

Etude de la variabilité génétique et agronomique de la valeur meunière

Privat Lasme^{1,4}, François-Xavier Oury², Christophe Michelet³, Joël Abecassis¹, Christine Bar L'Helgouac'h⁴, Valérie Lullien-Pellerin^{*1}

* Coordinateur : Valérie Lullien-Pellerin¹, valerie.lullien@supagro.inra.fr, Tél. : 04 99 61 31 05

1 - INRA, UMR 1208 Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes - 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 01

2 - INRA, UMR 1095 Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales - 234 avenue du Brézet, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2

3 - UFS, 17 rue du Louvre, 75001 Paris

4 - ARVALIS - Institut du végétal, Station expérimentale, 91720 Boigneville

La valeur meunière des grains, c'est-à-dire l'aptitude à donner un bon rendement d'extraction en farine sans contamination par les parties périphériques, est un critère important de leur valeur d'usage qui n'est aujourd'hui pas pris en compte au cours de la sélection, faute de marqueurs ou d'outils d'évaluation appropriés. Elle est différente en fonction des variétés de blé et des conditions de culture et dépend notamment, des propriétés mécaniques des tissus du grain.

Le projet visait à établir et valider des relations entre la valeur meunière et les caractéristiques intrinsèques des grains de blé tendre. Il a été conçu en particulier pour dissocier les effets de deux caractéristiques majeures de la texture de l'albumen du blé, dureté et vitrosité, qui peuvent affecter ses propriétés mécaniques et donc son comportement au fractionnement.

Le caractère de dureté (hard/soft) du grain est une caractéristique qui est contrôlée principalement par la région Ha du chromosome 5D. Cette région est reconnue comme le QTL majeur responsable des différences de dureté des grains, et porte des gènes codant pour une famille de protéines, appelées puroindolines A et B, qui a été impliquée dans l'adhésion entre les granules d'amidon et la matrice protéique. La présence des allèles de ces gènes sous forme sauvage (génotype *Pina-D1a*, *Pinb-D1a*) conduirait à une moindre adhésion de la matrice protéique aux granules d'amidon, au sein de l'albumen, alors que les formes délétées, tronquées ou mutées de ces allèles (formes alléliques de type *b*, *c*, *d*,... de ces gènes) conduiraient à une plus forte adhésion entre matrice et granules modifiant le profil de rupture et la granulométrie des produits, ainsi que la formation d'amidon endommagé. Hors de ce contexte génétique, plusieurs protocoles expérimentaux sont mis en œuvre pour mesurer cette caractéristique de dureté des grains :

- méthode PSI (particle size index) où le pourcentage de particules passant au travers d'un tamis de 75µm après broyage des grains dans des conditions standardisées détermine une valeur de dureté (les plus soft produisant les valeurs les plus importantes) ;
- méthode NIRS (near-infrared spectroscopy) basée sur une analyse spectrale d'un broyat de grains par proche infrarouge et calibrée sur la mesure PSI ;
- méthode SKCS (single kernel characterization system) qui mesure la force requise (ou hardness index, HI) pour écraser les grains d'un échantillon entre deux surfaces en tenant compte du poids, du diamètre et de l'humidité des grains.

La vitrosité de l'albumen qui varie essentiellement en fonction des conditions culturales est en général peu prise en compte pour l'évaluation des lots de blé tendre. Elle correspond à une caractéristique optique de transparence à la lumière qui peut être évaluée au farinotome de Pohl.

Dans ce contexte, des lignées quasi-isogéniques pour la dureté porteuses de formes alléliques différentes du gène *Pinb-D1* ont été construites pour évaluer le rôle du caractère de dureté sur les propriétés mécaniques de l'albumen. Des essais multi-locaux et sur plusieurs années de culture (2007 à 2009) ont été mis en place pour faire varier les caractéristiques de vitrosité, qui ont été montrées comme plus dépendantes des conditions environnementales, et étudier les effets de ce paramètre sur le comportement meunier. Enfin, afin de valider la pertinence des relations qui pourraient être établies entre les caractéristiques génétiques et/ou physico-chimiques des grains et le comportement meunier, des variétés cultivées ou en cours de sélection de blé tendre français, fournies par les sélectionneurs partenaires du projet et choisies sur leurs critères de dureté et de valeur meunière contrastés ont été expérimentées sur les mêmes sites, et dans les mêmes conditions d'essais, que les lignées quasi-isogéniques.

1. Matériel et Méthodes

Pour le matériel végétal, deux types de lignées quasi-isogéniques ont été construites respectivement par l'INRA et l'UFS :

- des lignées qui diffèrent par l'allèle *Pinb-D1* de type sauvage ou muté (soit de génotype *Pina-D1a/Pinb-D1a* ou *Pina-D1a/Pinb-D1b*) et de phénotype soft ou hard mesuré par méthode NIRS ;
- des lignées qui diffèrent par la mutation de l'allèle *Pinb-D1* (mutation de type *b* où l'acide aminé en position 46 de la puroindoline B, glycine, est remplacé par une serine ; ou mutation de type *d* où l'acide aminé en position 44 de la puroindoline B, tryptophane, est remplacé par une arginine), soit les génotypes *Pina-D1a/Pinb-D1b* ou *Pina-D1a/Pinb-D1d*, tous les 2 de phénotypes hard. Le niveau d'isogénicité des couples au sein d'une même lignée a été contrôlé par marqueurs DArT® et leur taux d'hétérozygotie résiduel était inférieur à 3,12%.

De plus, 50 variétés de blés connues des sélectionneurs ont été choisies qui présentent des génotypes contrastés :

- de type *Pina-D1a/Pinb-D1a* tels que chez Crousty, Paledor ;

- de type *Pina-D1a/Pinb-D1b* tels que Caphorn, Apache ;
- de type *Pina-D1a/Pinb-D1c* tels que Quebon, Perfector ;
- de type *Pina-D1a/Pinb-D1d* tels que Soissons, Orvantis.

Le matériel végétal a été cultivé sur deux à trois années (2007-2009) et sur plusieurs lieux de culture (5 à 7 lieux) ainsi que deux modes d'apport azoté (N correspondant à une fertilisation azotée standard calculée selon la méthode du bilan ; ou N+ avec un apport additionnel à floraison de 50 kg/ha) pour tenter d'augmenter la teneur en protéines et agir aussi potentiellement positivement sur la vitrosité. Trois lieux sont restés communs entre les 3 années : Clermont-Ferrand (63), Estrées-Mons (80), Rennes (35).

Toutes les caractéristiques physiques des grains classiquement étudiées ont été déterminées. Il s'agit du poids de mille grains (PMG, norme AFNOR EN ISO 520) et du poids spécifique (PS, méthode AACC 55-10) d'une part, et de la dureté et de la teneur en protéines d'autre part, qui ont été déterminées par une méthode utilisant une mesure NIRS en proche infra-rouge (respectivement AACC 39-70A et 39-35). Des mesures de dureté ont également été réalisées par la méthode SKCS (méthode AACC 55-31). La vitrosité a été estimée au farinotome de Pohl. Des mesures de densités des grains (g/cm³) ont été réalisées sur plusieurs sous-échantillons à l'aide d'un pycnomètre à gaz (azote).

Les moutures ont été réalisées à l'aide d'un prototype breveté (Chopin, INRA, ARVALIS, N° 0905572, 02/20/2009) développé pour évaluer la valeur meunière sur un échantillon limité de grains (500 g). Elles comportent deux étapes de broyage, une de claquage et deux convertissages. Les échantillons sont conditionnés préalablement à la mouture à 16% de teneur en eau. Des moutures partielles ont également été réalisées pour étudier plus particulièrement le comportement à la réduction des grosses semoules produites au premier broyage. Les semoules du premier broyage sont alors directement réduites au claqueur.

2. Présentation de quelques résultats

► Variation de la texture des grains en fonction de la nature et des conditions de culture des échantillons

Le protocole expérimental a bien permis d'obtenir des grains de dureté et vitrosité contrastées. La figure 1 présente les caractéristiques obtenues à partir de 326 échantillons de lignées quasi-isogéniques de génotype *Pina-D1a/Pinb-D1a* (soft) ; *Pina-D1a/Pinb-D1b* ou *Pina-D1a/Pinb-D1d* (hard).

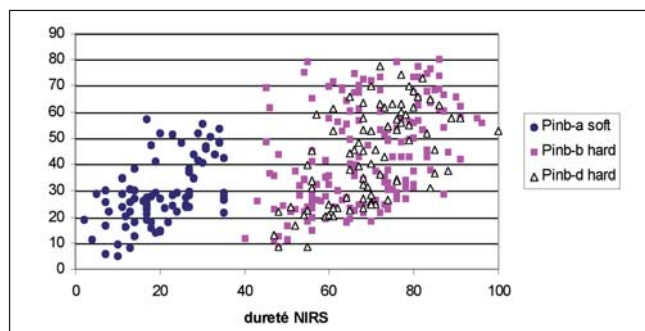


Figure 1 : Dureté mesurée par méthode NIRS et vitrosité (%) des grains des lignées quasi-isogéniques (génotypes *Pina-D1a/Pinb-D1a* de texture soft ; *Pina-D1a/Pinb-D1b* ou *Pina-D1a/Pinb-D1d* de texture hard) issus du protocole d'essai (2 à 3 années, 7 lieux, 2 types de fertilisation azotée contrastés).

La dureté NIRS des génotypes correspond bien à ce qui est attendu de part leur composition allélique. On peut noter que la vitrosité des échantillons de type soft ne dépasse pas 60%. La vitrosité des échantillons varie fortement en fonction des conditions de culture (lieux et années). La figure 2 illustre les différences observées de vitrosité en fonction de l'année, et met en évidence la plus grande vitrosité des échantillons cultivés en 2008, bien que les échantillons n'aient pas montré de teneurs en protéines plus élevées. Des effets marqués du lieu de culture sur la vitrosité ont également été mis en évidence. En 2008, par exemple, les échantillons issus du lieu Cappelle (position GPS, 50°29' N/3°10' E) n'ont présenté que des échantillons farineux alors que les mêmes échantillons récoltés sur Maule (48°54' N/1°51' E) étaient très vitreux. L'analyse statistique des données n'a pas permis de mettre en évidence de relation significative entre la vitrosité et la teneur en protéines chez les lignées de type soft. Une corrélation significative ($r=0,59$) entre vitrosité et teneur en protéines a par contre été observée pour les lignées de type hard avec un seuil de significativité α de 0.001.

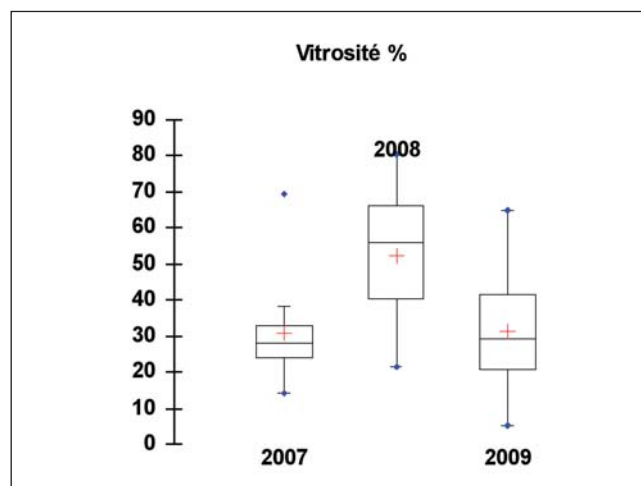


Figure 2 : Box-plot exprimant la variabilité de la vitrosité en fonction de l'année de culture sur les 326 échantillons analysés issus des lignées quasi-isogéniques.

L'augmentation de vitrosité des grains se traduit par une augmentation de la dureté NIRS : corrélation r pour les lignées de type soft et de type hard respectivement égales à 0.56 et 0.59 avec un seuil de significativité $\alpha < 0.001$. Une ANOVA pour expliquer la vitrosité des échantillons au sein de chaque classe de dureté fait ressortir les facteurs significatifs suivants (dans l'ordre de leur importance) : année de récolte > apport d'azote, lieu de culture > interaction année-lieu > background génétique autre que l'allèle *Pinb-D1* > interaction année-background génétique, tous ces effets ayant une probabilité $< 0,001$. L'allèle de *Pinb* apparaît significativement corrélé avec la vitrosité avec une probabilité $< 0,05$.

► Comparaison des méthodes de mesure de la dureté

Des mesures de dureté par la méthode SKCS ont également été réalisées sur la plupart des échantillons du projet. Elles ont permis de montrer une corrélation très forte entre les valeurs de vitrosité et les mesures obtenues par la méthode SKCS ($R^2=0,7$) au sein d'une même classe de dureté. Si, par contre, les lignées de type hard et soft sont analysées conjointement alors les mesures obtenues par la méthode SKCS mettent en évidence les différences de dureté des grains.

► Comportement en mouture des grains

Pour étudier plus spécifiquement l'influence de la texture de l'albumen sur sa réduction, nous avons suivi plus particulièrement les paramètres suivants : le taux de farine produite au premier broyage (FB1 en %) et le rapport entre le rendement en farine produite lors du claquage des semoules et le rendement en semoules, ce facteur que nous avons appelé EBA pour "endosperm breakage ability" peut être déterminé soit :

- sur une mouture complète, et correspond alors au rapport entre le rendement en farine de claquage et les semoules des broyeur 1 et 2 ;
- ou après mouture partielle, et correspond au rapport entre la quantité de farine obtenue après claquage à partir des semoules du broyeur 1 et la quantité de semoules du premier broyage (EBA1).

Les lignées quasi-isogéniques de type *Pina-D1a/Pinb-D1a* (soft) et *Pina-D1a/Pinb-D1b* ou *Pina-D1a/Pinb-D1d* (hard) ont été analysées sur deux années consécutives et trois lieux communs (Clermont-Ferrand, Estrées-Mons, Rennes). Une analyse en composantes principales de la réduction des échantillons de type soft fait apparaître l'importance des caractéristiques de dureté des grains sur la production et la réduction des fines semoules. La production des fines semoules semble pouvoir être expliquée à 60% par la mesure de dureté et à 40% par les caractéristiques de vitrosité, et semble expliquer 50% de la variation du rendement total en farines. Chez les échantillons de type hard, l'importance de la réduction des semoules sur le rendement a aussi été soulignée. Une relation négative très forte a été mise en évidence chez les échantillons de type hard entre la vitrosité et le facteur EBA traduisant l'aptitude à la réduction de l'albumen, et ceci quelle que soit la variété ou lignée (Figure 3).

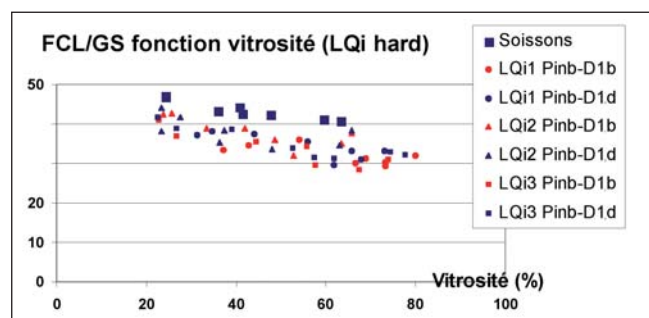


Figure 3 : Relation entre la vitrosité et l'aptitude à la réduction de l'albumen (EBA) mesurée par le rapport entre la farine produite au claquage et la quantité de grosses semoules produites après broyage (EBA = FCL/GS), pour les grains de lignées quasi-isogéniques de génotypes *Pina-D1a/Pinb-D1b* ou *Pina-D1a/Pinb-D1d*, en comparaison avec les grains de la variété *Soissons* (génotype *Pina-D1a/Pinb-D1d*) cultivée aux mêmes lieux en 2008.

Il a également été mis en évidence des différences variétales qui ne sont pas dépendantes des allèles de *Pinb-D1*. Par exemple, la variété *Soissons*, à même taux de vitrosité des grains, montre une plus grande aptitude à la réduction de son albumen que les autres lignées (Lasmé et al., *Cereal Chemistry*, 2011 sous presse). Ces différences de rendement en farine semblent reposer sur des différences dans la distribution des tailles (dans la zone des 200 µm), pour les particules qui sont générées lors de la réduction des grosses semoules. Les particules issues de grains farineux montrent en effet un pic centré autour de 170 µm, alors que le pic est centré autour de 220 µm pour les échantillons vitreux. De la

même manière, les comparaisons entre les lignées isogéniques et *Soissons* font apparaître des différences significatives dans les distributions des tailles de particules : la réduction des semoules de *Soissons* conduit à un pic centré sur la valeur 167 µm, contre 222 µm pour la lignée montrant l'aptitude la plus faible à la réduction. Ainsi les différences de réduction de l'albumen entre lots de grains peuvent être expliquées par la taille des particules générées puisque, sur le prototype de moulin utilisé, le tri des particules de farine est réalisé sur un tamis de 200 µm. Par ailleurs on ne note pas de différence majeure entre les génotypes différant par la mutation de l'allèle de *Pinb-D1*. De plus, la plus grande aptitude à la réduction de *Soissons* ne peut être expliquée par la présence de l'allèle *Pinb-D1d*.

Le lien entre les différences d'aptitude à la réduction et les différences de vitrosité au sein d'une même variété, a également été confirmé avec les échantillons de la collection de 50 variétés de blé qui a été expérimentée en parallèle.

► Etude des différences de comportement à la rupture de l'albumen

Des différences de structuration physique des grains ont été mises en évidence entre grains vitreux et farineux, qui pourraient expliquer les effets du caractère farineux sur la plus grande friabilité au broyage de l'albumen. Les mesures de vitrosité sont en effet fortement corrélées aux mesures de densités (g/cm³) des grains. Ainsi les différences de vitrosité traduisent bien des différences de porosité du grain, la porosité des grains étant plus importante au sein des structures farineuses.

Dans le cadre de ce projet, il a été recherché un lien entre ces différences de structurations physiques et des différences potentielles de structuration de la matrice protéique ou des granules d'amidon en lien avec le comportement à la rupture de l'albumen. En effet, compte-tenu de la composition de l'albumen principalement formé de granules d'amidon de différentes tailles (80%) et d'un réseau protéique (12% environ), des différences de proportion, ainsi que de répartition de ces composants, peuvent affecter la formation et la propagation des fissures au sein de l'albumen. Ces travaux feront l'objet d'une publication prochainement.

3. Conclusions

Cette étude a permis de mettre évidence l'importance du fond génétique de la variété, ainsi que des conditions environnementales qui vont affecter la texture de l'albumen, sur son aptitude à la réduction. Il a été montré que :

- 1 - les différences de comportement de l'albumen entre blés de type soft et hard en terme de production de farine et de semoules dès le premier broyage peuvent être expliquées par les allèles de *Pinb-D1* de type sauvage ou mutés et sont bien reliées à la mesure de dureté mesurée par NIRS ;
- 2 - la mesure de dureté NIRS au sein des variétés de type soft est un paramètre pertinent à prendre en compte pour la caractérisation des lots de grains, une augmentation de la valeur de dureté étant un facteur positif du rendement meunier ;
- 3 - au sein d'une même classe de dureté, les différences de vitrosité peuvent être évaluées au farinotome de Pohl ou grâce à la mesure de dureté SKCS ;

4 - la vitrosité des grains, qui varie en fonction de l'année et du lieu de culture notamment, joue un rôle prépondérant dans les différences de réduction de l'amande au sein des variétés de type hard ;

5 - les différences de réduction de l'amande au sein des variétés de type hard ne dépendent pas de la mutation de l'allèle de *Pinb-D1* mais plutôt du fond génétique de la variété.

Les différences de structuration au sein de l'albumen qui sous-tendent les différences de comportement à la réduction

de l'albumen entre lots d'une même variété ou en fonction des variétés sont en cours d'analyse.

► Remerciements

Ce projet a également reçu le soutien du consortium Valeur Meunière II (ANMF, Arvalis-Institut du végétal, Bühler, Chopin-Technologies, ENSMIC, INRA, IRTAC, Lu France, UFS) pour le financement de la thèse Cifre de P. Lasme et le développement du prototype de moulin.

Références bibliographiques

Lasme P., Oury F.-X., Michelet C., Abecassis J., Mabile F., Bar-L'Helgouac'h, Lullien-Pellerin V. A study of puroindoline b involvement in the milling behavior of hard type common wheats. *Cereal Chemistry* 2011 (sous presse).