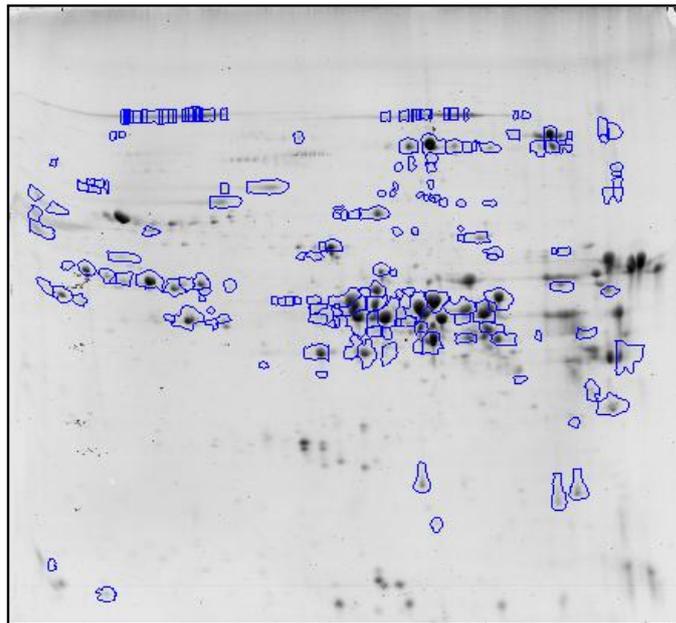
**Figure 18:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites **des grains de toutes tailles confondues** où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture et pour toutes tailles de grains confondues. **a.** 20 spots variants dont 3 sont plus exprimés en mode biologique et 17 plus exprimés en mode conventionnel (ANOVA  $p < 0.05$  et  $\text{fold} > 1.7$ ). **b.** exemple de spot plus exprimé en mode conventionnel **c.** spot plus exprimés en mode biologique

**Tableau 25:** Spot de l'extrait des protéines totales variants significativement entre mode de culture

spot ID	Anova (p)	Fold	Highest Mean	Lowest Mean
1385	1,88E-07	1,70	Biologique	Conventionnel
1681	1,83E-07	1,70	Conventionnel	Biologique
2056	1,36E-05	1,70	Biologique	Conventionnel
1689	1,16E-05	1,70	Conventionnel	Biologique
1755	5,88E-10	1,71	Conventionnel	Biologique
1459	1,57E-08	1,73	Biologique	Conventionnel
1559	6,82E-03	1,78	Conventionnel	Biologique
1344	3,60E-08	1,79	Conventionnel	Biologique
1590	1,11E-08	1,86	Conventionnel	Biologique
1859	1,09E-09	1,88	Conventionnel	Biologique
1048	2,17E-06	1,90	Conventionnel	Biologique
1042	1,08E-07	1,93	Conventionnel	Biologique
1686	1,00E-07	1,93	Conventionnel	Biologique
1036	1,54E-06	1,97	Conventionnel	Biologique
1745	5,73E-10	2,01	Conventionnel	Biologique
1619	1,34E-09	2,23	Conventionnel	Biologique
1109	1,74E-03	2,26	Conventionnel	Biologique
1124	7,18E-11	2,31	Conventionnel	Biologique
1001	1,55E-04	2,38	Conventionnel	Biologique
1169	9,89E-07	2,47	Conventionnel	Biologique

### **Expression par grain (pour toutes tailles de grains confondues)**

Cette quantité est obtenue en multipliant les pourcentages de volumes par un facteur qu'on appelle « facteur de correction » faisant intervenir le poids moyen d'un grain pour chaque classe de taille (petit, moyen et gros) pour chacun des deux traitements (culture biologique et conventionnelle). Le fait d'utiliser cette quantité de protéines par grain pour réaliser l'étude statistique permet d'avoir une vision plus juste des protéines réellement variées à l'intérieur du grain. C'est donc plus représentatif de la réalité et cela concerne un caractère agronomique : le poids d'un grain. Celui-ci est plus faible en culture biologique qu'en culture conventionnelle. En se plaçant dans des conditions stringentes ( $p < 0.001$ ,  $\text{fold} > 2$ ), les résultats obtenus, par l'étude statistique avec le logiciel SAS, sont loin de ce qu'on aurait pu attendre. Pour ce mode d'expression, le nombre de spots variants est considérablement augmenté : ils sont au nombre de 186 spots au lieu de 20. Ces variations concernent donc près d'1/3 des protéines prises en considération. Tous ces spots apparaissent comme significativement différents en terme de différences quantitatives (Figure 19).



**Figure 19** : vue globale des 186 spots variants après analyse statistique en prenant un fold supérieur à 2 pour toutes tailles confondues

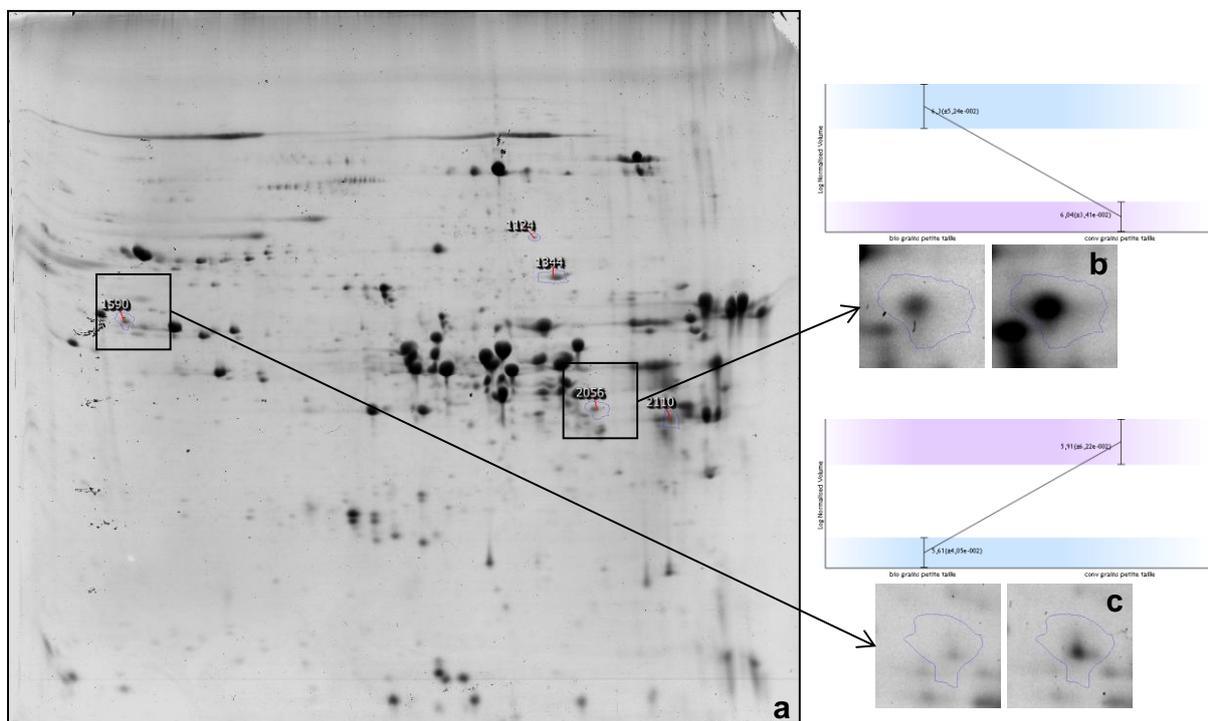
### **3.1.2. Comparaisons entre modes biologique et conventionnel pour chaque taille de grains**

Des comparaisons entre modes biologique et conventionnel ont été réalisées pour chaque taille de grains. Ce type de comparaison nous a permis d'identifier les protéines qui sont différenciellement exprimées au sein de la même classe de taille et de voir si la taille du grain a un effet significatif sur l'expression des protéines totales vis-à-vis des modes de culture. Les analyses d'images et de variance ont été réalisées à partir de 4 gels obtenus sur 2 répétitions biologiques x 2 répétitions techniques de la même classe de taille pour chaque mode de culture.

La classe regroupant les petits grains semble ne pas être influencée par le mode de culture. Uniquement cinq spots variants quantitativement sont identifiés sur lesquels deux sont plus exprimés en mode biologique (Figure 20 et Tableau 26). Quant aux grains de taille moyenne, l'effet de mode de culture est beaucoup plus important que celui observé pour la classe de petits grains. Le logiciel Samespot a révélé un ensemble de 19 spots variants (Tableau 27). Seulement deux sont plus exprimés en mode biologique (Figure 21c), le reste est plus exprimés en mode conventionnel (Figure 21b). Toutes les variations observées sont d'ordre quantitatif.

Pour la classe des gros grains, l'analyse d'image suivie de l'ANOVA ont révélé un ensemble de 24 spots variants (Tableau 28) dont 6 sont plus exprimés en mode biologique (Figure 22c) et 18 plus exprimés en mode conventionnel (Figure 22b).

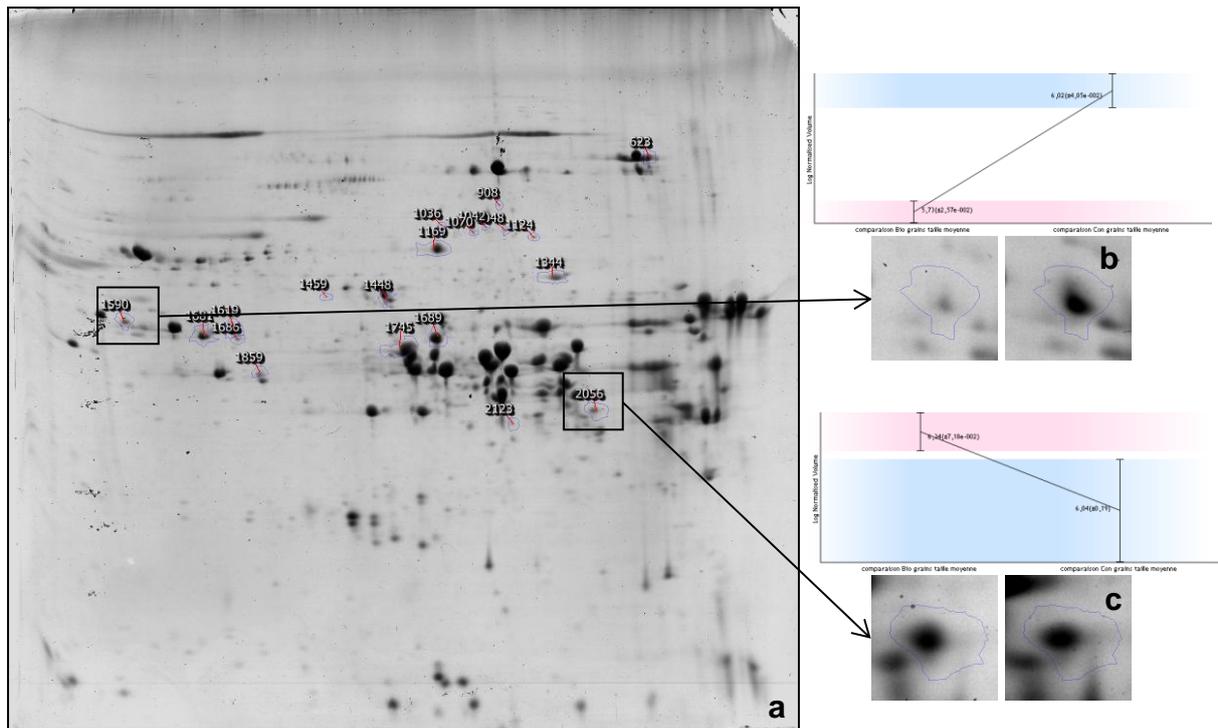
On peut avancer l'idée que les différences observées dans l'expression des protéines dans les trois classes de taille de grains sont dues au fait que tous les grains n'arrivent pas à maturité en même temps. La cinétique d'accumulation des protéines n'est pas la même pour les trois tailles de grains. Les grains de taille moyenne et grosse occupant les parties médiane et inférieure de l'épi sont les premiers qui se forment, mais leur maturité est vraisemblablement simultanée à celle des petits grains. Ceux-ci, situés aux extrémités des épis et issus généralement de la troisième fleur de l'épillet, sont initiés avec plusieurs jours de retard et l'accumulation de leur réserve est en concurrence avec les premiers. Au-delà du 35<sup>ème</sup> jour, l'accumulation d'azote dans le grain cesse. La phase qui suit correspond à un remaniement des protéines et à une dessiccation du grain. Les grains se trouvant dans la partie supérieure de l'épi peuvent ne pas achever leurs voies de synthèse et d'accumulation protéique, par conséquent ils restent petits.



**Figure 20:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites **des grains de petite taille** où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture. **a.** 5 spots variants dont 3 sont plus exprimés en mode biologique et 2 plus exprimés en mode conventionnel (ANOVA  $p < 0.05$  et  $\text{fold} > 1.7$ ). **b.** exemple de spot plus exprimé en mode biologique **c.** spot plus exprimés en mode conventionnel.

**Tableau 26 :** Spots variants identifiés au sein de la classe de petits grains

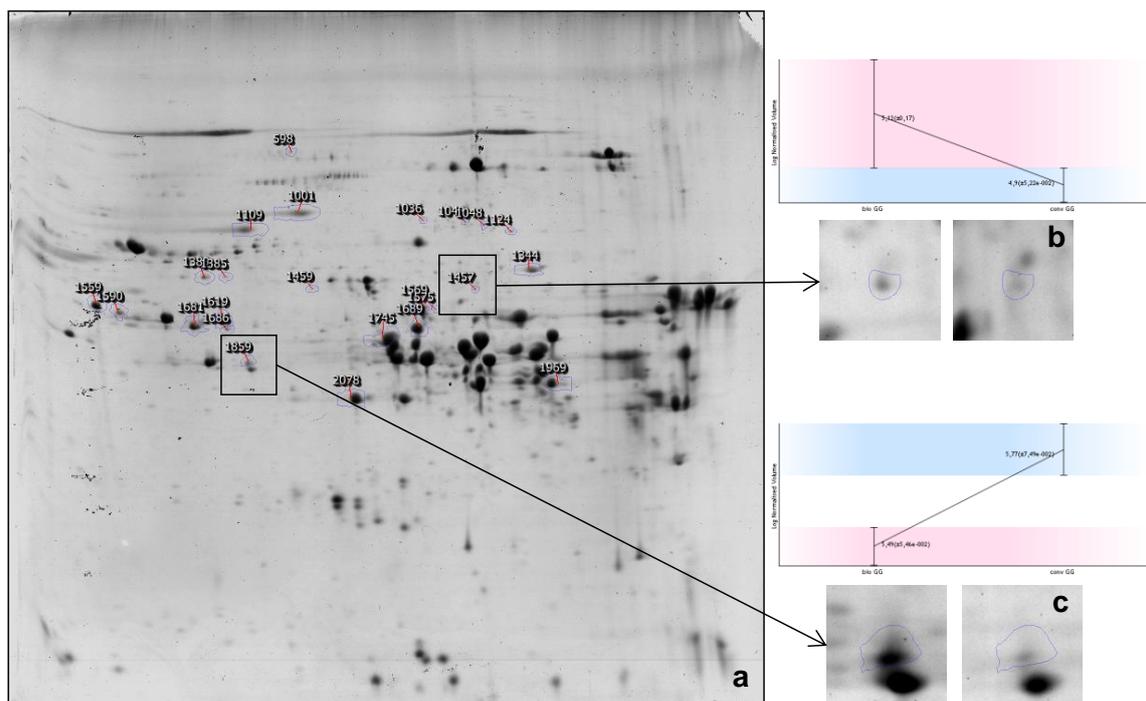
Spots	Anova (p)	Fold	Highest Mean	Lowest Mean
2056	1,65E-05	1,82	biologique	conventionnel
1590	1,71E-05	2,03	conventionnel	biologique
1124	7,32E-05	2,37	conventionnel	biologique
2110	2,02E-04	1,71	biologique	conventionnel
1344	4,08E-04	1,76	conventionnel	biologique



**Figure 21:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites **des grains de taille moyenne** où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture. **a.** 19 spots variants dont 2 sont plus exprimés en mode biologique et 17 plus exprimés en mode conventionnel (ANOVA  $p < 0.05$  et fold  $> 1.7$ ). **b.** exemple de spot plus exprimé en mode conventionnel **c.** spot plus exprimés en mode biologique

**Tableau 27:** Spots variants identifiés au sein de la classe de grains moyens

spot ID	Anova (p)	Fold	Highest Mean	Lowest Mean
1448	1,09E-05	1,68	conventionnel	biologique
623	1,35E-02	1,70	conventionnel	biologique
1070	1,77E-02	1,72	conventionnel	biologique
1681	1,17E-04	1,78	conventionnel	biologique
1689	9,24E-06	1,80	conventionnel	biologique
1344	1,35E-02	1,88	conventionnel	biologique
1459	1,45E-03	1,90	biologique	conventionnel
2056	4,80E-03	1,93	biologique	conventionnel
1590	1,88E-06	1,94	conventionnel	biologique
1859	9,23E-05	2,05	conventionnel	biologique
908	1,75E-02	2,06	conventionnel	biologique
1686	1,20E-04	2,24	conventionnel	biologique
1036	5,57E-03	2,28	conventionnel	biologique
1745	3,76E-06	2,31	conventionnel	biologique
1042	1,31E-03	2,37	conventionnel	biologique
1619	1,61E-04	2,43	conventionnel	biologique
1124	3,70E-04	2,43	conventionnel	biologique
1048	6,49E-04	2,51	conventionnel	biologique
1169	1,34E-02	3,04	conventionnel	biologique



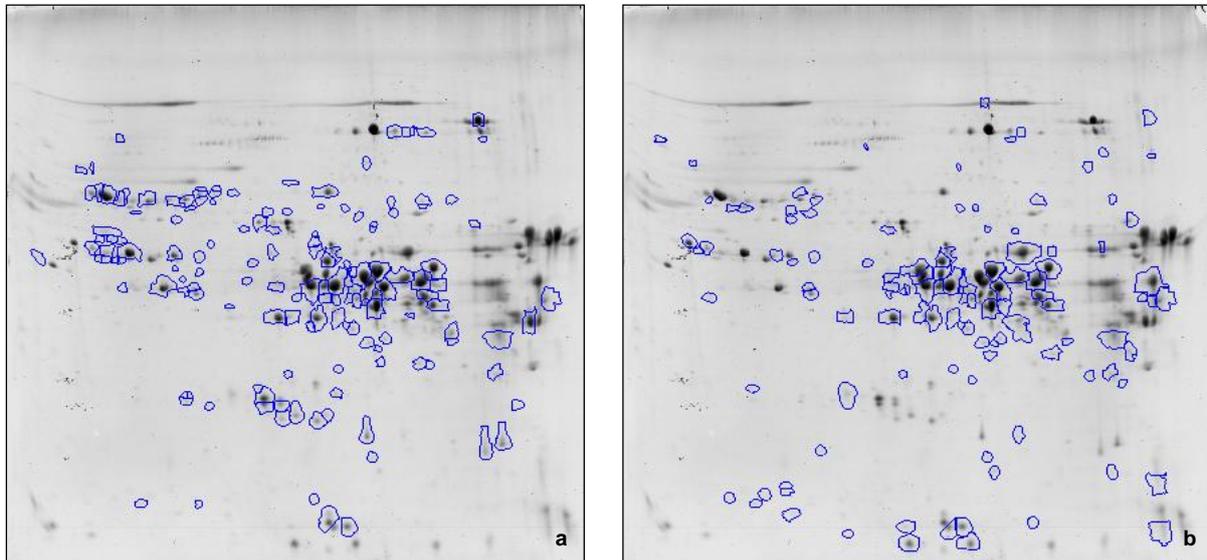
**Figure 22:** Electrophorèse bidimensionnelle des protéines totales extraites **des grains de grosse taille** où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture. **a.** 24 spots variants dont 5 sont plus exprimés en mode biologique et 19 plus exprimés en mode conventionnel (ANOVA  $p < 0.05$  et  $\text{fold} > 1.7$ ). **b.** exemple de spot plus exprimé en mode biologique **c.** spot plus exprimés en mode conventionnel

**Tableau 28:** Spots variants identifiés au sein de la classe de gros grains

spot ID	Anova (p)	Fold	Highest Mean	Lowest Mean
1569	6,33E-03	1,70	conventionnel	biologique
1457	9,38E-03	1,70	biologique	conventionnel
1459	3,65E-03	1,70	biologique	conventionnel
1389	1,29E-05	1,71	biologique	conventionnel
1681	4,33E-03	1,73	conventionnel	biologique
946	2,24E-02	1,73	conventionnel	biologique
3431	3,04E-02	1,74	biologique	conventionnel
1344	4,14E-04	1,74	conventionnel	biologique
1969	6,86E-03	1,78	conventionnel	biologique
1385	1,58E-04	1,80	biologique	conventionnel
1559	1,41E-02	1,86	conventionnel	biologique
1686	4,75E-03	1,88	conventionnel	biologique
1689	3,49E-04	1,89	conventionnel	biologique
1745	1,18E-03	1,90	conventionnel	biologique
1859	9,75E-05	1,92	conventionnel	biologique
3433	1,87E-02	1,96	biologique	conventionnel
1042	4,39E-04	1,98	conventionnel	biologique
1036	7,39E-03	2,01	conventionnel	biologique
1001	2,62E-02	2,05	conventionnel	biologique
1124	1,38E-03	2,13	conventionnel	biologique
1048	5,03E-04	2,22	conventionnel	biologique
1619	6,02E-04	2,23	conventionnel	biologique
1575	1,69E-02	2,25	conventionnel	biologique
1109	1,88E-02	2,56	conventionnel	biologique

### 3.1.3. Variation d'expression au sein d'un mode de culture (effet taille)

Dans la partie précédente, les analyses statistiques ont confirmé que des différences quantitatives des protéines de l'albumen pouvaient être significativement influencées par le mode de culture. On constate de même que les différentes classes de grains n'ont pas réagi de la même manière à l'effet de mode de culture. Dans cette partie, nous cherchons à préciser s'il existe un effet taille du grain sur la synthèse des protéines totales pour un mode de culture donné. Pour répondre à cette question, les analyses d'image (Figure 23) et de variance (Tableaux 29 et 30) ont été réalisées. Les résultats trouvés sont marquants : un ensemble de 149 spots sont quantitativement différents d'une classe à une autre au sein de mode biologique.



**Figure 23:** Représentation des spots significativement variants entre classe de taille (petite, moyenne et grosse) des grains obtenus pour un même mode de culture.  
a. variants entre tailles des grains d'Ataro issus de la culture biologique    b. variants issus du mode de culture conventionnelle

Ce nombre est un peu moins élevé dans le mode conventionnel pour lequel 115 spots sont variants. Pour chacun des deux modes de culture, on constate que les variations significatives observées entre classes de taille de grains, portent essentiellement sur les gliadines. Peu de spots des SG-HPM et SG-FPM semblent impliqués dans ces variations.

**Tableau 29:** Spots quantitativement différents d'une classe à une autre au sein de mode biologique.

620	1182**	1308	1538	1679	1874	2077	2473	2812
673	1183**	1309	1540	1783	1891	2078	2483	2857
679	1186	1327	1549	1791	1901	2100	2572	2902
691	1209	1328	1571	1795	1903	2103	2586	2929
699	1210	1331	1572	1813	1906	2115	2587	3182
742	1219	1332	1590	1822	1908	2144	2595	3205
759	1220	1360	1593	1834	1915	2176	2628	3213
941	1228**	1385	1605	1845	1917	2182	2647	3305
986	1229	1408	1619	1850	1938	2206	2658	3333
1017	1231	1424	1625	1855	1945	2211	2660	
1118	1232	1436	1630	1856	1969	2226	2671	
1150	1235	1457	1631	1859	1985	2272	2679	
1154	1245	1459	1644	1861	1991	2376	2714	
1166	1246	1460	1671	1866	2025	2388	2722	
1169	1282	1470	1673	1867	2039	2397	2736	
1174	1290	1495	1675	1873	2053	2446	2746	

**Tableau 30:** Spots quantitativement différents d'une classe à une autre au sein de mode conventionnel.

403	1210	1477	1723	1851	1917	2144	2517	3205
583	1214	1559	1745	1856	1938	2182	2530	3268
679	1232	1590	1757	1859	1939	2206	2564	3297
755	1297	1594	1761	1861	1954	2211	2600	3301
772	1301	1605	1766	1862	1969	2226	2809	3333
790	1305	1614	1772	1867	1991	2237	2894	3335
863	1307	1618	1783	1868	2025	2293	2929	3337
890	1309	1637	1791	1874	2054	2318	2988	3357
936	1333	1659	1800	1885	2074	2330	3007	3431
946	1385	1678	1813	1906	2077	2446	3037	3433
971	1397	1686	1834	1909	2078	2473	3118	
1188	1457	1689	1845	1914	2080	2483	3152	
1200	1460	1693	1850	1915	2115	2486	3176	

Des études complémentaires portant sur la variation quantitative des spots des protéines totales de l'albumen extraites de grains situés dans les principales parties de l'épi (tiers médian, parties supérieure et inférieure) s'imposent donc. Ce type d'étude devrait intégrer une analyse conjointe du transcriptome et du protéome au cours du développement de grains de taille différente. Cette approche devraient apporter d'utiles éléments de compréhension sur les possibles différences de cinétique de synthèse des protéines de réserve (gliadines) en fonction du métabolisme énergétique du grain. Le test de Newman et Keuls a permis de déterminer les groupes non significativement différents entre les trois classes de taille. Pour 91 spots variant dans le mode biologique, les grains de taille moyenne et grosse constituent un groupe distinct des grains de petite taille. En outre pour 57 autres spots, les pourcentages relatifs de chacun de ces spots sont significativement différents entre chaque classe de taille de grain. Et pour

seulement un spot (2679), les grains de petite taille avec ceux de taille moyenne constituent un groupe distinct des grains de grande taille.

Ces variations sont un peu moins importantes dans le mode conventionnel. Pour 104 spots sur les 115 variants, les grains de grande et moyenne taille ne montrent pas de différences significatives et forment un seul groupe distinct des petits grains. Sur les 11 spots restants, chaque classe de taille constitue un groupe à part.

### **3.2. Analyse des albumines-globulines (toutes tailles confondues)**

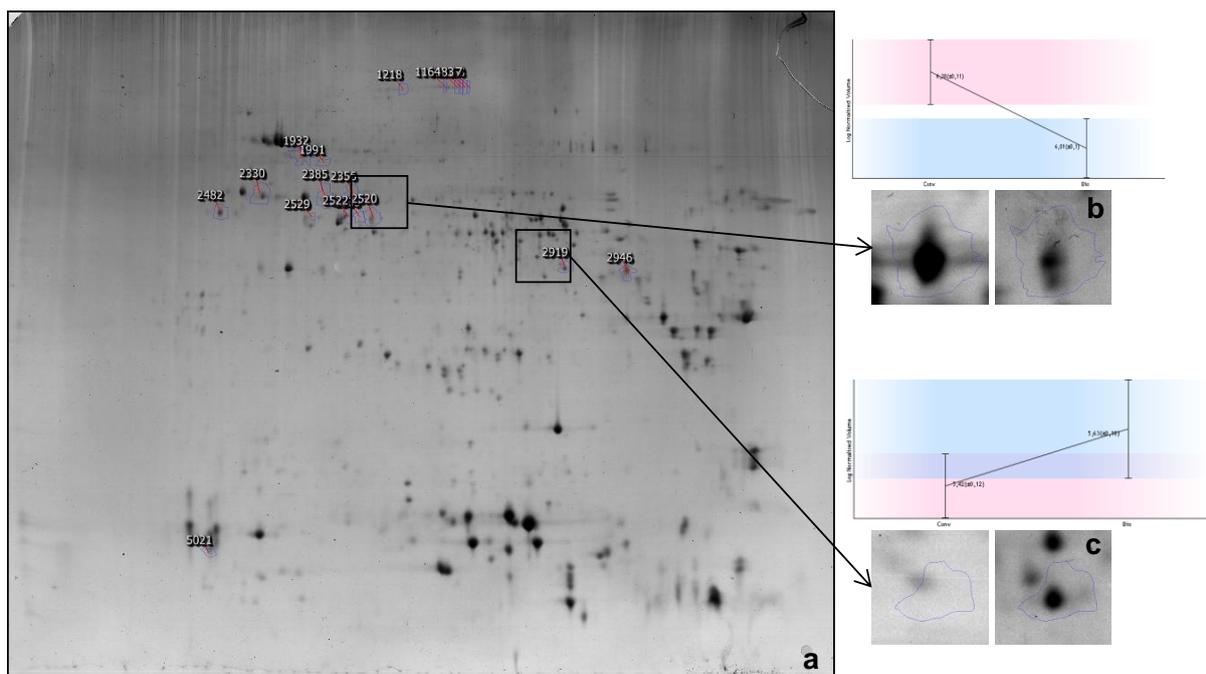
Une analyse complémentaire de la fraction albumines-globulines a été entreprise. La figure 24 représente le profil d'albumines-globulines obtenu pour la variété Ataro. L'analyse d'image a été réalisée à partir de 16 gels, dont 10 pour le mode biologique et 6 pour le mode conventionnel (les gels trop éloignés dans le plan de l'analyse en composantes principales (ACP) ont été supprimés). Le nombre moyen de spots détectés par le logiciel SameSpot est de 994. Peu de spots variants entre les deux modes de culture ont été mis en évidence avec les paramètres classiquement utilisés dans la comparaison statistique (ANOVA $<0.05$ ,  $q$  value $<0.05$ , fold $>1.7$ spots) : Uniquement 20 spots varient quantitativement dont 14 sont plus exprimés en mode conventionnel (Figure 24b) et 6 plus exprimés en mode biologique (Figure 24c, Tableau 31).

Lu *et al.*, 2005, en examinant le niveau des différents transcrits codant pour les protéines de réserve et les albumines-globulines, ont trouvé que l'expression des gliadines, des SG-FPM et les SG-HPM augmente avec les niveaux de l'azote non organique. Alors que les transcrits codant pour des albumines et des globulines sont à peine affectés.

### **3.3. Identification des protéines différenciellement exprimées**

Dans cette première étude seuls les spots variants majoritaires (16 pour la fraction protéines totales et 14 pour celle des albumines-globulines) ont été prélevés sur des gels puis soumis à l'hydrolyse trypsique afin d'être analysés en spectrométrie de masse MALDI-Tof.

Les masses peptidiques obtenues par cet appareil nous ont permis d'identifier 8 protéines appartenant à la fraction des protéines totales et 10 protéines de l'extrait des albumines globulines. Ces résultats d'identification (respectivement 50% et 71% des spots soumis à l'analyse) sont supérieurs à ceux généralement obtenus sur le blé, espèce dont le génome n'est pas encore séquencé.



**Figure 24:** Electrophorèse bidimensionnelle des albumines-globulines extraites **des grains de toutes tailles confondues** où sont indiqués les spots variants en fonction du mode de culture. **a.** 18 spots variants dont 4 sont plus exprimés en mode biologique et 14 plus exprimés en mode conventionnel (ANOVA  $p < 0.05$  et  $\text{fold} > 1.7$ ). **b.** exemple de spot plus exprimé en mode conventionnel **c.** spot plus exprimés en mode biologique

**Tableau 31 :** Spot de l'extrait des albumines-globulines variants significativement entre modes de culture.

	Anova (p)	Fold	Highest Mean	Lowest Mean
1182	0,02349445	1,79966412	Conv	Bio
1167	0,00292238	2,09289904	Conv	Bio
1166	0,00064805	2,17524071	Conv	Bio
1164	0,00838302	2,04014447	Conv	Bio
1183	0,00729881	2,07762546	Conv	Bio
1168	0,00178491	2,07746437	Conv	Bio
1218	0,01452614	1,45606374	Conv	Bio
1932	0,00032141	2,14987808	Conv	Bio
1991	0,01071436	1,7974684	Conv	Bio
2261	0,0027522	1,58147081	Conv	Bio
2330	0,0001181	1,79515955	Conv	Bio
2385	0,00104076	1,65102204	Conv	Bio
2356	5,96E-05	1,96069413	Conv	Bio
2482	0,00044059	1,70122407	Conv	Bio
2520	5,23E-05	1,83408505	Conv	Bio
2522	0,00496283	1,85191939	Conv	Bio
2530	3,52E-05	2,31321413	Conv	Bio
2529	0,0027992	2,05816926	Conv	Bio
2658	5,98E-05	1,61872378	Conv	Bio
2919	0,0151645	1,73616748	Bio	Conv
2946	0,00814425	1,9933512	Bio	Conv
3828	0,02531974	1,66645	Bio	Conv
5021	0,01029214	2,04011909	Bio	Conv

### **3.3.1. Identification des protéines de la fraction des protéines totales**

Selon le métabolisme des plantes, trois groupes de protéines fonctionnelles sont distingués (tableau 32) : le premier groupe comporte les protéines de réserve dont un gamma gliadine, des serpines et un précurseur de triticine. Le second groupe comprend une enzyme intervenant dans le métabolisme des sucres et la glycolyse : la petite sous unité ADP glucose pyrophosphorylase. Le troisième groupe comporte une autre enzyme liée au métabolisme d'azote, il s'agit de l'Alanine aminotransférase 2.

Selon Hurkman *et al.*, (2009) la majorité des protéines, autres que de réserve, sont plus abondantes dans les phases tardives de remplissage du grain. Ces protéines correspondent à la fraction soluble dans le sel.

La petite sous unité de l'ADP glucose pyrophosphorylase est une enzyme clé dans la synthèse de l'amidon, son rôle est de catalyser la conversion du glucose -1-phosphate et l'ATP en ADP-Glucose, qui sert comme substrat pour la synthèse de l'amidon (Perris, 1998).

Les serpines jouent un rôle critique dans le contrôle de protéolyse qui est important dans la protection des grains en cours de développement contre les différents stress abiotiques et biotiques. Les serpins inhibent de façon irréversible des cibles des protéinases exogènes ou endogènes (Thomas et Jorn, 2008).

Le métabolisme d'azote est compliqué et est souvent lié au métabolisme de carbone et à la glycolyse (Foyer *et al.*, 2003). La fertilisation azotée peut conduire à des niveaux élevés de protéines et aussi à des changements dans le métabolisme du carbone (Stitt, 1999)

Ainsi, les modifications de climat ou des conditions de culture (fertilisation azotée, température, sécheresse...) entraînent des variations considérables de la teneur azotée et de la composition en protéines, surtout de la richesse en gliadines et gluténines.

### **3.3.2. Identification des protéines de la fraction des albumines-globulines**

Les protéines identifiées de la fraction albumines-globulines sont au nombre de dix (tableau 33) dont trois interviennent dans métabolisme des sucres et à la glycolyse, à savoir : l'énolase, le sucrose synthase 2 et la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase et sept protéines de type de serpine.

**Tableau 32 : Identification des spots variants correspondants aux protéines totales**

Spot	Taxonomie	Nom de la protéine	Taux de recouvrement	Nombre de peptides alignés	Masse de la protéine	Point isoélectrique théorique	fold	Abondance d'expression
1385	<i>Triticum aestivum</i>	small subunit ADP glucose pyrophosphorylase	32%	12	52028	5.53	1,7	Biologique
1459	<i>Hordeum vulgare</i>	Alanine aminotransferase 2	23%	5	52844	5.93	1,7	Biologique
1559	<i>Triticum aestivum</i>	serpin	51%	11	42954	5.18	1,8	Conventionnel
1569	<i>Triticum aestivum</i>	triticin precursor	23%	12	56918	9.37	1,6	Conventionnel
619	<i>Triticum aestivum</i>	serpin	59%	16	42855	5.62	2,2	Conventionnel
1681	<i>Triticum aestivum</i>	serpin	57%	15	43284	5.46	1,7	Conventionnel
2056	<i>Triticum aestivum</i>	gamma-gliadin	42%	3	14689	9.11	1,7	Biologique

**Tableau 33 : Identification des spots variants correspondants aux albumines-globulines**

Spot	Taxonomie	Nom de la protéine	Taux de recouvrement	Nombre de peptides alignés	Masse de la protéine	Point isoélectrique théorique	fold	Abondance d'expression
1166	<i>Triticum aestivum</i>	sucrose synthase type 2	15%	9	92549	6.17	2,2	Conventionnel
1932	<i>Oryza sativa</i>	enolase	38%	12	47956	5.42	2,1	Conventionnel
2482	<i>Triticum aestivum</i>	serpin 4	51%	15	43473	5.19	1,7	Conventionnel
2261	<i>Triticum aestivum</i>	Serpin-Z2B	61%	14	42954	5.18	1,9	Conventionnel
2330	<i>Triticum aestivum</i>	Serpin-Z2B	54%	12	42954	5.18	1,8	Conventionnel
2385	<i>Triticum aestivum</i>	Serpin-Z2A	55%	15	43284	5.46	1,7	Conventionnel
2356	<i>Triticum aestivum</i>	Serpin-Z1C	44%	11	42855	5.62	2	Conventionnel
2522	<i>Triticum aestivum</i>	Serpin-Z2B	22%	6	43011	5.18	1,9	Conventionnel
2520	<i>Triticum aestivum</i>	Serpin-Z2B	25%	7	42954	5.18	1,8	Conventionnel
2658	<i>Triticum aestivum</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	45%	13	36626	7.08	1,8	Conventionnel

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---

Le premier objectif de cette partie d'étude était d'évaluer les différences dues aux modes de culture biologique et conventionnelle au niveau des caractéristiques physiques du grain. Nous avons constaté que les deux variétés Ataro et Renan avait des réponses différentes au niveau de la quantité de protéines par grain.

Le second objectif portait sur l'influence du mode de culture sur le protéome du grain que l'on a observé par électrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle. Ces deux approches ont

révélé des volumes relatifs des protéines significativement influencés par le mode de culture. Ce sont principalement les SG-HPM et gliadines qui ont été significativement augmentées dans le mode conventionnel par rapport au mode biologique. Plusieurs enzymes du métabolisme énergétique sont révélées logiquement plus exprimées en mode conventionnel. Le manque de richesse en azote des plantes conduites en mode biologique induit une moindre luxuriance végétative ayant pour conséquence moins d'apport carboné et azoté dans le grain. L'incidence du mode de culture sur le remplissage du graine nécessite d'examiner le protéome en fonction des tailles de grain. Le protéome des grains de petite taille semble moins influencé par le mode de culture que celui des grains moyens et gros. Cependant pour une même mode de culture, les trois tailles de grain présentent de nombreuses différences d'expression au niveau du protéome. Les protéines totales et les albumines globulines révélées par électrophorèse bidimensionnelle n'ont été analysées que pour la variété Ataro. Il convient de poursuivre la même approche sur les grains de la variété Renan. Pour l'instant les deux modes de culture n'ont pas fait apparaître de différences qualitatives ; seuls les spots variant quantitativement ont été observés dans l'approche protéomique différentielle réalisée. L'identification par spectrométrie de masse d'un petit nombre de spots variants, a révélé deux groupes de protéines fonctionnels : les protéines de réserve et des enzymes intervenant dans le métabolisme du carbone et de la glycolyse. Là aussi il conviendra de poursuivre cet effort d'identification notamment pour les spots de la fraction des albumines globulines. Peu de protéines de cette fraction sont apparues significativement augmentées sur les grains d'Ataro cultivé en mode biologique. Cela aussi mérite d'être confirmé sur d'autres variétés.

Le métabolisme du grain n'étant pas fondamentalement bouleversé en réponse au mode de culture, l'approche que nous avons développée nous laisse entrevoir la possibilité, si elle se confirmait, d'identifier plusieurs protéines ayant un ratio fortement changé dans la classe des grains moyens ou gros. On pourrait alors suggérer la mise en place d'outils de détection par

Elisa (ou bandelette colorée) permettant de distinguer le mode de culture à l'origine des grains. L'autre possibilité pourrait reposer sur une mesure semi quantitative par spectrométrie de masse sur un extrait brut préalablement débarrassé de protéines en dehors des classes de tailles recherchées. On pourrait aussi suggérer d'examiner le métabolome des grains, mais dans ce cas il est probable que l'on ne puisse faire l'économie de l'incidence de contaminants et d'agents pathogènes sur les spectres de masse obtenus.

---

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdelguerfi, A. et Laouar, M. 1999.** Les ressources génétiques en Algérie : un préalable à la sécurité alimentaire et au développement durable. INESG (Alger). Pp :1-108
- Agence BIO. 2007.** L'agriculture biologique française - Chiffres 2006. Agence BIO, Paris, France.
- Aghai, J., Abd Mishani, S., and Kodabandeh, N. 1996.** Genetic variation and geographical diversity for seed storage proteins of Iranian durum wheat collection. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 27,105-113.
- Anderson, O.D., and Greene, F.C. 1997.** The  $\alpha$ -gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. *Theor Appl Genet* 95, 59–65
- Antoine, C., Peyron Rouau, S., Lullien-Pellerin, V., and Abecassis, G. 2004.** Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers . *J Cereal Sci.* 39: 387-393.
- Autran, J. C. 1973.** L'identification des variétés de blé. *Bulletin des anciens élèves de l'école française de meunerie* 256 : 163.
- Autran, J. C. and Bourdet, A. 1975.** L'identification des variétés de blé : établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain. *Ann. Amélio. Plantes* 25 : 277-301.
- Autrique, E., Nachit, M. M., Monneveux, P., Tanksley, S. D., and Sorrels, M.E.1996.** Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphophysiological traits, and coefficient of parentage. *Crop Sci.* 36, 735-742.
- Badgley, C., Moghtader, J., Quintero, E., Zakem, E., Chappell, M.J., Avilés-Vazquez, K., Samulon, A., and Perfecto, I. 2007.** Organic agriculture and the global food supply. *Renewable Agriculture and Food Systems* 22: 86–108.
- Balfourier, F., Roussel, V., Strelchenko, P., Exbrayat-Vinson, F., Sourdille, P., Boutet, G., Koenig, J., Ravel, C., Mitrofanova, O., Beckert, M., and Charmet, G. 2007.** A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. *Theoretical and Applied Genetics* 114,1265-1275
- Barneix, A.J. 2007.** Physiology and biochemistry of source regulated protein accumulation in the wheat grain. *J. Plant Physiol.* 164, 581-90.
- Bean, S., and Lookhart, G. 1997.** Separation of wheat proteins by two-dimensional reversed-phase high-performance liquid chromatography plus free zone capillary electrophoresis. *Cereal Chemistry* 74: 758-765.
- Belitz, H.D., and Grosh, W. 1987.** Cereal and cereal products. "Food Chemistry" Springer-Verlags. Berlin. Germany.
- Bietz, J. A. 1986.** High-performance liquid chromatography of cereal proteins, p. 105-169. In *Advances in Cereal science and Technology*. Y.Pomeranz, American Association of Cereal Chemists. St. Paul, Minnesota, USA.
- Birzelle, B., Backes, F., Berlet, M., and Kramer, J. 1998.** Mycoflora, DON and OTA contents of winter wheat in the years 1995 until 1997. *Rev. Med. Vet., Toulouse*, 149: 527-535.

- Boeuf, F. 1932.** Le blé en Tunisie, ANN. Ser.Botanique et Agronomie. Tunisie. Tunis. Pp :1-454
- 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 pp, 1-142.
- Bourn, D., Prescott, J. 2002.** A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 42: 1-34.
- Branlard, G., Khelifi, D., Lookhart, G. 1990.** Identification of some wheat proteins separated by tow-step acide polyacrylamide gel electrophoresis and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis technique. Cereal Chemistry. 69:677-678.
- Branlard, G., Autran, G.C., Rousset, M., Dardevet, M., and Koenig, J. 1990.** Cataloguedes sous-unités de haut poids moléculaire des gluténines des blés (*T. aestivum* et *T. durum*). Ed. INRA, 60 P
- Branlard, G., Auran, J.C., and Monneveux, P. 1989.** High molecular weight glutenin subunits in durum wheat (*T. durum*). Theoretical and Applied Genetics 78, 53-358.
- Branlard, G., and Le Blanc, D. A. 1985.** Les sous-unités glutenines de haut poids moléculaire des blés tendres et des blés durs cultivés en France. Agronomie 4 : 356-366.
- Braun, H., Payne, J., Morgounov, T.S.,A.I., Van Ginkel, M. and Rajaram, S. 1998.** The challenge: one billion tons of wheat by 2020. In A.E. Slinkard, ed. Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp., 2-7 Aug., vol. 1. Saskatoon, Saskatchewan, Canada, University Extension Press, University of Saskatchewan.
- Brites, C., and Carrillo, J. M. 2000.** Inheritance of gliadin and glutenin proteins in four durum wheat crosses. Cereal Res. Commun. 28, 239-246.
- Brown, A. H. D.and B.S. Weir, 1983:** Measuring genetic variability in plant populations . In Isozymes in plant genetics and breeding . pp. 219–239. Part A, Elsevier, Amsterdam
- Bushuk W. 1989.** Wheat Proteins: Aspects Structure that Determine Breadmaking Quality. Protein Quality and the Effects of Processing. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Bushuk, W., and Zillman, R.R. 1978.** Cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Appartus, Method and nomenclature. Can, J. Plant. Sci. 58 :505-515.
- Caballero, L., Martin, L. M., and Alvarez, J. B. 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 Mediterannennes. Serie A. Seminaires Mediterraneens pp, 143-147.
- Carrillo, J.M., C.Martnez, M., Moita Brites, C., Nieto-T, M. T. and Vazquez, J. F. 2000.** Relationship between endosperm and quality in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. Options Mediterranees Serie A 40, 463-467
- Carrillo, J. M., Vazquez J. F., and Orellana, J. 1990.** Relationship between gluten strength and glutenin proteins in durum cultivars. Plant Breeding 104, 325-333.
- Cecarelli, S., Grando, S., and Van Leur, J. G. A. 1987.** Genetic diversity in barley landraces from Syria and Jordan. Euphytica 36, 389-405.

- Champeil, A., Foubret, J.F., Doré, T., and Rossignol, L. 2003.** Influence of cropping systems on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop protection*
- Cherdouh, A., Khelifi, D., Carrillo, M.T., and Nieto-Taladriz, M.T. 2005.** The high and low molecular weight glutenin polymorphism of Algerian durum wheat landraces and old cultivar. *Journal of Plant Breeding* 124, 338-342.
- Cox, T.S., Harrell, L.G., Chen, P. and Gill, B.S. 1991.** Reproductive behavior of hexaploid/diploid wheat hybrids. *Plant Breed.*, 107: 105-118.
- Croston, R.P. and Williams, J.T. 1981.** A world survey of genetic resources IBRGR Bulletin/80/59. 37 pages
- Daniel, C. 1999.** Effets des facteurs du milieu sur la teneur et la composition des protéines de réserve du blé (*Triticum aestivum* L) en relation avec la valeur d'utilisation. Thèse de doctorat. Univ Blaise Pascal Clermont Ferrand
- David, C. Joud, S. et Bauer, L. 2007.** Maîtrise de la qualité des blés biologiques à l'échelle d'un bassin d'approvisionnement. Incidence des conditions de production sur les performances des blés biologiques. Projet Pain Bio ACTA-INRA, Lyon, France
- Du Cros, D. L. 1987:** glutenin protein and gluten strength in durum wheat. *Journal of Cereal Sciences* 5, 3-12.
- David, C. Jeuffroy, M.H., Recous, S., and Dorsainvil, F. 2003.** Adaptation and assessment of the Azodyn model managing the nitrogen fertilization of organic winter wheat. *Eur J. Agron.*
- Delaney, D.E., Nasuda, S., Endo, T.R., Gill, B.S. and Hulbert, S.H. 1995.** Cytologically based physical maps of the group 2 chromosomes of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 568-573.
- Dlouhy, J. 1981.** Alternative Forms of Agriculture-Quality of Plant Products from Conventional and Biodynamic Growing. Report 91. Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala, 15 p.
- Doekes, G.J., and Wennekes, L.M.J. 1982.** Effect of nitrogen fertilization on quantity and composition of wheat flour protein. *Cereal Chem.*59: 276–278.
- Dubcovsky, J., Luo, M.C., Zhong, G.Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A. and Dvorak, J. 1996.** Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, 143: 983-999.
- Du Cros, D. L., 1987.** Glutenin proteins and gluten strength in wheat. *J. Cereal Sci.* 5, 3—12.
- Dupont, F.M., and Altenbach, S.B. 2003.** Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. *J. Cereal Sci.* 38: 133–146.
- Dvorak, J. 1998.** Genome analysis in the *Triticum-Aegilops* alliance. In A.E. Slinkard, ed. *Proc. 9th Int. Wheat Genetics Symp.*, vol. 1, p. 8-11. University of Saskatchewan, Canada, University Extension Press.
- Dvorak, J., di Terlizzi, P., Zhang, H.B. and Resta, P. 1993.** The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, 36: 21-31.
- Dvorak, J. and Zhang, H.B. 1990.** Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 9640-9644.
- El-Hage Scialabba, N. 2007.** Organic agriculture and food security. *FAO*, Roma, Italy.

**ENOF. 1999.** European Network Of Organic Farming. Organic farming research in the EU, Towards 21<sup>st</sup> century. ENOF White Book, 108 p.

**European commission. 2003.** Recommandation de la commission établissant des lignes directrices pour l'élaboration de stratégies nationales et de meilleures pratiques visant à assurer la coexistence des cultures génétiquement modifiées, conventionnelles et biologiques. EC Doc. 2624, 19 p.

**European commission. 2002.** Analyse des possibilités d'un plan d'action européen en matière d'alimentation et d'agriculture biologiques. EC Doc. 1368, 38 p.

**FAO. 1983.** Commission on plant genetic resources. Resolution 8/83 of the 22nd session of the FAO conference. Rome

**Favier. 1989.** Valeur nutritive et comportement des céréales au cours de leurs transformations. Céréales en régions chaudes. AUPELF UREF, eds John Lebbey. Eurotext PARIS. pp : 285-297.

**Feillet, P. 2000.** Le grain de blé. Composition et utilisation Eds INRA. Paris. 312 p.

**Foyer, C.H., Parry, M., and Noctor, G. 2003.** Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 54 : 585–593.

**Frankel, O.H. 1977.** Natural variation and its conservation. In A. Muhammed and R.C. von Botstel, eds. Genetic diversity of plants, p. 21-24. New York, NY, USA, Plenum Press.

**Frankel, O.H., and Brown A.H.D. 1984.** Plant genetic resources today: A critical appraisal. In: J. H. W. Holden, and J. T. Williams, (eds), *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*,. 249–257 London: Allen and Unwin.

**Galili, G., Felsenburg T., Levy A.A., Altschuler, Y., and Feldman, M. 1988.** Inactivity of high molecular weight glutenin genes in wild diploid and tetraploid wheats. In: T.E. Miller and R.M.D. Koebner (Eds). *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium* Cambridge pp. 81-86

Larbi Rhazi, Roland Cazalis, Emmanuel Lemelin, Thierry Aussenac b, Changes in the glutathione thiol–disulfide status during wheat grain development. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (2003) 895–902

**Gianibelli, M.C., Larroque, O.R., MacRitchie, F., and Wrigley, C.W. 2001.** Biochemical, Genetic, and molecular Characterization of Wheat Endosperm Proteins. *Cereal Chem.* 78: 635-646.

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

**Gooding, M.J., Davies, W.P., Thompson, A.J. and Smith, S.P. 1993.** The challenge of achieving breadmaking quality in organic and low input wheat in the UK - A review. *Aspects of Applied Biology* 36: 189-198.

**Graveland, A., Henderson, M.H., Paques, M., and Zandbelt, P.A. 1996.** Composition and functional properties of gluten proteins. In: Proc. 6th Int. Gluten Workshop, in association with 46th Australian Cereal Chemistry Conf., Sydney, Australia.

**Grignac, P. 1965.** Contribution à l'étude de *Triticum durum*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse. France. 246 p

**Grosch, W., Wieser, H., 1999.** Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science* 29, 1–16.

- Gupta, R.B., Batey, I.L., MacRitchie, F. 1992.** Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal Chem.* 69: 125–131.
- Haglund, A., Johansson, L., and Dahlsted. L. 1998.** Sensory evaluation of wholemeal bread from ecologically and conventionally grown wheat. *J. Cereal Sci.* 27 : 199-207.
- Hailu, F., Johansson, E., Merker, A., Belay, G., Harjit-Singh, and Zeleke, H. 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.
- Hamer, R. J., Weegels, P. L., and Marseille J. P. 1992.** Prediction of the breadmaking quality of wheat : the use of HMW glutenin-A subunit-based quality scoring systems. *J. Cereal Sci.* 04 : 80-091.
- Harlan, 1975.** *Crops and man.* Eds John Wiley and Sons. NY. 350 pages
- Hawkes, J.G. 1991.** International work-shop on dynamic *in-situ* conservation of wild relatives of major cultivated plants: summary and final discussion and recommendations. *Israel J. Bot.*, 40: 529-536.
- Hilderman, I., Thommen, A., Dubois, D., Boller, T., Wiemken, A., Mäder, P. 2009.** Yield and baking quality of winter wheat cultivars in different farming systems of the DOK long-term trial. *J. Sci Food Agric.* [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)
- Hurkman, W.J., Vensel, W.H., Tanaka, C. K., Whitehand, L., Altenbach, S.B. 1993.** Seed protein and isozymes variations in *Triticum tauschii*(*Aegilops squarosa*). *Theo. Appl. Genet.* 87: 60-63
- Igrejas, G., Guedes-Pinto, H., Carnide, V., and Branlard, G. 1999.** The high and low molecular weight glutenin subunits and x-gliadin composition of bread and durum wheats commonly grown in Portugal. *Plant Breeding*, 118, 297-302.
- ITAB .2007.** [www.itab.asso.fr](http://www.itab.asso.fr).
- Jackson, M., Morel, H., Sontag-Strohm, T., Branlard, G., Metakovsky., E.V., and Redaelli, R. 1996.** Proposal for combining the classification systems of alleles of Gli-1 and Glu-3 loci in bread wheat « *Triticum Aestivum* L. ». *J. Genet. Breed.* 49: 210-225.
- Jackson, E . A ., Holt, L . M ., and Payne, P. I. 1983.** Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensionel electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes.
- Johansson, E., Prieto-Linde, M.L., and Jonsson, J.O. 2001.** Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. *Cereal Chem.* 78: 19–25.
- Johnson, B.L., and Dhaliwal, H.S. 1976.** Reproductive isolation of *Triticum boeoticum* and *Triticum urartu* and the origin of the tetraploid wheat. *Am. J. Bot.*, 63: 1088-1094.
- Kaan, F., Branlard, G., Chihaab, B., Borris, C., and 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.
- Kasarda, D. D. 1989.** Glutenin structure in relation to wheat quality. *Wheat in unique*, Ed. Pomeranz, Y., 277-302

- Kenyon, G.L., DeMarini, D.M., Fuchs, E., Galas, D.J., Kirsch, J. F., Leyh, T. S., Moos, W.H., Petsko, G.A., Ringe, D., Rubin, G.M., and Sheahan, L.C. 2002.** Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report." *Mol Cell Proteomics* 1(10): 763-80.
- Khan, K., Tamminga, G., Lukow, O. 1989.** The effect of wheat flour protein on mixing and baking. Correlations with protein fractions and high molecular weight glutenin subunit composition by gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 66:391-369.
- Khatkar, B.S., Fido, R.J., Tatham, A.S., Schofield, J.D. 2002.** Functional properties of wheat gliadins. I. Effects on mixing characteristics and bread making quality. *J Cereal Sci.*35: 299–306.
- Kihara, H. 1944.** Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (Japanese). *Agric. Hort.*, 19: 13-14.
- Kihara, H. 1919.** Ueber cytologische Studien bei einigen Getreidearten. 1. Spezies-Bastarde des Weizens und Weizenroggen-Bastard. *Bot. Mag.*, 32: 17-38.
- Kimber, G., and Feldman, 1987.** Wild wheat, an introduction.(Special Report of the College of Agriculture, University of Missouri, Columbia 353,. pp:1-142.
- Konarev, V., Gubareva, N.K., and Peneva, T.I. 1996.** Seed proteins in varietal identification. *In: Molecular biological aspects of applied botany, genetics and plant breeding. Theoretical basis of plant breeding, volume 1.* St-Petersburg. pp: 51-73.
- Krejčířová, L., Capouchová, I., Petr, J., Bicanová, E., and Faměra, O. 2007.** The effect of organic and conventional growing systems on quality and storage protein composition of winter wheat. *Plant Soil Environ* 53 (11): 499–505.
- Kyoko, Y. and Ohnishi, O. 2001.** Phylogenetic relationship among natural populations of parthenocarpic buckwheat, *Fagopyrum cymosum* Meisn., revealed by allozymes variation. *Gen Res and Crop evol.*, 48 :69-77.
- Ladizinsky, G., and Hymowitz, T.1979.** Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolution studies. *Theor. Appl. Genet.* 54 : 145-151
- Laemli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 685.
- Lafiandra, D., Benedettelli, S., Margiotta, B., Spagnoletti-Zeuli, P. L., and Porceddu, E. 1990.** Seed storage-proteins and wheat genetic resources. *In: Srivastava J.P. and Damania A-B (eds), Wheat genetic resources: meeting diverse needs.* Aleppo, Syria, pp. 73–87.
- Lagudah, E.S., and Halloran, G.M. 1988.** Phelogenetic relationships of *Triticum tauschii* the D genome donor to hexaploid wheat. 1. Variation in HMW subunits of glutenin and gliadins. *Theor. Appl. Genet.* 75: 592-598.
- Lammerts Van Bueren, E.T., Struik, P.C., Jacobsen, E. 2002.** Ecological concepts in organic farming and their consequences for an organic crop ideotype. *Neth.J. Agric. Sc.*, 50, 1-26.
- Laperche, A., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Gardet, O., Hanocq, E., Devienne-Barret, F., Le Gouis, J. 2007.** Using genotype x nitrogen interaction variables to evaluate the QTL involved in wheat tolerance to nitrogen constraints. *Theor Appl. Genet.* 115: 399-415.
- Laumont, P. and Erroux, J. 1961.** Inventaires des blés durs rencontrés et cultivés en Algérie. 95p.

- Law, C.N., and Payne, P.I. 1983.** Genetical aspects of breedings for improved grain proteins contents and type in wheat. *J. Cereal. Sci.* 1:79-93.
- Lawrence, G. J., 1986.** The high molecular weight glutenin subunit composition of Australian wheat cultivars. *Aust. J. Agric. Res.* 26 :014-022.
- Lawrence, G. J., and Shepherd, K. W. 1981.** Chromosomal location of genes controlling seed proteins in species related to wheat : Theoretical and applied genetics. 59: 25-31
- Le Bail, M. 2003.** Le bassin d'approvisionnement : territoire de la gestion agronomique de la qualité des productions végétales. (Soumis à *CR Acad. Franc. Agric.*)
- Le Clech, B., & Hachler, B. 2003.** Agriculture Biologique. Synthèse agricole. Lavoisier, Paris, 312 p.
- Lee J. A., and P. J. Kaltsikes, 1973:** The application of Mahalanobis's generalised distances to measure genetic divergence in durum wheat. *Euphytica*, vol. 22, pp. 124–131.
- Le Gouis, J., Béghin, D., Heumez, E., and Pluchard, P. 2000.** Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *Eur J Agro* 12: 163-173.
- Lemelin, E., Aussenac, T., and Violleau, F. 2007.** Impact of cultivar and environment on size characteristics of wheat proteins using asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Cereal Chemistry*. 82: 28-33.
- Lerner, S. E., Coglialliti, M., Ponzio, N.R., Seghezzo, M.L., Molfese, E.R. and Rogers, W.J. 2004.** Genetic variation for grain protein components and industrial quality of durum wheat cultivars sown in Argentina. *Journal of Cereal Science* 40, 161-166.
- Lilienfield, F.A. 1951.** Genome analysis in *Triticum* and *Aegilops*. Concluding review. *Cytologia*, 16: 101-123.
- Lu, C.G., Hawkesford, M.J., Barraclough, P.B., Poulton, P.R., Wilson, I.D., Barker, G.L., Edwards, K.J. 2005.** Markedly different gene expression in wheat grown with organic or inorganic fertilizer. *Proc. R. Soc. London, Ser. B*, 272 : 1901–1908.
- MacRitchie, F., Kasarda, D.D., and Kuzmicky, D.D. 1991.** Characterization of wheat protein fractions differing in contributions to breadmaking quality. *Cereal Chemistry* 68: 122–130.
- Marchyllo, B.A., Kruger, J.F., and Hatcher, D.W. 1989.** Quantitative reversed phase high performance liquid chromatography analysis of wheat storage proteins a potential quality prediction tool. *J. Cereal.Sci* 9 (2) : 113-130.
- Marino, C.L., Nelson, J.C., Lu, Y.H., Sorrells, M.E., Leroy, P., Tuleen, N.A., Lopes, C.R. and Hart, G.E. 1996.** Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome*, 39: 359366.
- Martinez, M.C., Ruitz, M., and Carrillo, G.M. 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.
- Masclaux, C., Quillere, I., Gallais, A., and Hirel, B. 2001.** the challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physiolo-agronomic and molecular approaches. *Ann. Appl. Bio*, 138:69-81
- McFadden, E.S. and Sears, E.R. 1946.** The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.*, 37: 81-89, 107-116.

- McFadden, E.S., and Sears, E.R. 1944.** The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec. Soc. Genet. Am.*, 13: 26-27.
- McIntosh, R.A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Somers, D.J., Appels, R., and K.M. Devos, 2008:** Catalogue of gene symbols for wheat. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008/>
- McIntosh, R. A., Hart, G. E., Devos, K. M., Gale, M. D., and Rogers, W. J. 1998.** Catalogue of Gene Symbols for Wheat. <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/wgc/98/>.
- Ministère de l'Ecologie du Développement Durable et de l'Aménagement du Territoire MEDDAT .2007.** Le Grenelle de l'environnement. Document récapitulatif des tables rondes tenues à l'hôtel de Roquelaure les 24, 25 et 26 Octobre 2007
- Monneveux, P. 1991.** quelle stratégie pour l'amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréales d'hiver. In : l'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. AUPELF-URELF. Eds Jhon Libbey. Eurotest : 165-186.
- Moraguez, M., Zarco-Hernandez, J.f., Moralejo, M.A., and Royo, C. 2006.** Genetic diversity of glutenin protein subunits composition in durum wheat landraces ( *Triticum turgidum* ssp. *Turgidum* convar. *durum* (Desf.) Mackey from the Mediterranean basin. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53, 993-1002.
- Morel, M.H., and Bonicel, J. 1996.** Determination of the number of cysteine residues in high molecular weight subunits of wheat glutenin. *Electrophoresis* 17, 493-496.
- Morel, M.H. 1994.** Acid polyacrilamide gel electrophoresis of wheat glutenins: A new tool for the separation of high and low molecular weight subunits. *Cereal Chemistry* 71, 283-242
- Morris, C.F. 2002.** Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biology* 48: 633-647.
- Morrison, L.A., Riera-Lizarazu, O., Crémieux, L., and Mallory-Smith, C.A. 2002.** Jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host) x Wheat (*Triticum aestivum* L.) Hybrids: Hybridization Dynamics in Oregon Wheat Fields. *Crop Sci.* 42: 1863-1872.
- Moss, J. 1962.** Les protéines des céréales. Progrès en chimie agricole *et alimentaire*. Ed. Hermann. 1968:47-73.
- Müller, S., Vensel, W.H., Kasarda, D.D., Köler, P., Wieser, H. 1998.** Disulphide bonds of adjacent cysteine residues in low molecular weight subunits of wheat glutenin. *J Cereal Sci.* 27: 109-116.
- Nakamura, H. 2001.** Genetic diversity of high-molecular-weight glutenin subunit compositions in landraces of hexaploid wheat from Japan. *Euphytica* 120: 227-234.
- Nevo, E., Pagnotta M. A., Beiles A., and Porceddu, E. 1995.** Wheat storage proteins: glutenin DNA diversity in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel and Turkey. 3. Environmental correlates and allozymic associations. *Theor. Appl. Genet.* 91, 415-420.
- Nevo, E., and Payne, P.I. 1987.** Wheat storage proteins : Diversity of HMW glutenin subunits in wild emmer from Israel. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 827-836.
- Nieto-Taladriz, M. T., Rodríguez-Quijano M., and Carrillo, J. M. 2000.** Glutenin proteins as markers for durum wheat quality selection. In: *Algérie Interprofessionnel des Céréales, OAIC (ed.)*, Actes du 1er, 267-270.

- Nieto-Taladriz, M.T., Ruitz, M., Martinez, M.C., Vazquez, J.F., and 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.
- Nilsson-Ehle, H. 1909.** *Kreuzungsunter-suchungen an Hafer und Weizen*. Lunds Universitets Arsskrift, N.F. Afd. 2, Bd. 5, No. 2. 122 pp.
- Offermann, F., and Nieberg, H. 2000.** Economic performance of organic farms in Europe. In *Organic farming in Europe: economics and policy*. University of Hohenheim (Eds), Stuttgart, Germany.
- ONIGC. 2006.** Céréales bio : collecte 2005/2006. ONIGC, Paris, France.
- Osborne, T.B. 1907.** The proteins of the wheat kernel. Publ. 84. Carnegie Inst. : Washington, DC
- Østergaard, H., Rasmussen, S.K., Roberts, T.H., and Hejgaard, J. 2000.** Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamins storage proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 33272–33279.
- Pandey, A., and Mann, M. 2000.** "Proteomics to study genes and genomes." *Nature* . 405(6788): 837-46.
- Panozzo, J.F., and Eagles, H.A. 2000.** Cultivar and environment effects on quality characters in wheat. II. Protein. *Aust. J. Agri. Res.* 51: 629–636.
- Patterson, S.D., and Aebersold, R.H. 2003.** Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33 Suppl: 311-23.
- Payne, P.I. 1987.** Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread making quality. *Annual Revue of Plant Physiology* 38:141-153.
- Payne, P.I., Holt, L. M., Jackson, E.A., and Law, C.N.1984.** Wheat storageProteins : their genetics and their potential for manipulation by plantBreeding. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 293 : 248-260.
- Payne, P. I., Lawrence, G. J. 1983.** Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for the high molecular- weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.* 11:29-35
- Payne, P.I., Corfield, K.G., and Blackman, G.A.. 1979.** Identification of a high-molecular-weight subunits of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* 55: 153-159.
- Perron, C.E., Luow, O.M., and Townley Smith, F. (1998)** The use of doubled haploidsto investigate the effectof endosperm proteins on dough mixing and baking propertes. *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Wheat Genet. Symp.* 4:284-250
- Pflüger, L.A., Alvarez, J.B., and Martín, L.M. 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., Mellini, F., Bretta, A., and DalBelinperufto, A. 1989.** The high-molecular-weight glutenin subunits of common wheat cultivars grown in Italy. *Journal of Genetics and Breeding* 43, 17-24.

- Preiss, 1998.** Biosynthesis of starch and its regulation, in Stumpf PK, Conn EE (Eds). The biochemistry of plants. Vol 14. Academic press. New York. Pp: 181-254.
- Prugar, J. 1999.** The Quality of Plant Production from Organic Farming. Study Information – Plant Production. ÚZPI, Praha. (In Czech)
- Purcino, A.A.C., Arellano, C., Athwal, G.S., and Huber, S.C. 1998.** Nitrate effect on carbon and nitrogen assimilating enzymes of maize hybrids representing seven eras of breeding. *Maydica* 43: 83–94.
- Raciti, C.N., Doust, M.A., Lombardo, G.M., Boggini, G., and Pecetti, L. 2003.** Characterization of durum wheat mediterranean germplasm for high and low molecular weight glutenin subunits in relation with quality. *European Journal of Agronomy*.
- Randhawa H S, Dhaliwal H S, Harjit Singh (1997)** Diversity for HMW glutenin composition and the origin of polyploidy wheats. *Cereal Research Communications*. Vol. 25 N° 1
- Rayburn, A.L., and Gill, B.S.** 1985. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences of wheat chromosomes. *J. Hered.*, 76: 78-81.
- Riley, R., Unrau, J., and Chapman, V.** 1958. Evidence on the origin of the B genome of wheat. *J. Hered.*, 49: 91-98.
- Riquois, A. 1997.** Pour une Agriculture biologique au cœur de l'agriculture française. Proposition pour un Plan pluriannuel de développement. Rapport d'étape. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Conseil général du Génie rural des Eaux et Forêts, Paris, France.
- Rodriguez-Quijano, M., Nieto-Taladiz, M.T., and Carrillo, J.M. 2001.** Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in three species of *Aegilops*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48:599-609.
- Rodriguez-Quijano, M., Nieto-Taladriz, M.T., and Carrillo, J.M. 1997.** Variation in B-LMW glutenin subunits in Einkorn wheats. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:539-543.
- Rogers, J. S. 1972.** Measures of genetic similarity and genetic distances. *Studies in Genetics VII*. University of Texas. Publication 7213, 145-153.
- Rotter, B.A., Prelusky D.B, Pestka J.J. 1996.** Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, 48 : 1-34.
- Sakamura, T. 1918.** Kurze Mitteilung über die Chromosomenzahlen und die Verwandtschaftsverhältnisse der Triticum-Arten. *Bot. Mag.*, 32: 151-154.
- Sarkar, P. and Stebbins, G.L. 1956.** Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am. J. Bot.*, 43: 297-304.
- Satu, J., Kaisa, M., Massat, N., Howard, D., Shepherd, L., McNicol, J., Cakmak, I., Cooper, J., Lück, L., Kärenlampi, S., Leifert, C. 2007.** Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics* 7: 597–604
- Sax, K. 1922.** Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids. *Genetics*, 7: 513-550.
- Sax, K. 1918.** The behavior of the chromosomes in fertilization. *Genetics*, 3: 309-327.

- Schollenberger, M., Suchy, S., Terry-Jara, H., Drochner, W., and Müller, H.M. 2002.** Fusarium toxins in wheat flour collected in an area in southwest Germany. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 85-89.
- Schollenberger, M., Suchy, S., Terry-Jara, H., Drochner, W., and Müller, H.M. 1999.** A survey of Fusarium toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. *Mycopathologia*, 147: 49-57.
- Sears, E.R. and Sears, L.M.S. 1978.** The telocentric chromosomes of common wheat. *In* S. Ramanujams, ed. *Proc. 5th Int. Wheat Genetics Symp.*, p. 389-407. New Delhi, Indian Agricultural Research Institute.
- Shewry, P.R. 1999.** The synthesis, processing, and deposition of gluten proteins in the developing wheat grain. *Cereal Foods World*, 44 : 587–589.
- Shewry, P.R., D.Bradberry, J.Franklin, and R.P.White.1984.** the chromosomal locations and linkage relationship of the structural genes for the prolamin storage proteins (secalins) of rye. *Theor. Appl. Genet.* 69:63-69.
- Singh, J., and Skerritt, J.H. 2001.** Chromosome control of albumin and globulin in wheat grain assessed using different fractionation procedures. *J. Cereal. Sci.* 33 : 163-181.
- Singh, N.K., Shepherd, K.W., and Cornish, G.B. 1991.** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J.Cereal. Sci* 14:203-208.
- Singh, N. K., & K.W.Shepherd . 1988.** Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1 . genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 75 (4): 628-641.
- Stitt, M. 1999.** Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 178–186.
- Sutton, K.H. 1991.** Qualitative and quantitative variation among high molecular weight subunits of glutenin detected by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Cereal Sciences* 14, 25-34
- Sylvander, B. 2000.** Les tendances de la consommation de produits biologiques en France et en Europe : conséquences sur les perspectives d'évolution du secteur. *In* Allard G, DAVID C and Henning J: L'agriculture biologique face à son développement. Les enjeux futurs. INRA Éditions, 193-212.
- Taylor, B.R., Watson, C.A., Stockdale, E.A., McKinlay, R.G., Younie, D., and Cranstoun, S.A.A. 2001.** Current practices and future prospects for organic cereal production : survey and literature review. HGCA, London, UK.
- Thomas, H.R., and Jorn, H. 2008.** Serpins in plants and green algae.*Funct Integr Genomics.* 8: 1-27.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., and Polasky, S. 2002.** Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677.
- Trewavas, A. 2002.** Malthus foiled again and again. *Nature* 418: 668-670.
- Triboi, E., and Leblevenec, L. 1995.** Temperature effects on grain growth and protein fraction accumulation in winter wheat. *J Exp Bot*, 46 supplement.
- Upadhyia, M.D., and Swaminathan, M.S. 1963.** Genome analysis in *Triticum zhukovskiyi*, a new hexaploid wheat. *Chromosoma*, 14: 589-600.

- Xueyan S., Sally, R.C., Scott D. H., and Patrick F.B. 2007.** Variation for glutenin and waxy alleles in the US hard winter wheat germplasm. *Journal of Cereal Science* 45 : 199-208
- Vallavielle-Pope, C., Goyeau, H., Lannou, C., Mille, B., and Haj Fradj, M. 2001.** Intérêts épidémiologiques des associations variétales de blé tendre : combinaison des résistances. Rencontre INRA ressources génétiques et agriculture biologique : cas du blé tendre et triticale, 3 p.
- Vallega, V., and Waines, J.G. 1987.** High molecular weight glutenin subunit variation in *Triticum turgidum* var. *dicoccum*. *Theoretical and Applied Genetics* 74, 706-710.
- 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. and Appels, R. 1995.** Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oat. *Genome*, 38: 45-59.
- Van Hintum, J. L., and Elings, A. 1991.** Assessment of glutenin and phenotypic diversity of Syrian durum wheat landraces in relation to their geographical origin. *Euphytica* 55, 209-215.
- Van Slageren, M.W. 1994.** Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae). Wageningen, Netherlands, Agricultural University. 512 pp.
- Vazquez, J. F., Ruiz, M., Nieto-Taladriz, M. T., and Albuquerque, M. M. 1996.** Effects on gluten strength of low Mr glutenin subunits coded by alleles at the Glu-A3 and Glu-B3 loci in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 24, 125-130
- Wang, G.Z., Miyashita, N.T. and Tsunewaki, K. 1997.** Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 14570-14577.
- Weir, B. S. 1996.** Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer,
- Wieser, H., and Seilmeier, W. 1998.** The influence of nitrogen fertilization on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *J. Sci. Food .Agri.* 76: 49–55.
- Willer, H., and Yussefi, M. 2007.** The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2007. IFOAM and FiBL, Bonn, Germany.
- William, M.D.H.M., Pena, R.J., and Mujeeb-Kazi, A. 1993.** Seed protein and isozymes variations in *Triticum tauschii*(*Aegilops squarosa*). *Theo. Appl. Genet.* 87: 60-63
- Woese, K., Lange, D., Boess, C., and Bögl, K.W. 1997.** Comparison of organically and conventionally grown foods – results of a review of the relevant literature. *J. Sci. Food. Agric.* 74:281–293.
- Wrigley, C.W., DuCross, D.L., Fullington, J.G., and Kasarda, D.D. 1984.** Changes in polypeptide composition and grain quality due to sulfur deficiency in wheat. *J. Cereal Sci.* 2: 15–24.
- Yan, Y., Hsam, S.L.K., Yu, J.Z., Jiang, Y., Ohtsuka, I., and Zeller, F.J. 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.
- Yan, Y.M., Hsam, S.L.K., Yu, J.Z., Jiag, Y., and Zeller, F.G. 2002.** Genetic polymorphisms at *Gli-D<sup>t</sup>* gliadin loci in *Aegilops tauschii* as revealed by acid polyacrylamide gel and capillary electrophoresis. *Plant breeding*. Volume 122 Issue 2:120-124.

**Zhang, H., Jia, J., Gale, M.D., and Devos, K.M.1998.** Relationships between the chromosomes of *Aegilops umbellulata* and wheat. *Appl. Genet.* 96 : 69-75.

**Zhu, J., Kahn, K., Huang, S., and O'Brien, L. 1999.** Allelic variation at Glu-D1 locus for high molecular weight (HMW) glutenin subunits: quantification by multistacking SDS-PAGE of wheat grown under nitrogen fertilization. *Cereal Chem.* 76: 915–919.

**Zörb, C., Niehaus, K., Barsch, A., Betsche, T., and Langenkämper, G. 2009a.** levels of compounds and metabolites in wheat ears and grains in organic and conventional agriculture. *J. Agric. Food. Chem.* 57: 9555-9562.

**Zörb, C., Betsche, T., and Langenkämper, G. 2009b.** Search for Diagnostic Proteins To Prove Authenticity of Organic Wheat Grains (*Triticum aestivum* L.) *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2932–2937.

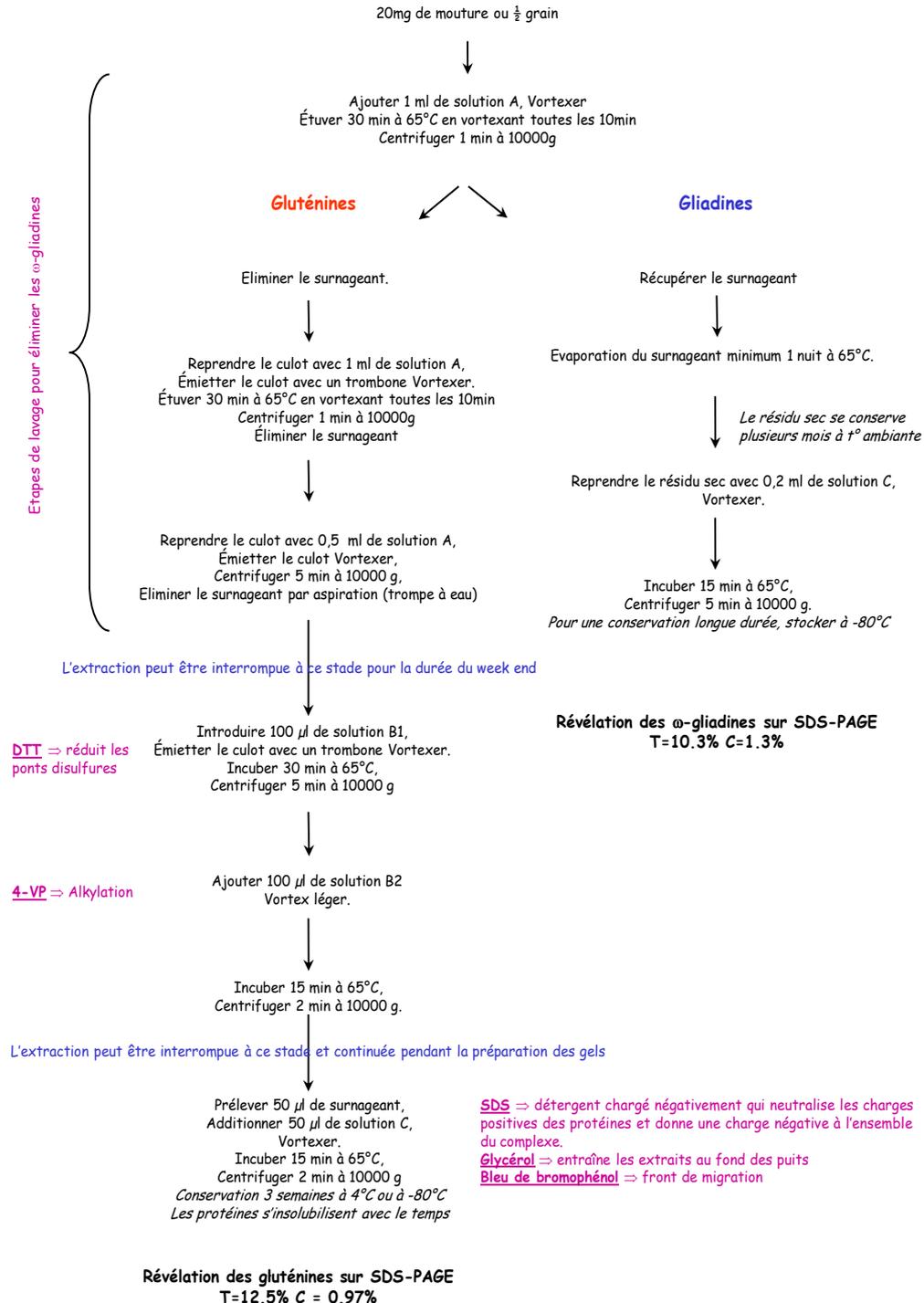
---

# ANNEXES

---

## ANNEXE 1 : EXTRACTION DES GLUTENINES HPM ET FPM

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



## Solutions utilisées dans l'extraction des gluténines

### Solution A

Propanol-1	50 ml
Eau distillée	qsp100 ml

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

Propanol-1	10 ml
Tris HCl 1M pH 8	1.6 ml
Eau distillée	qsp20 ml

### Solution B1 (à préparer ex temporairement)

Solution B	7 ml
Dithiotreitol	70 mg

### Solution B2 (à préparer ex temporairement)

Solution B	7 ml
4-vinyl-pyridine	98 µl

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

SDS	0.2 g
Glycérol	4 ml
Bleu de bromophénol	2 ml
Tris HCl 1M pH 8	0.8 ml
Eau distillée	qsp10 ml

## ANNEXE 2 : ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE SELON SINGH

---

### Documents de référence :

Singh, Shepherd et Cornish *et al*, Journal of Cereal Science 14, 203-208 (1991)

### Solutions pour la préparation des gels

#### Tampon Tris-HCl pH: 8,8 (Conserver à 4°C).

Calibrer le pH mètre si cela n'a pas été fait récemment.

- |                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| - Tris (hydroxyméthyl aminomethane)   | 60.57g       |
| - Eau                                 | qsp ~ 400 ml |
| - Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant | ~ 8 à 10 ml  |
| - Eau                                 | qsp 500 ml   |

#### Tampon Tris-HCl pH: 6,8 (Conserver à 4°C.)

Calibrer le pH mètre si cela n'a pas été fait récemment.

- |                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| - Tris (hydroxyméthyl aminomethane)   | 30.285g      |
| - Eau                                 | qsp ~ 200 ml |
| - Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant | ~ 19,5 ml    |
| - Eau                                 | qsp 250 ml   |

#### Solution stock de SDS à 10% Stocker à température ambiante.

- |                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| - Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) | 1g        |
| - Eau                          | qsp 10 ml |

#### Solution d'ammonium peroxydisulfate à 1%(A préparer le jour même).

- |                            |           |
|----------------------------|-----------|
| - A.P.S. (stocké au frigo) | 0,2g      |
| - Eau                      | qsp 20 ml |

#### Tampon d'électrophorèse(Stocker à température ambiante.)

Le tampon des cuves doit être renouvelé lorsque le voltage dépasse 500V en fin de migration (environ 20 utilisations), prévoir 4 litres par cuve. Prévoir 1 litre pour le bac supérieur à chaque électrophorèse.

- |           |         |
|-----------|---------|
| - Glycine | 70.55g  |
| - Tris    | 15g     |
| - SDS     | 5g      |
| - Eau     | qsp 5 l |

#### Solution de coloration (pour les gels monodimensionnels) A préparer le jour même

Mettre le TCA et le Bleu en agitation avant de préparer la solution

- |                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| T.C.A. 60%                          | 50 ml      |
| Sol. Mère de Bleu de Coomassie R250 | 12,5 ml    |
| Eau osmosée                         | qsp 250 ml |

Bien mettre en agitation avant utilisation.

#### Solution mère de Bleu de Coomassie R250

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

Laisser en agitation au moins 2 heures.

Filtrer cette solution avec un filtre plissé n°3.

Attention : mettre en 1er l'alcool dans le bêcher avec 1 barreau aimanté en agitation, puis mettre le bleu de Coomassie dans le bêcher en agitation (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant).

### Acide Trichloracétique 60 % (GANTS)

- TCA 1kg
  - Eau Ultra pure qsp 1667ml
- Stocker à température ambiante.

### Préparation des gels

- Nettoyer les plaques, les espaceurs et les peignes à l'alcool à 95°. Monter les plaques sur les supports :
- Vérifier l'étanchéité des montages : plonger le montage dans de l'eau osmosée en utilisant la cuve destinée à cet usage ou une baignoire. Il peut y avoir une fuite : Soit parce que les plaques n'ont pas été correctement appliquées contre les joints du support inférieur ⇒ Recommencer le montage. Soit parce que les plaques de verre sont endommagées ⇒ si la brèche est de petite taille, on peut l'enduire de « Cello-seal ». Sinon, recommencer le montage avec une autre plaque.
- Faire une marque à 4.5 cm et une autre à 0.5 cm du bord supérieur des plaques.
- Mettre les montages à niveau (avec niveau à bulle) et positionner sous un boa, dans un endroit où ils ne gêneront pas.
- Préparer le gel de séparation
- Tous les volumes sont donnés pour des gels 16 x 18 cm, 1mm d'épaisseur.
- Toujours mettre en agitation les solutions utilisées avant de commencer la préparation.

T = Quantité totale d'acrylamide dans le gel.

C = Maillage du gel.

### Gel de séparation pour gluténines HPM et FPM :

T:12,52% C: 0,97%

C'est le type de gel utilisé classiquement pour les gluténines HPM et FPM.

En ml	1 gel	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	6.2	12.4	23.9	36.6	48.0	60.1	71.9
Bisacrylamide 2%	1.2	2.4	4.7	7.2	9.4	11.8	14.1
Eau permutée	4.3	8.6	16.5	25.2	33.1	41.5	49.6
Tampon Tris-HCL pH 8.8	7.6	15.2	29.3	44.8	58.9	73.7	88.2
SDS 10%	0.20	0.40	0.77	1.18	1.55	1.94	2.32
APS 1%	0.50	1.00	1.93	2.95	3.88	4.85	5.80
TEMED	0.010	0.020	0.039	0.059	0.078	0.097	0.116
Volume total	20	40	77	118	155	194	232

Temps de polymérisation : environ 20 minutes.

Gel de séparation pour Gluténines HPM et FPM :

T:13% C: 1,7%

En ml	1 gel	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	6.4	12.8	24.6	37.7	49.5	62.0	74.1
Bisacrylamide 2%	2.2	4.4	8.5	13.0	17.1	21.4	25.6
Eau permutée	3.1	6.2	11.9	18.2	24.0	30.0	35.8
Tampon Tris-HCL pH 8.8	7.6	15.2	29.3	44.8	58.9	73.7	88.2
SDS 10%	0.20	0.40	0.77	1.18	1.55	1.94	2.32
APS 1%	0.50	1.00	1.93	2.95	3.88	4.85	5.80
TEMED	0.010	0.020	0.039	0.059	0.078	0.097	0.116
Volume total	20	40	77	118	155	194	232

Temps de polymérisation : environ ½ heure.

Ce gel est utilisé pour mieux distinguer entre: GluA3a et GluB3b, GluA3a et GluB3f, GluB3c et GluA3ef, GluA3b et GluB3b, GluA3ef et GluB3b.

Par contre GluA3a et GluB3a sont confondues.

Il permet également une meilleure distinction entre 13-16 et 23-18

Par contre, 14-15 et 13-16 sont moins bien séparées.

- Couler le gel (METTRE LE BOA EN MARCHE)
- Pendant le dégazage du gel, préparer le matériel pour le couler : bûcher, seringue, eau. Introduire les catalyseurs dans la fiole à vide, bien homogénéiser et verser le gel dans un bûcher.
- Le couler entre les plaques à l'aide de la seringue (Attention aux projections) jusqu'à la première marque faite sur les plaques (+ 2 mm au-dessus du trait). Conserver l'excédent de préparation dans la seringue.
- Recouvrir la surface du gel avec environ 180 µl d'eau ultra pure (ou d'un mélange eau + alcool).
- Indiquer sur les plaques de verre le type de gel (10 % ou ...).
- Laisser polymériser le gel : la polymérisation est terminée *quand* on voit une ligne horizontale entre le gel polymérisé et ce qui est resté liquide, vérifier avec le contenu de la seringue.

### Préparer le Stacking gel :

T: 2,88% C:1,42%

En ml	1 gel	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	0.5	1.0	2.0	2.8	3.7	4.6	5.5
Bisacrylamide 2%	0.1	0.3	0.6	0.8	1.1	1.3	1.6
Eau permutée	5.1	10.2	20.4	29.1	37.8	47.3	56.8
Tampon Tris-HCL pH 6.8	0.8	1.7	3.4	4.8	6.2	7.8	9.4
SDS 10%	0.07	0.14	0.28	0.40	0.52	0.65	0.78
APS 1%	0.35	0.70	1.40	2.00	2.60	3.25	3.90
TEMED	0.007	0.014	0.028	0.040	0.052	0.065	0.078
Volume total	7	14	28	40	52	65	78

Avant de couler le Stacking gel, enlever l'eau.

- Couler le gel de stacking jusqu'à 0.5 cm du haut des plaques (+ 2 mm au-dessus du trait).
- Mettre les peignes (15 ou 20 puits selon besoin) en évitant la formation de bulles. Laisser polymériser environ 45 minutes.
- Retirer les peignes et mettre du tampon d'électrophorèse dans les puits.

A ce stade, les gels peuvent attendre jusqu'au lendemain à condition de fixer le bac supérieur sur le montage et d'y verser un peu de tampon d'électrophorèse

- Faire les dépôts
- Positionner les échantillons: « Extraction des glu et gli ») dans l'ordre de dépôt sur les portoirs, préparer les feuilles de manip.
- *Quand* le stacking est polymérisé, descendre les serre-joints : dévisser tous les serre-joints, les laisser glisser le long des plaques et resserrer les serre-joints, les plaques sont légèrement plus hautes que le haut des serre-joints et viendront bien s'appuyer contre les joints du bac supérieur.

Déposer : 7 µl/puit pour une lecture qualitative

Note : Si l'échantillon « remonte », c'est qu'il reste trop d'alcool. On peut ajouter une goutte de glycérol dans le tube.

- Réaliser les migrations
- METTRE EN ROUTE LE CRYOTHERMOSTAT.
- Fixer le bac supérieur, positionner les cames bien à la verticale.
- Introduire un peu de tampon d'électrophorèse dans les fentes du bac supérieur : S'il coule le long des plaques :
- S'assurer que les plaques sont plus hautes que les serre-joints, sinon descendre les serre-joints (cf. ci-dessus).
- Vérifier l'état des plaques, s'il y a une légère brèche enduire de « cello-seal ».
- Bien sécher le dessous du gel.

- Introduire l'ensemble « bac sup. + plaques » dans le bac inférieur rempli de tampon en l'inclinant légèrement, cela évite de coincer des bulles sous les gels. Enlever les bulles qui pourraient se trouver au-dessus des puits et en bas du gel. Finir de remplir le bac supérieur (ne pas faire tremper la partie métallique de la fiche banane dans le tampon).

Mettre le couvercle de la cuve.

- Faire le branchement :
  - \* Électrode du bac supérieur (noire) au pôle - (noir du générateur)
  - \* Électrode du bac inférieur (rouge) au pôle + (rouge du générateur)
- Condition de migration:
  - \* 30 mA constant / gel pour les gels à 10% et 12% (soit 60 mA pour 2 gels)
  - \* 35 mA constant / gel pour les gels à 13%

#### **Arrêt de la migration:**

- \* Pour les  $\omega$ -gliadines → arrêt à la sortie du front de migration
- \* Pour les H.P.M et F.P.M (gels 12%) → arrêt 1h après la sortie du front
- \* Pour les H.P.M et F.P.M (gels 13%) → arrêt 2h après la sortie du front

#### **Démoulage des gels**

- Les gels ne doivent pas être touchés avec les doigts.
- En sortant le montage de la cuve, veiller à bien respecter le sens du gel (le côté gauche doit toujours rester à gauche).
- Décoller les deux plaques à l'aide de la spatule rouge, retirer le stacking avec une bande de papier, découper le coin supérieur gauche du gel et faire glisser délicatement le gel dans une bassine préalablement étiquandée.

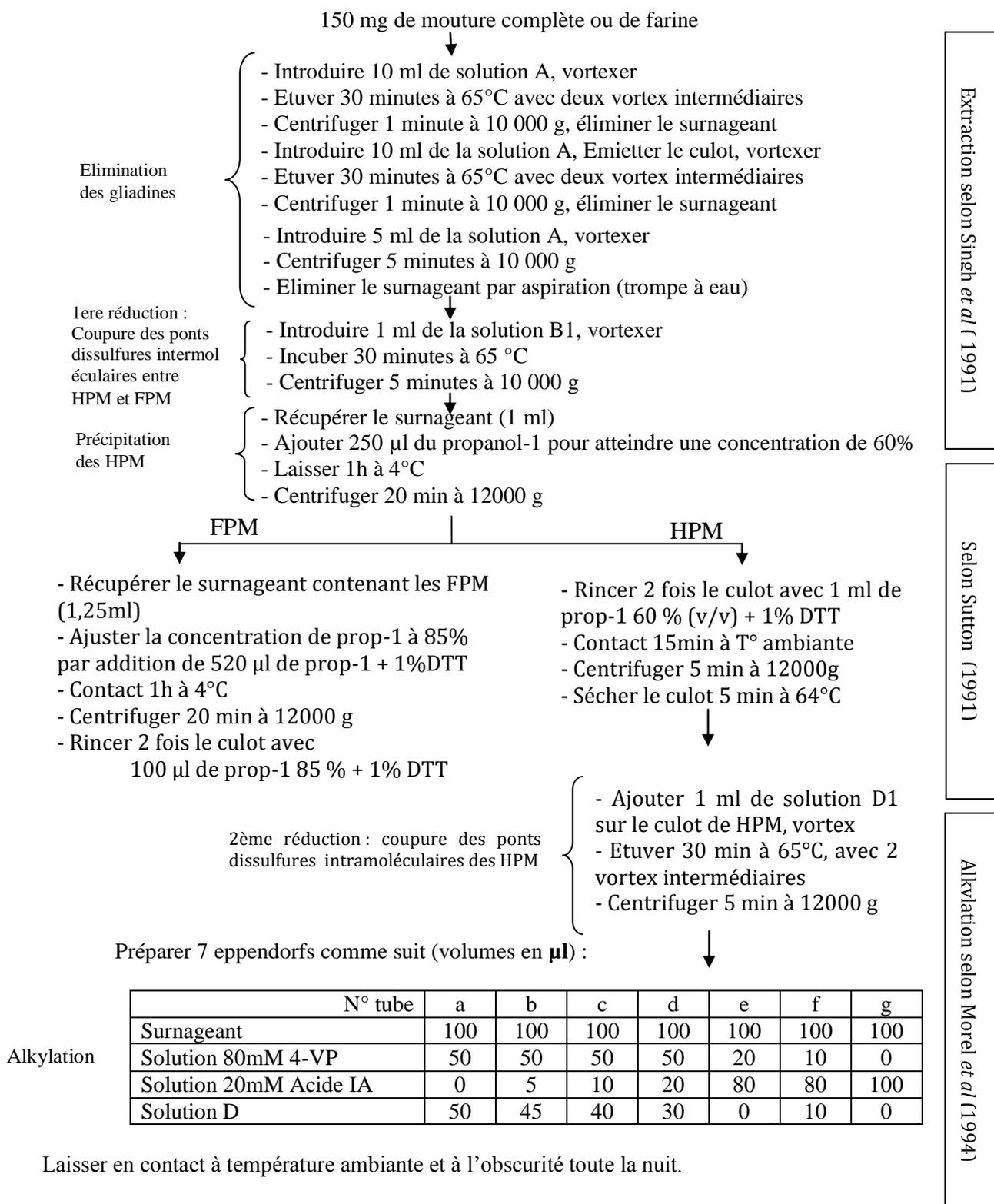
#### **Coloration : (SORBONNE)**

- Ajouter 250ml de solution de coloration dans la bassine contenant le gel, laisser sous agitation 24 heures.
- Récupérer la solution de coloration usée dans le bidon « déchets » approprié. Décolorer à l'eau osmosée.

#### **~Séchage des gels :**

- Mettre le gel décoloré dans une solution de glycérol 10 % au minimum 1 h
- Découper 2 feuilles de cellophane : 1 feuille à la dimension de la plaque de verre utilisée, 1 feuille ayant 5 cm de plus sur tous les côtés par rapport à la feuille précédente. Ne pas oublier de placer l'étiquandte du gel sous la plaque de verre.
- Mettre la plaque de verre sur la paillasse en la surélevant (couvercle plastique des boites de coloration).
- Tremper la plus petite des feuilles dans le glycérol 10 %, la positionner sur la plaque de verre et lisser pour éliminer les bulles d'air.
- Positionner le gel sur cette feuille, lisser pour éliminer les bulles d'air. Tremper la 2ème feuille, c'est-à-dire la plus grande, dans le glycérol 10 %, lisser pour éliminer les bulles d'air.
- Replier les bords qui dépassent sous la plaque de verre. Laisser sécher à l'air libre.

### ANNEXE 3 : DETERMINATION DU NOMBRE DE GROUPEMENTS THIOLS (EXTRACTION ET ALKYLATION DES HPM)



### le lendemain

Préparer 2 échantillons supplémentaires :

$$x = 40 \mu\text{l (a)} + 40 \mu\text{l (g)}$$

$$y = 10 \mu\text{l (a)} + 10 \mu\text{l (g)} + 30 \mu\text{l (b)} + 30 \mu\text{l (c)} + 30 \mu\text{l (d)} + 30 \mu\text{l (e)} + 30 \mu\text{l (f)}$$



- Ajouter de l'acétone pure pour obtenir une concentration finale de 80% (v/v) soit 800  $\mu\text{l}$  pour 200  $\mu\text{l}$  d'extrait à précipiter
- Contact 10 minutes à température ambiante
- Centrifuger 5 minutes à 10 000 g, éliminer le surnageant
- Séchage des culots 30 minutes sous sorbonne en fonctionnement



- Ajouter 20  $\mu\text{l}$  de solution mère de vert de méthyl dans 10 ml de tampon de charge
- Ajouter 30  $\mu\text{l}$  de tp de charge sur x et 50  $\mu\text{l}$  pour tous les autres extraits
- Vortexer
- Contact 15 minutes

---

### **Préparation des gels et migration (Acid-PAGE Urée 2M Selon Cléments, (1988))**

Le matériel (seringue, bécher ..) et les solutions doivent être stockés avant utilisation à 4°C pour un coulage à froid.

Gels (T=12.375%, C = 3.03%, Urée 2M) :

Volumes en ml	Concentration du gel	1 gel	2 gels
Acrylamide 40%	12%	13.5	27
Bisacrylamide 2%	0.375%	8.4	16.9
Urée (en g)	2M	5.41g	10.81
Acide acétique glacial	0.75%	0.34	0.68
Sol. Mère de sulfate ferreux	0.0014%	0.0158	0.0315
Sol. Mère d'ac. Ascorbique	0.1%	1.13	2.25
Eau ultrapure qsp		45	90
Attention ce gel polymérise très vite : couler <b>1 gel seulement à la fois</b>			
H2O2 (0.66%)	0.0008%	0.0563	0.1125

Dépôts 7 $\mu\text{l}$ /puit (peigne 15 dents)

Migration : 800V/gel (ampérage non limitant) pendant 5h

Sol mère d'ac. ascorbique (préparer dans un tube Eppendorf) (Se conserve 1 semaine à 4°C).

Acide ascorbique 4%

0.04g

H2O UP

1ml. Vortex

Sol mère de sulfate ferreux (préparer dans un tube Eppendorf) (Se conserve 1 semaine à 4°C, à l'abri de la lumière)

Sulfate ferreux 4%

0.04g

H2O Up

1ml. Vortex

Eau oxygénée (0.66%) (Se conserve 1 semaine à 4°C.)

Eau oxygénée 10 volumes

1ml

H2O Up qsp

5 ml

Tampon d'électrophorèse (A préparer le jour même)

- Pour le bac supérieur :

Acide acétique 0.14%

1 ml

Eau UP

700 ml

- Pour le bac inférieur :	
Acide acétique 0.24%	10 ml
Eau UP	4100ml
<u>Solution de coloration (A préparer le jour même)</u>	
T.C.A. 60%	50 ml
Sol. Mère de Bleu de Coomassie R250	12.5 ml
Eau UP	qsp 250 ml
<b>Solutions pour extraction et précipitation des gluténines</b>	
<u>Solution A (à faire le jour même, l'alcool peut s'évaporer)</u>	
Propanol-150%	50 ml
Eau UP	qsp 10 ml
<u>Tampon tris HCL 1M pH =8.0 (Conservation : plusieurs semaines au frigo.)</u>	
Tris (hydroxy méthyl) amino méthan	6.057 g
Ajuster à pH =8.0 avec HCL fumant	~ 3 ml
Eau UP	qsp 50 ml
<u>Solution B (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Propanol-1 50%	5 ml
Tris HCL 1 M pH = 8.0 80mM	0.8 ml
Eau UP	qsp 10 ml
<u>Solution B1 (solution B + 1% DTT) (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Solution B	1 ml
DL-Dithiothréitol (volatil)	10 mg
<u>Solution D(à faire le jour de l'extraction)</u>	
Propanol-2 50% (v/v)	0.5 ml
Tris HCL 1 M pH = 8.0 80mM	0.08 ml
Eau UP	qsp 1 ml
<u>Solution D1 (Solution D + 20mM DTT) (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Solution D	1 ml
DTT (20mM)	3.085 mg
<u>Solution de rinçage des SG-HPM précipitées (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Propanol-1 60%	6 ml
DTT 1% (w/v)	0.06 g
Eau UP	qsp 10 ml
<u>Solution de rinçage des SG-FPM précipitées (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Propanol-1 85%	8.5 ml
DTT 1% (w/v)	0.06 g
Eau UP	qsp 10 ml
4-VP et Acide iodoacétique sont très toxiques A manipuler avec précautions	
<u>Solution D2 (Solution D + 80mM 4VP) (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Solution D	1 ml
4-vinylpyridine	8,615 µl
<u>Solution D2' (Solution D + 20mM Acide iodoacétique) (à faire le jour de l'extraction)</u>	
Solution D	1 ml
Acide iodoacétique	3.7 mg
<u>Tampon de charge :</u>	
Urée 6M	3.6 g
Glycérol 30% v/v	3 ml
Acide acétique 0,14%	0.014 ml
Eau UP	qsp 10 ml
<u>Vert de methyl (Se conserve 1 mois à 4°C)</u>	
Qqes grains dans un tube Eppendorf d'eau Up. Vortex.	
Doit être assez concentrée car on n'utilise que qqes µl par échantillon.	

## ANNEXE 4 : EXTRACTION ET SEPARATION DES GLIADINES PAR LA TECHNIQUE ACID-PAGE (PROTOCOLE L. CABALLERO)

### Documents de reference

- Caballero L, Martin L.M *et alvarez* J.B, 2004, "Variation et genetic diversity for gliadins in Spanish spelt wheat accessions" *Genetics Resources et Crop Evolution* 51:679-686
- Khan K, Hamada A.S et Patek J, 1985, "Polyacrylamide gel electrophoresis for wheat variety identification" *Cereal Chemistry* 62: 310-313

### 1- Préparation des échantillons (extraction des gliadines)

- Couper en deux un grain de blé, et l'écraser à l'aide de la pince, mettre le broyat dans un tube de 1,5 ml ou peser directement 20 mg de farine dans un tube de 1,5 ml.
- Se placer sous hotte chimique : mettre 100 µl de la solution d'extraction par tube. Mélanger à l'aide d'un trombone (ne pas vortexer)
- Mettre un petit barreau magnétique dans le tube et laisser agiter très doucement pendant 45 minutes. Si le nombre d'échantillons est important (et pas assez de barreaux disponibles), on peut procéder à l'extraction en laissant les tubes à température ambiante sous la hotte.
- Centrifuger 15 minutes à 10000 rpm
- Récupérer le surnageant dans un autre tube de 1,5 ml
- Rajouter 3 µl de vert de méthyl. Vortexer

### 2- Préparation des plaques

- Nettoyer les plaques à l'alcool puis à l'eau osmosée. Bien les sécher
- Recouvrir les plaques d'un film de glycérol pur avec un papier Kimwipes
- Monter les plaques sur leur support de coulage et vérifier leur étanchéité
- Placer les peignes

### 3- Préparation des gels Acid-Page

Les gels se solidifiant en 3 minutes, il est fortement conseillé de couler les gels deux par deux.

Gels à T= 8,5%, C=2,67%, les plaques utilisées sont de 18 x 16 cm

- Se placer sous hotte chimique :
- Dans un erlen en verre avec embout pour trompe à vide, préparer le mélange suivant :

Produit	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels
Acrylamide 40%	12 ml	24 ml	36 ml	72 ml
Bis acrylamide 2%	12 ml	24 ml	36 ml	72 ml
Tampon lactate d'aluminium	1,6 ml	3,2 ml	4,8 ml	6,4 ml
Eau ultra-pure	57,7 ml	115,5 ml	173,2 ml	404,1 ml
Solution mère d'acide ascorbique	80 µl	160 µl	320 µl	640 µl
Solution mère de sulfate ferreux	8 µl	16 µl	32 µl	64 µl

Rajouter le catalyseur :

Produit	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels
H2O2 (solution à 0.33%)	0,73 ml	1,46 ml	2,92	5,84 ml

- Enlever les peignes. Rincer les puits 2 fois avec du tampon d'électrophorèse Acid-Page.
- Remonter les plaques

### 4- Dépôt des échantillons et migration

- Se placer sous hotte chimique :
- Peigne de 15 dents : déposer 2 µl/puit ;      - Peigne de 20 dents : déposer 1,5 µl/puit
- Positionner le bac supérieur. Vérifier l'étanchéité, Placer les plaques dans la cuve d'électrophorèse, Chasser les bulles
- Migration : programmer 40 mA/gel, voltage non limitant (900V)
- ATTENTION : branchement au générateur (borne + : bac supérieur ; borne - : bac inférieur), soit l'inverse d'une électrophorèse classique.
- Le front de migration (vert de méthyl) sort du gel au bout de 35 minutes environ.
- Laisser migrer 1 heure de plus. Durée totale de la migration 1h35.

## 5- Coloration au Bleu de Coomassie

- Mettre 200 ml de solution de coloration dans une bassine (carrée de préférence)
- Les gels peu concentrés en acrylamide sont fragiles : démouler les gels délicatement dans la bassine.
- Laisser colorer 24h sous faible agitation (35 rpm). La coloration peut être plus longue (jusqu'à 72h).
- Faire 3 rinçages de 20 minutes à l'eau osmosée puis scanner les gels.

## 6- Solutions

**Solution d'extraction :** pour 100 ml (La solution peut de conserver plusieurs mois à température ambiante)

- 10,96 ml de N-N Diméthylformamide
- 20 g de saccharose
- qsp 100 ml H<sub>2</sub>O ultra-pure

**Vert de méthyl :** 1 ml (La solution se conserve 1 mois à 4°C)

- Mettre 1 ml d'eau ultra-pure dans un tube de 1,5 ml
- Ajouter 5 mg (ou quelques grains) de vert de méthyl. Vortexer

**Tampon lactate (50X) :** 200 ml (La solution se conserve à 4°C pendant 1 mois)

- Peser 12,5 g de lactate d'Aluminium
- Rajouter de l'eau ultra-pure jusqu'à 100 ml et laisser dissoudre
- Ajouter 20 ml d'acide lactique (pH doit être de 2,95)
- Qsp 200 ml H<sub>2</sub>O ultra-pure

**Acide ascorbique :** 1 ml

- Peser 0,1 g d'acide ascorbique dans un tube de 1,5 ml et rajouter 400 µl d'eau ultra-pure.
- Vortexer. La solution se conserve 1 semaine à 4°C

**Sulfate ferreux :** 1 ml (La solution se conserve 1 semaine à 4°C)

- Peser 40 mg de FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O dans un tube de 1,5 ml et rajouter 1 ml d'eau ultra-pure.
- Vortexer.

**Eau oxygénée à 0,33% :** 10 ml

- 1,1 ml d'eau oxygénée 10 volumes (Gifrer)
- qsp 10 ml H<sub>2</sub>O ultra-pure. La solution se conserve 1 semaine à 4°C

**Tampon d'électrophorèse :** 5 litres

- 100 ml de tampon lactate, qsp 5 Litres en H<sub>2</sub>O ultra-pure

**Solution de coloration au Bleu de Coomassie (à refaire à chaque coloration) :**

500 ml (pour 2 gels)

- 20 ml de solution mère de Bleu de Coomassie
- 80 ml de TCA à 60%
- 400 ml d'eau ultra-pure

**Solution mère de Bleu de Coomassie** (conservée à température ambiante)

- 10 g de Bleu de Coomassie R250
- qsp 1000 ml Ethanol absolu. Mettre l'éthanol en agitation puis le bleu dans le bécher ou l'éprouvette. Filtrer cette solution sur un filtre plissé.

## ANNEXE 5 : EXTRACTION DES PROTEINES TOTALES DE GRAIN MATURE POUR ANALYSE EN ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

---

- 100 mg de farine
- ajouter 1250 µl de solution d'extraction\* ds tube eppendorf de 2 ml et vortexer
- laisser en contact 2 heures avec agitation magnétique (petit barreau rouge)
- soniquer 20'' à 20W au bout de 1H30
- centrifuger 5' 10 000 tr/min
- récupérer 250 µl de surnageant\*\*
- ajouter 20 µl d'IPG buffer adapté au gradient (ex : 3-11 NL, 6-11 etc...)
- ajouter 4 µl de 4-vinyl-pyridine et vortexer
- laisser en contact 15', à température ambiante
- ajouter 254 µl de glycérol à 60 % et vortexer
- centrifuger 5' à 10 000 tr/min

L'extrait protéique est prêt, il peut être utilisé directement pour une réhydratation ou congelé à -80°C, prendre soin de réaliser des aliquots pour éviter les congélation/décongélation.

\*maintenir le ration farine (mg)/solution d'extraction (µl) de 1/12.5

\*\*Le dosage est réalisé à ce niveau par la technique Bradford (Sigma) (cf MO-BCH-015) avec la BSA comme standard ou en utilisant le 2D Quant Kit commercialisé par Amersham (cf MO-BCH-014).

### Conditions de migration de la 1ère dimension

NB : Les conditions sont généralement à adapter en fonction de la quantité de protéines dans l'extrait et du type d'extrait (présence éventuelle de sels, etc.)

Dans le cas des protéines totales : généralement 60 kVh (Migration sur la journée+la nuit)

### Equilibration des strips

DTT(2%) 15 min

4VP(1.4%) 10 min pour les protéines totales

### Conditions de migration de la 2ième dimension

Gels SDS-PAGE 12.5%

### Preparation des solutions

#### - Solution d'extraction

⚠Attention CHAPS, urée, DTT et Thiourée : TOXIQUES (Gants + masque + hotte)

Chaps (4%)	400 mg
Urée (7 M)	4,2 g
Thiourée (2 M)	1,52 g
IPG buffer *	200µl
DTT (20mM)	30 mg
eau milli Q qsp	10 ml

\*IPG buffer adapté au gradient du strip

#### - Solution de réhydratation

Solution d'extraction + Bleu de bromophénol (il faut une solution claire).

#### - Solution glycérol à 60%

Glycérol

60ml

eau ultrapure

qsp 100 ml

un peu de bleu de bromophénol

## ANNEXE 6 : EXTRACTION DES ALBUMINES-GLOBULINES DE LA FARINE (OU DE L'ALBUMEN)

---

### Documents de référence

MARION, D., NICOLAS, Y., POPINEAU, Y., BRANLARD, G. et LETRY, J. (1994) A new improved sequential extraction procedure of wheat proteins. In: Wheat Kernel Proteins-Molecular et Functional Aspects. Università Degli Studi della Tuscia Consiglio Nazionale delle Ricerche, pp 197-199.

### Contenu du mode opératoire

- Avant l'extraction, faire le grattage de 5 grains (l'équivalent de 100 mg d'albumen)
- Peser 100 mg d'albumen
- Ajouter 1000µl de tampon\* (Phosphate 10 mM, NaCl 10 mM, pH 7.8, 4° C)
- Placer en agitation à la chambre froide(pendant 2H)
- Centrifuger(Prog 19: 20 min, 8000 g, 4°C)
- Récupérer 500 µl du surnageant dans un eppendorf
- Ajouter 1000 µl d'acétone à -20°C(pour précipiter les protéines)
- Laisser minimum 2H à -20°C
- Centrifuger (Prog 20: 5min, 10 000g, 4°C)
- Reprendre le culot dans 1000 µl d'acétone
- Laisser sécher le culot sous la hotte\*\*(minimum 20min)

\*: ajout de 4 µl de l'inhibiteur de protéases

\*\* : le culot peut être conservé à -20°C ou solubilisé pour une électrophorèse

**Tampon d'extraction** : Solution tampon phosphate 10mM, NaCl 10mM, pH 7,8

#### a) Solution acide A:

- Potassium dihydrogen phosphate PM=136.09
- Sodium chloride (NaCl) PM=58.44

Peser 0.68g H<sub>2</sub>KO<sub>4</sub>P (10mM) + 0.292g NaCl (10mM) dans 500 ml d'eau

#### b) Solution basique B:

- di-Sodium hydrogen phosphate Dihydrate(HNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P.H<sub>2</sub>O) PM=177.99
- Sodium chloride (NaCl) PM=58.44

Peser 0.8899g HNa<sub>2</sub>O<sub>4</sub>P (10mM) + 0.292g NaCl (10mM) dans 500 ml d'eau

#### c) Tampon phosphate (250 ml)

- 200 ml de Solution basique B
- Prendre le pH

Ajuster le pH à 7,8 avec ~ 50 ml de solution acide A

Le tampon d'extraction se conserve à 4°C plusieurs semaines.

## ANNEXE 7 : DOSAGE DES PROTEINES AVEC LE REACTIF BRADFORD (SIGMA)

### Documents de référence

- Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976).
- Sokuttgerber, A.G. *et al.*, *Anal. Biochem.*, 179, 198-201 (1989).
- Tal, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 260, 9976-9980 (1985).

### Principe de la méthode

Ce dosage est basé sur la formation d'un complexe entre le colorant « Bleu brillant G » et les protéines contenues dans la solution. Le complexe protéines-colorant produit un déplacement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines contenues dans la solution.

La BSA (Sérum d'albumine bovine) est utilisée pour créer la gamme étalon (concentrations de 0.1 à 1.5 mg/ml).

### Contenu du mode opératoire

- Homogénéiser le contenu de la bouteille de réactif et la laisser à température ambiante.
- Préparer le nombre nécessaire de tubes 2 ml plus 5 tubes pour la gamme.
- Préparer la gamme étalon à l'aide de la BSA (Sérum albumine bovine, 2mg/ml) : Le 1er tube correspond au blanc et ne contient pas de protéines. Il est conseillé de changer de pointe entre chaque tube pour déposer précisément le volume prescrit.

Tube N°	1	2	3	4	5
Volume de sol. stetard de BSA (µl)	0	6.25	12.5	25	37.5
Volume H2O qsp 50µl (µl)	50	43.75	37.5	25	12.5
Concentration (mg/ml)	0	0.25	0.5	1	1.5

ou

Tube N°	1	2	3	4	5
Volume de sol. stetard de BSA (µl)	0	5	10	20	40
Volume H2O qsp 50µl (µl)	50	45	40	30	10
Quantité de protéines (µg)	0	10	20	40	080

- Additionner 50 µl d'échantillon à doser pour 1.5 ml de réactif BRADFORD.
- Vortexer pour obtenir une bonne homogénéisation du mélange.
- Laisser incuber à température ambiante entre 5 et 45 minutes.
- Transférer les préparations dans les cuves de spectrophotomètre.
- Lire l'absorbance de chaque échantillon et des étalons à 595 nm en utilisant l'eau comme référence.
- Utiliser le programme « BRADFORD » pour réaliser la courbe d'étalonnage (y = absorbance des étalons, x = quantité de protéines) et pour déterminer la concentration en protéines des échantillons à l'aide de cette courbe.
- Tolérance aux réactifs les plus couramment utilisés (Cf. liste complète sur la notice livrée par le fournisseur)

Substances incompatibles	Quantité compatible
Glycine	100 mM
Tris	2.0 mM
SDS	0.125 %
Glycérol	10 %
DTT	5 mM
CHAPS	5 %
Urée	3 M

## ANNEXE 8 : PREPARATION ET MIGRATION DES GELS SDS-PAGE DE DEUXIEME DIMENSION

**Documents de référence** Manuel Amersham

### A ) Préparation des gels de migration en 2<sup>ème</sup> dimension

#### Préparation des petites plaques

- Nettoyer les plaques à l'alcool à 95°
- Monter les plaques sur les supports tout en Vérifiant l'étanchéité des montages
- Faire une marque à 0.5 cm du bord supérieur des plaques -Mettre le montage de niveau avec la bulle.

#### Préparation du gel à 12,5 % pour les protéines totales

T=12.5% C=0.97%

	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	15.5 ml	31 ml	46.4 ml	62 ml	77.4 ml	92.8 ml
Bisacrylamide 2%	3 ml	6 ml	9.1 ml	12 ml	15 ml	18.2 ml
eau permutée	10.72 ml	21.45 ml	32.17 ml	42.9 ml	53.7 ml	66.5 ml
Tampon Tris-HCL Ph=8.8	19 ml	38 ml	57 ml	76 ml	95 ml	114 ml
SDS 10% (0.1 %)	0.5 ml	1 ml	1.5 ml	2 ml	2.5 ml	3 ml
APS 1% (0.025%)	1.25 ml	2.5 ml	3.75 ml	5 ml	6.25 ml	7.5 ml
TEMED (0.0005 %)	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl
Volume final	50 ml	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

- Dégazer le mélange pendant 10 min à la trompe à vide.
- Se replacer sous la hotte (ou boa) et transvaser doucement le mélange dans un bécher en évitant de faire des bulles, puis rajouter le SDS et les catalyseurs.
- Bien homogénéiser la solution
- Couler le gel jusqu'à 0.5 cm du haut des plaques. Mettre 180 µl d'un mélange 50/50 eau-ultrapure/ethanol.
- Laisser polymériser 40 min au moins avant de le déplacer. Enlever le mélange eau/ethanol.
- Monter les plaques, installer le bac supérieur, en s'assurant d'une étanchéité correcte avec un peu de tampon d'électrophorèse et laisser ainsi les gels toute la nuit, de préférence sous une hotte.
- Volume d'un gel de 1 mm d'épaisseur = ~25 ml

#### Préparation du gel à 14 % pour albumines-globulines

T=14% C=2.1%

	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	17.2 ml	34.5 ml	51.7 ml	69 ml	86.2 ml	103.4 ml
Bisacrylamide 2%	7.3 ml	14.7 ml	22 ml	29.4 ml	37 ml	44 ml
eau permutée	4.7 ml	9.25 ml	14 ml	18.5 ml	23 ml	28 ml
Tampon Tris-HCL PH=8.8	19 ml	38 ml	57 ml	76 ml	95 ml	114 ml
SDS 10% (0.1 %)	0.5 ml	1 ml	1.5 ml	2 ml	2.5 ml	3 ml
APS 1% (0.025%)	1.25 ml	2.5 ml	3.75 ml	5 ml	6.25 ml	7.5 ml
TEMED (0.0005 %)	25 µl	50 µl	75 µl	100 µl	125 µl	150 µl
Volume final	50 ml	100 ml	150 ml	200 ml	250 ml	300 ml

- Couler le gel jusqu'à 0.5 cm du haut des plaques. Mettre 180 µl d'un mélange 50/50 eau-ultrapure/ethanol.

- Laisser polymériser 30 min au moins avant de le déplacer. Enlever mélange eau/etOH.
- Monter le bac supérieur, en s'assurant d'une étanchéité correcte avec un peu de tampon d'électrophorèse et laisser ainsi les gels toute la nuit.
- Préparation des petites plaques avec petits spacers pour strip de 18 cm
- Nettoyer les plaques à l'alcool à 95°
- Vérifier l'étanchéité des montages
- Faire une marque à 0.5 cm du bord supérieur des plaques
- Mettre le montage de niveau.

### Préparation du gel à 12,5 % pour les protéines totales

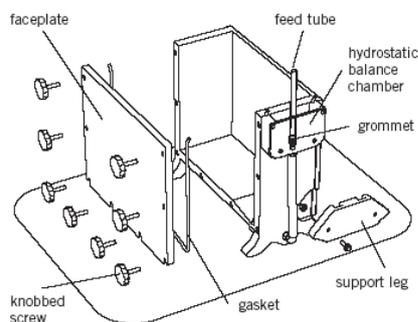
	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	17.3 ml	34.7 ml	52 ml	69.3 ml	86.7 ml	104 ml
Bisacrylamide 2%	3.4 ml	6.8 ml	10.1 ml	13.6 ml	17 ml	20.4 ml
eau permutée	12 ml	23.9 ml	36 ml	46 ml	60 ml	69 ml
Tampon Tris-HCL PH=8.8	21.3 ml	42.6 ml	63.9 ml	85.2 ml	106.4 ml	127.8 ml
SDS 10% (0.1%)	0,56 ml	1,12 ml	1,68 ml	2,24 ml	2.8 ml	3,36
APS 1% (0.025 %)	1,4 ml	2,8 ml	4,2 ml	5,6 ml	7 ml	8,4
TEMED (0.0005 %)	28 µl	56 µl	84 µl	112 µl	140 µl	168 µl
Volume final	56 ml	112 ml	168 ml	224 ml	280 ml	336 ml

### Préparation du gel à 14 % pour albumines-globulines

	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	10 gels	12 gels
Acrylamide 40%	19.3 ml	38.6 ml	58 ml	77.2 ml	96.5 ml	115.8 ml
Bisacrylamide 2%	8.2 ml	16.5 ml	24.7 ml	32.9 ml	41.2ml	49.4 ml
eau permutée	5.2 ml	10.3 ml	15.4 ml	20.7 ml	26 ml	31 ml
Tampon Tris-HCL PH=8.8	21.3 ml	42.6 ml	63.9 ml	85.2 ml	106.4 ml	127.8 ml
SDS 10% (0.1%)	0,56 ml	1,12 ml	1,68 ml	2,24 ml	2.8 ml	3,36
APS 1% (0.025 %)	1,4 ml	2,8 ml	4,2 ml	5,6 ml	7 ml	8,4
TEMED (0.0005 %)	28 µl	56 µl	84 µl	112 µl	140 µl	168 µl
Volume final	56 ml	112 ml	168 ml	224 ml	280 ml	336 ml

### Préparation des grandess plaques

- Nettoyer l'intérieur et l'extérieur des doubles plaques à l'éthanol, ainsi que l'appareil de coulage (cuve en plastique transparent) et les feuillets en plastique.
- Enlever les 8 vis et placer l'appareil de coulage en position inclinée.



- Montage des plaques : mettre un feuillet en plastique à la verticale au fond de l'appareil de coulage (bouts arrondis vers le haut de la cuve et plaqué à gauche).
- Placer une double plaque en verre, face haute derrière. Replacer un feuillet en plastique contre et monter ainsi en alternant feuillet et double plaque (minimum 6, maximum 14).
- A la fin, placer un feuillet en plastique, deux plaques pleines (dans le cas où l'on veut couler 12 plaques) puis les feuillets en plastique plus rigide jusqu'au bord de la cuve transparente. Le joint doit être bien placé dans sa rainure et graissé.
- Positionner les 4 vis du bas et reposer doucement le couvercle-joint de l'appareil.

- Monter les 4 autres vis et serrer toutes les vis 2 à 2.
- Marquer au marqueur indélébile à 2cm en dessous du niveau de coulage désiré (généralement on souhaite que le gel arrive à 0.5cm du haut des plaques).
- Préparation de la solution displacing : Cette solution contenant du bleu de bromophénol et du glycérol est placée au moment du coulage des gels dans le compartiment situé sur le côté de la cuve transparente.
- Après le coulage des gels, cette solution sert à pousser le reste d'acrylamide hors du tuyau, du bas de la cuve vers les plaques, jusqu'au niveau désiré.
- Préparer la solution displacing dans un bécher et laisser sous agitation pendant la préparation des gels.

Volume total = 100 ml

PRODUIT	VOLUME
Tris-HCl 1M pH 8,8 (0.375M)	37,5 ml
Glycérol 87% (55%)	55 ml
Bleu de bromophénol	Quelques grains
Eau up	7,5 ml

- Préparation du gel à 12,5 % pour les protéines totales
- Préparer le mélange dans une fiole à vide de 1 litre.

PRODUIT	Volume final 525 ml (8 gels)	Volume final 625 ml (10 gels)	Volume final 725 ml(12 gels)
Acrylamide 40%	162.56 ml	193.5 ml	224.5 ml
Bisacrylamide	31.8 ml	37.8 ml	43.9 ml
Eau	112.54 ml	133.9 ml	155.4 ml
Tampon Tris-HCL PH=8.8	199.5 ml	237.5 ml	275.5 ml
SDS 10% (0.1%)	5.25 ml	6.25 ml	7.25 ml
APS 1% (0.025 %)	13.125 ml	15.6 ml	18.125 ml
TEMED (0.0005 %)	262.5 µl	312.5 µl	362.5 µl

#### Préparation du gel à 14 % pour albumines-globulines

PRODUIT	Volume final 525 ml (8 gels)	Volume final 625 ml (10 gels)	Volume final 725 ml (12 gels)
Acrylamide 40%	180.98 ml	215.5 ml	250 ml
Bisacrylamide 2%	76.93 ml	91.6 ml	106.3 ml
eau permutée	48.65 ml	57.9 ml	67.2 ml
Tampon Tris-HCL PH=8.8 (0.38M)	199.5 ml	237.5 ml	275.5 ml
DEGAZER		LE GEL	
SDS 10% (0.1%)	5.25 ml	6.25 ml	7.25 ml
APS 1% (0.025 %)	13.125 ml	15.6 ml	18.125 ml
TEMED (0.0005 %)	262.5 µl	312.5 µl	362.5 µl

- Coulage des gels
- On place le tube en verre dans le tuyau du compartiment situé sur le côté de la cuve transparente, on rajoute un entonnoir en verre au dessus.
- Pour éviter les bulles le temps du remplissage de l'entonnoir, pincer le tuyau plastique d'une main et verser doucement le mélange d'acrylamide dans l'entonnoir.
- Lorsque l'entonnoir est plein, laisser couler le mélange dans le tuyau et verser en continu le mélange jusqu'au niveau désiré (marqué).

- Enlever l'entonnoir, la solution displacing va couler le long du tuyau (situé sous le compartiment) poussant le reste d'acrylamide vers les plaques : le niveau monte environ 2 cm au dessus de la marque.
- Terminer en rajoutant 1 ml d'un mélange eau / éthanol (50/50) au dessus de chaque double plaque. Laisser prendre les gels pendant 2 heures.
- Démoulage des plaques
- Démouler les plaques en tenant à la fois un feuillet en plastique et une double plaque.
- Décoller doucement puis placer l'ensemble dans une grande bassine.
- Décoller la double plaque du feuillet et nettoyer chacun d'eux à l'eau ultrapure.
- Enlever les restes d'acrylamide.
- Chaque feuillet et double plaque sont déposés à la verticale dans une grande bassine en plastique, recouvrir le haut des plaques et le fond de la bassine avec du tampon d'électrophorèse 1X (classique).
- Envelopper le tout avec du scellofrais et placé en chambre froide à 4°C.

## **B) Préparation à la migration en 2ème dimension**

- Préparer l'agarose à 0.5% dans du tampon d'électrophorèse en faisant bouillir, possibilité de mettre quelques grains de bleu de bromophénol si les strips ne sont pas assez colorés pour pouvoir suivre le front de migration
- Enlever de la plaque chauffante pour faire descendre la température et maintenir à 60°C maximum
- Aller chercher les strips s'ils sont au congélateur.
- Enlever le tampon d'électrophorèse résiduel à la surface du gel
- Rincer rapidement le strip dans du tampon de migration
- Faire pénétrer les strips en faisant glisser le gel-bond contre la plaque de verre
- Eviter les bulles d'air sous le strip
- Couler l'agarose (à une température pas trop élevée : 50°C environ pour éviter la coagulation de certaines protéines)
- Possibilité d'ajouter un témoin de masse moléculaire (dans ce cas on coupe 0.5 cm du strip côté acide)

## **C ) Migration en 2ème dimension**

### **Pour les petites plaques**

- Vérifier que le réfrigérant est allumé.
- Mettre le hauts de cuves, les remplir d'un peu de tampon et vérifier qu'il n'y a pas de fuite.
- Placer le montage dans la cuve et compléter avec du tampon d'électrophorèse.
- Enlever les bulles en bas et en haut. Positionner le couvercle et mettre sous tension.

10 mA par gel, pendant 1/2 h (ce qui correspond à l'entrée dans le gel de séparation).

35 mA par gel pendant 2 h 30 à 3 h (on arrête *quand* le front de migration arrive au bas des gels)

### **Pour les grandes plaques**

- La veille de l'utilisation remplir la cuve avec 7.5 l de tampon.
- Vérifier avant que la manette soit en position « system circulation ».
- Après avoir installé les plaques ajouter 2 l de tampon 2X.
- Allumer la cuve (interrupteur derrière le programmeur).
- Conditions de migration pour 12 gels dans la cuve:

60 W (5 W par gel) pendant 1/2h

120 W (10 W par gel) pendant plus de 5h (sortie du front de migration) ou pendant 6h (alb-glob gels 14%).

- Vérifier les paramètres de voltage et d'ampérage qui doivent être non-limitant avec 1000 mA et 600 V, le tout à une température de 20°C.
- Pour une deuxième utilisation du tampon de cuve:

- \* bien mélanger le tampon avec une grosse cuillère
- \* baisser le niveau du tampon jusqu'à 7.5 l
- \* rajouter 2 l d'H<sub>2</sub>O
- \* bien mélanger le tampon avec une grosse cuillère
- \* redescendre le niveau à 7.5 l.

### Solutions pour la préparation des gels

**Solutions d'acrylamide 40%** et de bisacrylamide à 2% onservation au frigo. Prêtes à l'emploi.

**Tampon Tris-HCl** pH: 8,8 Conservation au frigo.

Tris	60.57g
Eau	qsp ~ 400 ml
ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant	~ 8 à 10 ml
Eau	qsp 500 ml

**Solution stock de SDS à 10%** Conservation à température ambiante.

SDS sodium dodecyl sulfate	1g
Eau	qsp 10 ml

**Solution d'ammonium persulfate à 1%** Préparation à chaque utilisation.

A.P.S. (stocké au frigo)	0,2g
Eau	qsp 20 ml

**Tampon d'électrophorèse**

Glycine	70.55g
Tris	15g
SDS	5g
Eau qsp	5000ml

Conservation à température ambiante.

**Tampon d'électrophorèse 2X pour grande cuve**

Glycine	56.44g
Tris	12g
SDS	4g
Eau	qsp 2000ml

Conservation à température ambiante.

---

**RESUME, ABSTRACT,**

**ملخص**

---

## Résumé

Dans la première partie de cette étude, de nombreuses collections de blé cultivés et de leur apparentés sont analysées pour apprécier le polymorphisme génétique des SG-HPM et SG-FPM, à savoir: Une collection de 59 accessions de *Aegilops* représentant 5 génomes (U, C, M, D, N), 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, une troisième collection de trente accessions de lignées sœurs obtenues à partir de croisements interspécifiques entre 2 variétés syriennes de blé dur (Cham et Oum Rabi) et 2 espèces apparentées (*T. dicoccum* et *T. polonicum*) et deux dernières collections de 71 et 120 variétés de blé tendre et dur cultivés en Algérie. Les collections proviennent en grande partie de l'ICARDA (Alep, Syrie). L'analyse biochimique a été effectuée par SDS-PAGE.

Dans la collection de *Aegilops*, plusieurs nouveaux allèles correspondants aux SG-HPM ont été décelés et une nomenclature allélique a été dressée dont un total de 16 allèles sont exprimés au locus Glu-U1, 13 au Glu-M1, 9 au Glu-C1, 6 au Glu-N1 et 10 au Glu-D1. Pour les SG-FPM (zone B) une typologie a été dressée.

Dans la collection des blés botaniques, 16 allèles sont identifiés aux loci Glu-1. Deux sont nouveaux: Le premier est nommé Glu-B1i<sub>1</sub> codant pour deux bandes localisées entre les bandes 17 et 18 dont on leur a attribué la nomenclature 17<sub>1</sub> et 18<sub>1</sub>. L'autre est appelé Glu-B1e<sub>1</sub> code pour deux bandes similaires aux 20x et 20y mais avec des mobilités légèrement plus rapides, ces bandes sont nommées 20x<sub>1</sub>-20y<sub>1</sub> et sont analysées pour déterminer le nombre de leur groupement thiols. Trois et sept résidus cystéines ont été trouvés respectivement. 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 apparentés a permis de recenser six formes alléliques codant pour les SG-HPM, dont deux sont localisées au locus Glu-A1 (a et c) et quatre au locus Glu-B1 (a, b, d et i). Un polymorphisme important caractérise les SG-FPM. Un total de 13 allèles a été identifié. La connaissance de ces allèles constitue un important outil pour l'identification variétale des blés.

Chez les variétés de blé tendre 3, 6 et 5 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. Au loci Glu-A3, Glu-B3 et Glu-B2 codant pour les SG-FPM, 5, 9, (dont deux nouveaux) et 2 allèles sont identifiés respectivement. Les blés cultivés en Algérie montrent une importante variation.

Une autre partie de cette étude avait pour objectif l'évaluation des différences dues aux modes de culture biologique et conventionnelle au niveau de composition des protéines totales et du métabolisme dans le grain mature de blé. L'ensemble des analyses a porté sur trois classes de tailles (petite, moyenne et grande) de grains issus de deux variétés de blé tendre d'hiver : Ataro et Renan. Les deux variétés avaient des réponses différentes sur la distribution des tailles de grain. Les analyses électrophorétiques des protéines de réserve et du métabolisme montrent un effet global significatif du mode de culture sur les sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire pour les deux variétés. De nombreuses gliadines (5 bandes sur 16 chez la variété Renan et 11 sur 22 chez la variété Ataro) se sont avérées affectées par le mode de culture.

L'approche protéomique, effectuée sur la variété Ataro, révèle pour toutes tailles de grains, 20 spots variants dont trois sont plus exprimés en mode biologique. L'analyse du protéome entre tailles fait apparaître 149 spots quantitativement différents d'une classe à l'autre au sein du mode biologique, contre 115 dans le mode conventionnel. En plus des protéines de réserve, l'analyse au spectromètre MALDI-TOF et l'interrogation des bases de données, ont permis d'identifier des serpinines et des protéines impliquées dans le métabolisme des sucres.

**Mots clés :** collections de blé, sous unités gluténines, électrophorèse, variabilité, protéome, endosperme, conditions environnementales, culture conventionnelle, culture biologique.

## Abstract

In the first part of this study, several collections were analyzed in order to appreciate the allelic variation of high and low-molecular-weight (HMW and LMW) glutenin subunits composition: a collection of 59 accessions representing 5 genomes (U, C, M, D, N), collection of 856 accessions of local durum wheat (*Triticum durum* Desf.) collected in Algeria and divided a priori according to their agronomical and morphological traits in 17 varieties, a collection of thirty accessions of lines sisters coming from the ICARDA, obtained from interspecific crossings between 2 Syrian varieties of durum wheat (Cham and Oum Rabi) and 2 related species (*T. dicoccum* and *T. polonicum*) and two other collections of 71 bread wheat and 120 durum wheat germoplasm grown in Algeria. Seed samples were provided for the most part by the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (Alep, Syria). The biochemical analysis was carried out by monodimensional SDS-PAGE.

In *Aegilops* collection, several new alleles corresponding to HMW subunits were detected and an allelic nomenclature was drawn up in which a total of 16 alleles were exprimed at the locus Glu-U1, 13 at Glu-M1, 9 at Glu-C1, 6 at Glu-N1 and 10 at the Glu-D1 locus.

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 and were analyzed to determine the number of thiol groups. Three and Seven cysteine residues were found respectively. 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.

In the collection of related durum wheat, we can count six allelic forms, which two are localised at the locus Glu-A1, it acts of the allele "a" and the allele "c" and four at the locus Glu-B1, they are "a, b, d and i". While referring to international allelic nomenclature, these alleles code for following proteins: 1, nul, 7, 7+8, 6+8 and 17+18 respectively. Important polymorphism characterise HMW-GS with a total of 13 alleles identified. The knowledge of these alleles constitutes an important tool for the identification varietal of wheat.

Extensive variation has been found in bread and durum wheat germoplasm grown in Algeria. In bread wheat 3, 6 and 5 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 exprimeted at Glu-A1 locus and 9 at Glu-B1. At Glu-A3, Glu-B3 and Glu-B2 loci 5,8 and 2 alleles were identified.

The new HMW and LMW glutenin variation found in this work suggests their possible utilisation in breeding for wheat quality.

The aim of the second part of this study was to evaluate the differences due to the culture regimes (biological versus conventional) in composition of total and metabolic proteins in the mature wheat grain. The analyses were carried out on three classes of sizes of grains (small, middle and large) from two varieties of bread wheat: Ataro and Renan. The two varieties exhibited differences on the grain sizes distribution.

The one-dimensional electrophoretic analyses of storage and metabolic proteins showed a significant effect of the culture regime on HMW-SG and LMW-SG for the two varieties. Many gliadins (5 bands out of 16 for Renan and 11 out of 22 for Ataro) were influenced by culture regimes.

The proteomic approach, carried out on the Ataro variety, revealed for all sizes of grains, 20 variable spots of which three were more expressed in biological regime. Analysis of the proteome between sizes revealed 149 spots quantitatively different from one class to another for the biological regime, against 115 for the conventional regime. In addition to storage proteins, spectrometry analysis using MALDI-TOF and the database interrogations, allowed serpin and proteins involved in the sugars metabolism to be identified.

**Key words (6):** wheat collections, Glutenin subunits, electrophoresis, Variability, protome, endosperm, environmental conditions, conventional regime, organic regime.

## الملخص

في الجزء الأول من هذه الدراسة، قمنا بتحليل عدة مجموعات من القمح المزروع و البري الذي يمد إليه بقراية. و ذلك بغرض تقييم التنوع الوراثي لتحت وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المرتفع و المنخفض، هذه المجموعات هي كما يلي، 59 عينة من جنس *Aegilops* متمثلة في 5 تركيبات وراثية (U,C,M,D,N)، مجموعة أخرى مكونة من 856 عينة من القمح الصلب المحلي المجموع في الجزائر و المقسم سلفا إلى 17 نوع نباتي حسب الخصائص المورفولوجية. مجموعة أخرى مكونة من 30 سلالة أخت ناتجة عن تصالب نوعي بين صنفين من القمح السوري (Cham,Oum Rabi) و مجموعتين أخرتين مكونتين من 71 و 120 سلالة من القمح اللين و الصلب المزروع في الجزائر. هذه المجموعات أتت خاصة من ICARDA (حلب، سوريا).

التحليل البيو كيميائي أجري بواسطة الهجرة الكهربائية للبروتينات SDS-PAGE.

في المجموعة المكونة من جنس *Aegilops* عدة أليلات جديدة مسؤولة عن ترجمة تحت وحدات الجلوتين ذات الوزن المرتفع وجدت و قرأت.

في مجموعة القمح المحلي، 16 أليل وجد على مستوى *Glu-1* منها إثنين جديدين، الأول سمي *Glu-B1e<sub>1</sub>* و الثاني *Glu-B1i<sub>1</sub>* هذه الأليلات الجديدة تترجم تحت وحدات بروتينية جديدة. قمنا بتحليل اثنين منها لتحديد عدد جذور هيدروجين الكبريت الحرة (SH). على مستوى *Glu-3* و *Glu-2*، 16 أليل وجد منها اثنان جديداً.

في مجموعة ثلاثين سلالة أخت ناتجة عن تصالب نوعي بين صنفين من القمح الصلب السوري و نوعين من القمح الأيوبي، تبين وجود ستة أليلات، اثنان منها في المورثة *Glu-A 1* و هما الأليل «a» و الأليل «c» و أربعة في المورثة *Glu-B1* ممثلة بالأليلات «a, b, d, i». باستعمال القراءة الدولية، هذه الأليلات مسؤولة عن ترجمة البروتينات التالية 1 +nul، 6+8، 7+8. هذه الأليلات تستعمل كوسيلة للتعريف بمختلف الأنواع. إضافة إلى أن مفتاح التسمية يساعد على التفريق وبدون غموض بين مختلف العينات انطلاقاً من واحد أو عدة تغيرات مهمة في البيانات الناتجة عن الهجرة الكهربائية للبروتينات

في مجموعة القمح اللين المزروع في الجزائر : 3، 6 و 5 أليلات وجدت على مستوى *Glu-A1*، *Glu-B1* و *Glu-D1* بالترتيب. 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 و 16 أليل مترجمة لتحت وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المنخفض.

في الجزء الثاني من هذه الدراسة قمنا بمقارنة الاختلافات الناتجة عن النمط الزراعي المتبع سواء كان بيولوجيا أو تقليديا وذلك على مستوى ميتابوليزم البذرة و تركيب البروتينات الكاملة. جميع التحليلات أجريت على ثلاثة أقسام من حجم البذور (بذور صغيرة الحجم، متوسطة وكبيرة الحجم) لعينتين من القمح اللين الشتوي (Ataro و Renan). تبين النتائج المحصل عليها استجابات مختلفة لكل العينتين على مستوى الثلاث أحجام المدروسة.

التحليل بواسطة الهجرة الكهربائية لبروتينات التخزين و البروتينات الناشطة أيضاً أظهر تأثير مهم لنمط الزراعة على تحت وحدات الجلوتين ذات الوزن الجزئي المرتفع و المنخفض و على عدة وحدات للغلايدين.

التحليل البروتيومي لبذور من عينة Ataro، بين بالنسبة لكل أحجام البذرة 20 لطفة مختلفة، ثلاثة منها أكثر استجابة بالنمط الزراعي البيولوجي. التحليل البروتيومي لكل حجم على حدى أظهر 149 لطفة مختلفة اختلاف كمي بالنسبة للنمط الزراعي البيولوجي و 115 لطفة مختلفة عند النمط الزراعي التقليدي. التحليل الطيفي MALDI-TOF واستجواب قاعدة المعطيات سمحت بتعريف عدة أنواع من البروتينات المتأثرة بالنمط الزراعي منها : Serpins و بروتينات التي تلعب دور في الأيظ السكري.

**الكلمات الرئيسية:** مجموعات من القمح، جلوتينين، تغير، الهجرة الكهربائية للبروتينات، بروتيوم. النمط الزراعي التقليدي، النمط الزراعي البيولوجي