

## Introduction :

La production de bioéthanol en France n'a cessé de croître depuis les cinq dernières années (de 101 ML en 2004 à 1250ML en 2009). Pour atteindre les exigences de réduction des gaz à effet de serre du protocole de Kyoto l'Union Européenne doit incorporer 5,75% d'éthanol dans les carburants en 2010 et 10% à l'horizon 2020. D'importants progrès ont été conduits au niveau industriel pour optimiser la production d'éthanol (broyage, température, temps de fermentation et enzymes hydrolytiques). En revanche le grain n'a pas fait l'objet de recherches en vue de définir les caractéristiques favorables au rendement élevé en glucose et en éthanol

## Objectifs :

- 1-Mise en évidence des caractéristiques du grain et de composition de l'amidon et de ses propriétés d'hydrolyse associées à une variabilité génétique
- 2-identification de l'effet des trois gènes waxy sur les paramètres de rendement et de vitesse de conversion de l'amidon dans la production de bioéthanol
- 3-Mise à disposition de marqueurs et ou de variables de mesures utilisables en sélection.
- 4-identification des caractéristiques optimales à rechercher dans un génotype pour obtenir une variété à haut rendement en éthanol.

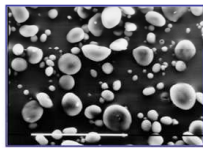
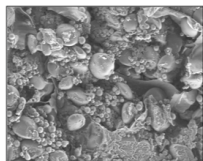


Figure 1 : Albumin du grain de blé et granules d'amidon débarrassés de la matrice protéique (échelle 100 microns)

## Les expérimentations conduites

- 1- Mise en place d'un essai multilocal et pluriannuel pour les variétés françaises. Une trentaine de variétés ont été implantées durant les deux premières années 2006-2007 et 2007-2008 et un sous ensemble (22) de ces variétés a été implanté en 2008-2009 dans 3 lieux. Les essais ont été conduits avec ou sans troisième apport d'azote.
- 2- Mise en place d'un essai multilocal avec les 8 lignées isogéniques waxy de chacune des variétés Crusty, Soissons et Trémie. Ces lignées isogéniques créées à l'Inra possèdent les allèles Wx-A1, Wx-B1 et Wx-D1 nuls, qui lorsqu'ils sont réunis au sein d'un même génotype causent l'absence de la "Granule Binding Starch Synthase", enzyme impliquée dans la synthèse de l'amylase.
- 3- Analyses des caractéristiques physico chimiques et technologiques des grains : PMG, PS, % protéines, dureté, viscosité des pentosanes, distribution des tailles des granules d'amidon (Figures 1 et 2), teneur en amylose, diversité des sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire.
- 4- Mise en place d'un procédé d'analyse en laboratoire de la production de glucose et de son hydrolyse en éthanol et études des aptitudes à la transformation en éthanol des variétés et lignées expérimentées. La quantité de glucose libéré obtenu après hydrolyse des moutures de blés fut mesurée à l'aide du kit Megazyme et la quantité d'éthanol effectivement produit après fermentation fut mesurée par chromatographie en phase gazeuse. (Procédé mis au point par l'I. P. L. B.)
- 5- Analyse protéomique des lignées waxy de la variété Trémie (Thèse CIFRE effectuée par Clément DEBITON).
- 6- Analyse de la diversité structurale des grains d'amidon d'un sous-ensemble de 25 génotypes de la core collection de l'INRA de Clermont Ferrand

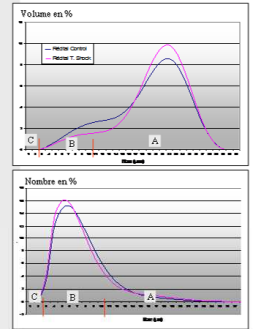


Figure 2: Exemple d'analyse au granulomètre basée sur la distribution des granules d'amidon exprimée en % du volume total des granules et en % du nombre. Exemple pris sur la variété Trémie dont le grain a été produit dans deux conditions thermiques

## Résultats des essais multi-locaux

Un essai multi-local de la trentaine de cultivars préalablement choisis pour offrir une grande diversité de composition du grain a été implanté deux années consécutives en plusieurs lieux en France. Cet essai a permis de préciser l'importance des effets génétiques et environnementaux sur les caractéristiques du grain ayant une influence sur les rendements en glucose et éthanol, (Tableau 1). Les variables prises en compte : Poids de mille grains, poids spécifique, Teneur en protéines, diversité des protéines de réserve, dureté de l'albumen, viscosité des pentosanes, distribution des tailles de granules d'amidon, rendement en glucose et éthanol ont révélé une grande hétérogénéité génétique car les cultivars furent fournis par les différents membres du CETAC et de l'INRA Ces essais ont montré que:

- des rendements élevés en glucose et éthanol pouvaient être atteints: Les valeurs de-glucose libéré sont comprises entre 640 et 770 kg/T de MS
  - Les variétés expérimentées eurent un rendement moyen en éthanol de 441 Lt MS à 473 Lt MS.
  - La moyenne de tous les blés testés fut aux alentours de 453,5 Lt/MS. Ce rendement en éthanol est bien supérieur aux 350 Lt couramment rapportés par les industriels pour le blé tendre.
  - l'héritabilité des caractères rendement en glucose et en éthanol était faible. Les effets lieux et année de culture sur ces deux caractères sont très significatifs (Tableau 1)
  - des différences significatives existaient entre variétés pour ces deux critères, exprimés par tonne de blé et a fortiori par hectare (Figure 3).
- Les essais ont confirmé l'importance de la quantité d'amidon (corrélée négativement à la teneur en protéines) dans les rendements en glucose et en éthanol par tonne de MS. Le rendement en glucose influence significativement la production d'éthanol par t/MS et par ha. Plusieurs variables de composition du grain ont été révélées associées aux rendements en glucose et en éthanol. Une réflexion a été conduite sur la signification de ces variables dans le processus de production d'éthanol et sur leur utilisation en sélection.
- Huit lignées isogéniques waxy de trois variétés françaises ont été implantées dans un essai multi-local. L'analyse de variance a montré des effets (génétiques et lieux de culture) similaires à ceux observés lors des deux premiers essais multi-locaux. Les lignées dépourvues d'amylose ont produit un peu moins de glucose et d'éthanol que les variétés normales.

Tableau1: Analyse de variance réalisée sur les caractéristiques technologiques des variétés françaises implantées les trois années. En Italique : les degrés de liberté, H<sup>2</sup> : héritabilité

| Effet            | F        | F Anale  | F Locus (Année) | F Trait  | F Var x Trait | R <sup>2</sup> modifié | H <sup>2</sup> |
|------------------|----------|----------|-----------------|----------|---------------|------------------------|----------------|
| MS               | 32       | 32       | 32              | 32       | 32            | 0,296                  | 0,19           |
| PMG              | 48,93*** | 20,99*** | 95,82***        | 1,4*     | 0,38*         | 0,296                  | 0,19           |
| PS               | 20,78**  | 540,13** | 94,49**         | 1,96*    | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Protéines        | 23,22*** | 28**     | 40,89**         | 1,2*     | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Viscosité        | 11,08**  | 11,90**  | 23,73**         | 73,42*** | 0,79*         | 0,296                  | 0,19           |
| Dureté           | 13,02**  | 47,29**  | 9,73**          | 10,22**  | 0,86*         | 0,296                  | 0,19           |
| Type A           | 21,98**  | 497,31** | 2,89*           | 0,00*    | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Type B           | 22,02**  | 410,13** | 3,12*           | 0,05*    | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Type C           | 10,98**  | 17,92**  | 17,32**         | 0,00*    | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Var. Trait       | 127,21** | 29**     | 10,21*          | 5,69**   | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Var. Année       | 13,7*    | 9,52*    | 20,99**         | 3,72*    | 0,26*         | 0,296                  | 0,19           |
| Ré. Glucose Et   | 47**     | 12,99**  | 14,74**         | 6,30**   | 1,57**        | 0,296                  | 0,19           |
| Ré. Ethanol Et   | 2,04**   | 30,95**  | 7,29**          | 11,70**  | 1,95**        | 0,296                  | 0,19           |
| Ré. Glucose      | 4,98**   | 107,28** | 116,27**        | 0,20**   | 0,57**        | 0,296                  | 0,19           |
| Ré. Ethanol      | 3,91**   | 11,90**  | 106,80**        | 0,22**   | 0,54**        | 0,296                  | 0,19           |
| Ré. Glucose x Ha | 3,91**   | 11,90**  | 106,80**        | 0,22**   | 0,54**        | 0,296                  | 0,19           |
| Ré. Ethanol x Ha | 1,59**   | 11,90**  | 106,80**        | 0,22**   | 0,54**        | 0,296                  | 0,19           |

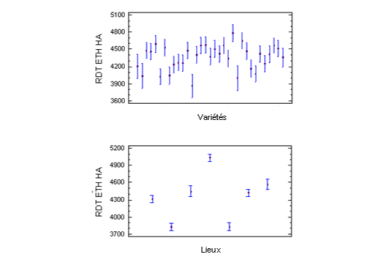


Figure 3: Représentation des amplitudes de variation pour le rendement en éthanol par Ha des moyennes variétales et des moyennes dans les 7 lieux. Barres verticales : écart-type

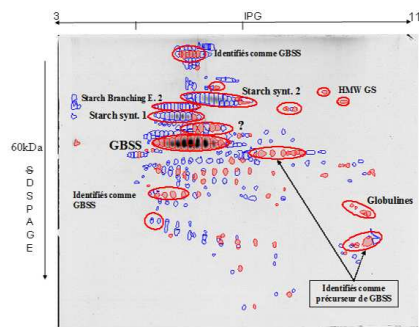


Figure 4 : Electrophorèse bidimensionnelle des protéines, associées aux granules d'amidon, qui furent révélées variant significativement (ici en rouge) entre la variété normale Trémie et les 7 autres formes isogéniques waxy ou partiellement waxy.

## Résultats de l'analyse protéomique des lignées isogéniques waxy

L'introduction d'un allèle nul (non codant) à chacun des gènes Wx-A1, Wx-B1 et Wx-D1 dans un même fond génétique fait disparaître les Granules Binding Starch Synthases (GBSS); enzymes impliquées dans la synthèse de l'amylase (polymère linéaire de glucose). Dans le cadre de la thèse CIFRE, (développée par Clément Debiton sur ce projet), le protéome des grains des lignées isogéniques de Trémie, qui possèdent un, deux ou trois allèles Wx nuls, a été étudié pour connaître la réponse du génome à la présence de ces allèles. Les protéines de l'albumen (albumines et globulines ainsi que les protéines amphiphiles) ont été étudiées par une approche protéomique. Cette démarche analytique a mis en évidence des variations quantitatives des enzymes en réponse à la présence des trois allèles nuls. La sucrose synthase ainsi que la fructose 1,6 biphosphate aldolase sont significativement augmentées. En revanche l'ADP glucose pyrophosphorylase (première enzyme impliquée dans la synthèse de l'amidon) est significativement diminuée. Ces résultats expliqueraient l'abondance de saccharose dans les blés waxy et leur quantité parfois moins élevée en amidon (PMG diminué 3,6% chez Trémie waxy). L'analyse des protéines internes aux granules d'amidon a été également conduite. Ainsi sur les 352 spots protéiques révélés, 86 ont varié entre les lignées isogéniques (Figure 4). On observe une relation étroite entre la quantité de ces GBSS et celle de l'amylase synthétisée dans le grain. On constate que chacun des gènes Wx-A1 et Wx-B1 et Wx-D1 ne contribue pas de façon équivalente à la production d'amylase et que l'additivité des effets n'est pas respectée [1]. De nombreuses autres enzymes varient; outre celles impliquées dans le métabolisme des sucres et de l'amidon, on observe aussi des variations significatives pour les protéines de stress et de défense [2]. Ces observations suggèrent un développement du grain incomplet pour la lignée dépourvue d'amylase.

## Conclusion

Bien que les blés expérimentés dans le réseau d'essai de ce projet aient été choisis comme relativement bien adaptés à la production d'éthanol, l'étude a fait ressortir des caractéristiques génétiques du grain qui permettent d'orienter la sélection pour cet objectif. La mise au point d'un protocole d'analyse des rendements en glucose et de son hydrolyse en éthanol ainsi que l'identification des caractéristiques du grain associées à cette transformation feront l'objet d'une publication à paraître après le délai de confidentialité du projet FSOV. Les analyses protéomiques des protéines de l'albumen (albumines, globulines et amphiphiles) ainsi que des protéines associées aux granules d'amidon ont fait l'objet de deux publications référencées ci-dessous. Ce projet FSOV a apporté des connaissances sur la génétique de l'amidon du blé et permet de dégager les caractéristiques optimales à rechercher dans un génotype pour obtenir une variété à haut rendement en éthanol.

## References

- [1] Clément Debiton, Emmanuelle Bancel, Christophe Chambon, Larbi Rhazi and Gérard Branlard Effect of the three waxy null alleles on enzymes associated to wheat starch granules using proteomic approach. Journal of Cereal Science 2010 52, 466-474.
- [2] Clément Debiton, Marielle Merlino, Christophe Chambon, Emmanuelle Bancel, Mélanie Decourleix, Véronique Planhot and Gérard Branlard. Analyses of albumins, globulins and amphiphilic proteins by proteomic approach give new insights on waxy wheat starch metabolism. Journal of Cereal Science 2010, accepté pour publication.