



Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains

Gerard G. Branlard, Estelle Pujos-Guillot, Isabelle Nadaud, Emmanuelle Bancel, Agnès Piquet

► To cite this version:

Gerard G. Branlard, Estelle Pujos-Guillot, Isabelle Nadaud, Emmanuelle Bancel, Agnès Piquet. Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains. Innovations Agronomiques, 2012, 19, pp.37-49. hal-00964459

HAL Id: hal-00964459

<https://hal.science/hal-00964459>

Submitted on 29 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Nouveaux outils pour une analyse fine de la composition des grains

Branlard G.¹, Pujos E.², Nadaud I.¹, Bancel E.¹, Piquet A.³

1 INRA UMR1095 GDEC-UBP F 63100 Clermont Ferrand, France

2 INRA Plateforme exploration du métabolome F 63122 Saint Genès Champanelle, France

3 INRA UMR1095 - VetagroSup, F 63370 Lempdes, France

E mail : branlard@clermont.inra.fr

Résumé

La sélection s'est intéressée à l'amélioration de l'aptitude technologique des blés pour les rendre aptes à répondre à un usage donné (panification, biscuiterie, etc.). Ce progrès fut accompli au cours des trois dernières décennies. L'augmentation de la productivité des blés doit s'accompagner d'une amélioration de la composition nutritionnelle, notamment pour satisfaire la demande des consommateurs. L'analyse de la composition des blés en micronutriments et vitamines était jusqu'ici réalisée avec des méthodes biochimiques longues et ciblées sur un petit groupe de molécules. Le développement des outils de spectrométrie de masse ouvre la voie à des études pour préciser l'influence agronomique et génétique sur la composition en métabolites du grain et améliorer sa valeur nutritionnelle. L'analyse protéomique de la couche à aleurone, principal réservoir en vitamines et minéraux du grain devrait aider à ce progrès.

Mots clés : blé, métabolites, valeur nutritionnelle, couche à aleurone, protéome

Abstract: New tools for a fine composition analysis of grains

Breeding has focused at improving technological quality to make wheats suitable for a given end use (baking, biscuit, etc.). This progress was achieved during the last three decades. The increase of wheat productivity must be achieved together with improvement of the nutritional composition, particularly to meet consumers demand. Analysis of the composition of wheats in micro-nutrients and vitamins were achieved, up till now, in using lengthy and targeted biochemical methods for a small group of molecules. Development of new mass spectrometry tools paves the way to study on the agronomic and genetic influences of grain composition in metabolites and to improve its nutritional value. Proteomic analysis of the aleurone layer, major reservoir of grain in vitamins and minerals, would help to achieve this progress.

Keywords: wheat, metabolites, nutritional value, aleurone layer, proteome

Introduction

La production du blé dans le monde (650 Mt en 2010) est aujourd'hui devenue un enjeu important pour nourrir l'humanité. Seconde en volume après le maïs, la production de blé ne cesse de croître pour faire face à la demande de sa consommation et aussi parfois pour remplacer le riz dont la culture est exigeante en eau. Les surfaces cultivées en blé (220 Mha) ne peuvent croître indéfiniment d'autant que les conditions agro climatiques et de culture (zone semi-aride, salinité des sols) voire l'extension des zones urbaines sont de réelles limites à sa progression. La génétique et l'agronomie ont jusqu'ici largement contribué à faire progresser la productivité et la valeur d'utilisation du blé. Au cours du XX^{ème} siècle, les rendements moyens en France ont plus que triplé (de moins de 20 q à plus de 72 q/ha) et la

qualité des blés s'est aussi considérablement améliorée. En effet, les blés inscrits en France au cours de ce siècle ont donné une pâte à pain dont la force (énergie nécessaire à la déformation alvéolaire d'un pâton soumis à une poussée gazeuse) mesurée à l'alvéographe Chopin est passée de 60 à plus de 180.10⁻⁴J. La sélection pour l'amélioration de la qualité des blés a répondu aux évolutions technologiques des industries de cuisson et plus particulièrement de la boulangerie qui ont demandé des pâtes plus fermes, extensibles et capables d'avoir une excellente tenue au cours du gonflement lors de la cuisson. Ces exigences ont été satisfaites grâce à un effort d'analyse génétique et biochimique des protéines du gluten (gliadines et gluténines) ainsi qu'à la prise en compte d'autres facteurs associés à la valeur d'utilisation telles que la dureté de l'albumen et la teneur en fibres solubles comme les arabinoxylanes (Saulnier *et al.*, 2007). Ces efforts ont répondu aux attentes car si l'obtention d'un bon blé panifiable était un pur hasard jusque dans les années 70, près de 80% des nouvelles variétés sont aujourd'hui inscrites dans la catégorie des blés panifiables supérieurs.

Cependant, l'aptitude pour un blé à répondre aux critères technologiques (principalement ceux de la panification biscuiterie et biscotterie) correspond aujourd'hui à un progrès réel mais qui se doit également de répondre à la demande sociétale. Qu'en est-il en effet de la valeur nutritionnelle et santé des blés, exigences mises en avant par le PNNS (programme national nutrition santé) et largement étudiées dans la cadre du programme européen Healthgrain ?

1. Bref rappel sur les bases nutritionnelles et santé du blé.

Rappelons d'emblée que la valeur santé d'un aliment ne peut se ramener à sa composition nutritionnelle car les études épidémiologiques donnent des corrélations et non des causalités. De nombreux facteurs tels que les interactions entre nutriments, l'effet de la matrice de l'aliment, sa composition, la quantité consommée, le mode de vie etc., contribuent à confondre les effets que l'on cherche à mettre en évidence. Cependant, pour avancer sur la valeur nutritionnelle et santé, il est nécessaire de mieux connaître la variabilité qualitative et quantitative des micronutriments du grain de blé qui rentre dans notre alimentation quotidienne.

Les trois parties principales du grain de blé, albumen, enveloppes et germe, représentent respectivement environ 80%, 12% et 2.5% du poids du grain. L'amidon et les protéines de l'albumen (environ 70% et 10% du poids du grain) constituent la partie essentielle de la farine utilisée en panification. Les enveloppes, tissus de l'ovaire constitués de l'épiderme, des cellules tubulaires et croisées, de la testa, de la couche hyaline ainsi que de la couche à aleurone, forment le son. Cette couche à aleurone est quant à elle formée d'une monocouche cellulaire issue de la double fécondation : fusion du noyau diploïde femelle avec l'anthérozoïde mâle. Ce dernier ainsi que le germe sont généralement exclus de la préparation des farines de type 55 et 65 utilisées en consommation courante et en panification. Le son et le germe sont connus pour renfermer la majorité des substances nutritionnelles ou bioactives telles que les fibres partiellement solubles (les arabinoxylanes), les minéraux (notamment Fe, Mg, Se, Zn, P), des antioxydants (notamment acide phytique, acides phénoliques, anthocyanes, caroténoïdes, lignanes phyto-estrogènes), les vitamines du groupe B et E etc. De nombreuses études épidémiologiques ont été conduites sur les personnes consommant des produits à base de grain entier ou de farines enrichies en nutriments présents dans le son. Elles révèlent un effet significatif sur la réduction de l'indice glycémique (basé sur la mesure du taux de sucre dans le sang), l'obésité, les diabètes de type 2, les risques cardiovasculaires et certains cancers. Les fibres principalement insolubles, présentes dans le son, favorisent le transit intestinal et la production d'acide butyrique (effet prébiotique acidifiant) associé à une réduction du cancer du côlon. Une remarquable synthèse des études (1000 références) sur l'incidence des constituants du grain et en particulier des fibres sur la santé a été réalisée par Fardet en 2010. Les caroténoïdes, les acides phénoliques, l'acide phytique, des flavonoïdes, la vitamine E, des acides gras insaturés, des lignanes phyto-estrogènes furent révélés comme ayant potentiellement un effet réprimant la croissance de

tumeurs. Plusieurs minéraux principalement présents dans la couche à aleurone tels que Mg, Zn, Cu et Fe sont des cofacteurs d'enzymes anti-oxydantes pouvant protéger l'organisme du stress oxydatif.

Des procédés de mouture et d'enrichissement de la farine incluant la mise au point de marqueurs spécifiques des tissus du grain ont été recherchés notamment dans le cadre du programme Healthgrain (Hemery *et al.*, 2007). Ce programme à partir de 150 blés d'origine très diversifiée et cultivés en un seul lieu révéla une amplitude de variation phénotypique importante pour plusieurs de ces composés nutritionnels du grain (cf article de G Charmet dans la présente revue). Un sous-ensemble de 26 blés cultivés en quatre lieux montra que l'héritabilité des teneurs en tocots, stérols et alkylrésorcinols pouvait être relativement élevée (0,50 à 0,76) et confirma la forte héritabilité (rapport de la variance génétique sur la variance phénotypique) des arabinoxylanes (Martinant *et al.*, 1999). La teneur en ces composés peut donc faire l'objet d'une amélioration génétique sinon d'un contrôle par un suivi dans les programmes de sélection, d'autant que leur variation ne fut pas significativement associée à l'amélioration des performances agronomiques et technologiques des variétés récentes (Shewry *et al.*, 2010, 2011). Une analyse de ces nombreux métabolites du grain de blé est-elle applicable en sélection ?

Les mesures quantitatives de ces constituants se sont jusqu'ici largement appuyées sur des techniques de dosage spécifique à chacun d'eux (colorimétrie, spectrophotométrie, chromatographie) qui sont pour certaines longues et coûteuses. Le développement des outils de spectrométrie de masse et la constitution de bases de données et des logiciels de traitement des informations spectrales ouvrent aujourd'hui la voie à une approche plus globale de la composition en métabolites du grain. Nous verrons ci-dessous que des usages en sélection sont possibles.

2-L'analyse métabolomique chez les plantes.

2.1 Quelques définitions

Le métabolome d'une plante, d'un organe ou d'un tissu de celle-ci, est constitué de l'ensemble des molécules d'un poids moléculaire généralement inférieur à 1500Da (Hall, 2011).

La métabolomique est définie comme la mesure quantitative des réponses métaboliques multivariées de cellules, tissus, ou d'un organisme à un stimulus physiopathologique ou environnemental, ou à une modification génétique (Nicholson, 1999).

L'empreinte métabolomique va consister à obtenir par des techniques analytiques à haut débit une caractérisation de l'ensemble des métabolites sur de nombreux échantillons dont les différences seront mises en évidence relativement à un témoin par des analyses statistiques uni et multivariées. L'identification des métabolites discriminants (par exemple échantillon traité / témoin) est réalisée lors d'une seconde étape.

Le profil métabolomique a pour objet de donner une quantification d'un ensemble de métabolites identifiés, généralement issus d'un seul extrait.

Les métabolites primaires comprennent tous ceux formés lors des processus anaboliques et cataboliques associés à l'assimilation, la respiration, le transport et la différenciation cellulaire ou d'un organe. Les métabolites seront dits secondaires s'ils ne sont pas directement impliqués dans les fonctions de croissance et de développement. Ils sont souvent produits dans des cellules spécialisées (Fernie et Schauer, 2008).

2.2 Les principales technologies d'analyse du métabolome

Contrairement aux autres approches «omiques» que sont la génomique (avec l'ADN) la transcriptomique (ARN) et la protéomique (protéines), la métabolomique s'adresse à une très grande

diversité de molécules à la fois dans leurs propriétés physico-chimiques et dans l'étendue de leur variation quantitative. Cette diversité des métabolites constitue aujourd'hui encore un challenge pour en obtenir une identification et une quantification la plus complète.

L'extraction. Si un composé n'est pas extrait de l'échantillon, il ne pourra bien évidemment pas être identifié et dosé. L'optimisation d'une procédure d'extraction des métabolites, d'un organe donné, est une première démarche fondamentale. Selon le groupe de molécules plus particulièrement recherchées, sont souvent retenus comme solvant l'eau et l'alcool (ou leur mélange) pour les composés polaires et semi polaires et le chloroforme pour les composés lipophiles. Les mélanges méthanol-eau-chloroforme sont souvent utilisés pour une large gamme de composés hydrophiles et hydrophobes. Des procédures ont été décrites pour l'extraction des métabolites des plantes (Hardy et Hall, 2011).

La séparation. La chromatographie en phase gazeuse ou liquide (respectivement GC et LC) a été le moyen classiquement utilisé pour séparer les différents groupes de molécules. L'HPLC, l'UPLC (respectivement, chromatographie liquide à haute pression et ultra performante) et l'électrophorèse capillaire (Soga, 2007) sont aujourd'hui choisies pour leur pouvoir de résolution, leur reproductibilité et spécificité.

La détection. Les analyses métabolomiques font appel à des techniques de détection en constante évolution. Les plus couramment employées mettent en œuvre un spectromètre de masse (MS) pour détecter les molécules séparées par chromatographie (GC-MS et LC-MS). Une présentation des combinaisons techniques de séparation et de détection les plus récemment adaptées aux métabolites des plantes est donnée dans l'ouvrage de Hardy et Hall (2011). La résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse constituent les deux équipements les plus largement utilisés en analyse métabolomique. La RMN nécessite une légère préparation de l'échantillon, c'est une mesure non destructive et quantitative. Une comparaison succincte des principales techniques de séparation et détection, mises en œuvre dans l'approche métabolomique, est donnée au Tableau 1. Les nouveaux spectromètres de masse Orbitrap™ et FT-ICR-MS offrent des possibilités analytiques inégalées pour l'étude du métabolome. La précision P, qui indique l'incertitude de la mesure, est très grande pour ce type d'appareils pouvant ainsi déceler de très faibles différences de masse.

Le traitement des données. Les outils bioinformatiques spécifiques sont nécessaires pour convertir les données brutes issues de la détection (Figure 1), en données intégrées, visualisées et apportant une information biologique (Redestig *et al.*, 2011). Le traitement des données comprend classiquement plusieurs étapes telles que l'élimination des bruits de fond, l'alignement des pics, la détection et la déconvolution des pics, l'identification relativement à un standard et/ou une base de données, la quantification. Cette dernière est généralement semi-quantitative car relative aux amplitudes des pics d'un ensemble de molécules standard. Des logiciels ont été proposés pour le traitement des données comme par exemple XCMS (Benton *et al.* 2008 ; Smith *et al.* 2006), TagFinder (Luedemann *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Les principales approches métabolomiques

Technologie	Avantages	Inconvénients	Précision (P) et amplitude des masses (AM)	Applications
RMN Résonnance Magnétique Nucléaire	Non destructive Mesure quantitative rapide Préparation simple de l'échantillon Mesure sur liquide ou solide	Instrument coûteux Sensibilité moyenne Requière une quantité d'échantillon liquide assez grande (0.5 ml)	AM ~ 50kDa	Analyses des métabolites les plus abondants et couvrant une large gamme de masse
GC-MS Chromatographie Gazeuse Spectrométrie de Masse	Relativement peu coûteuse Mesure quantitative si standard disponible Bonne sensibilité Détecte la plupart des composés organiques	Destructive Non adapté aux composés thermo labiles Préparation échantillon longue nécessitant souvent une étape de dérivation chimique : temps de mesure long (20-50 min)	P < 50 ppm AM < 350Da	Analyses de composés polaires et lipophiles (sucres, acides organiques, tocophérols, vitamines)
LC-MS Chromatographie Liquide et Spectrométrie de Masse	Technologie évolutive Bonne sensibilité Faible masse (mg) d'échantillon Injection directe possible pour mesure rapide	Destructive Des limites dans la quantification Instrument coûteux Préparation échantillon : séparation et temps de mesure long (20-50 min)	P < 50 ppm AM < 1500Da	Analyses des principaux métabolites secondaires (caroténoïdes, flavonoïdes, glucosinolates, vitamines)
FT-ICR-MS Transformée de Fourier Résonnance cyclotronique des ions Spectrométrie de Masse LTO-Orbitrap™ Triple Quadripôle en Ligne	Technologie à très haute résolution Faible masse (mg) d'échantillon. Injection directe possible pour mesure rapide Identification de métabolites inconnu par mesure du m/z (masse, charge de l'ion)	Destructive Instrument coûteux	P < 1 ppm AM < 1500Da	Analyses précises d'un grand nombre de métabolites Identification et quantification possibles

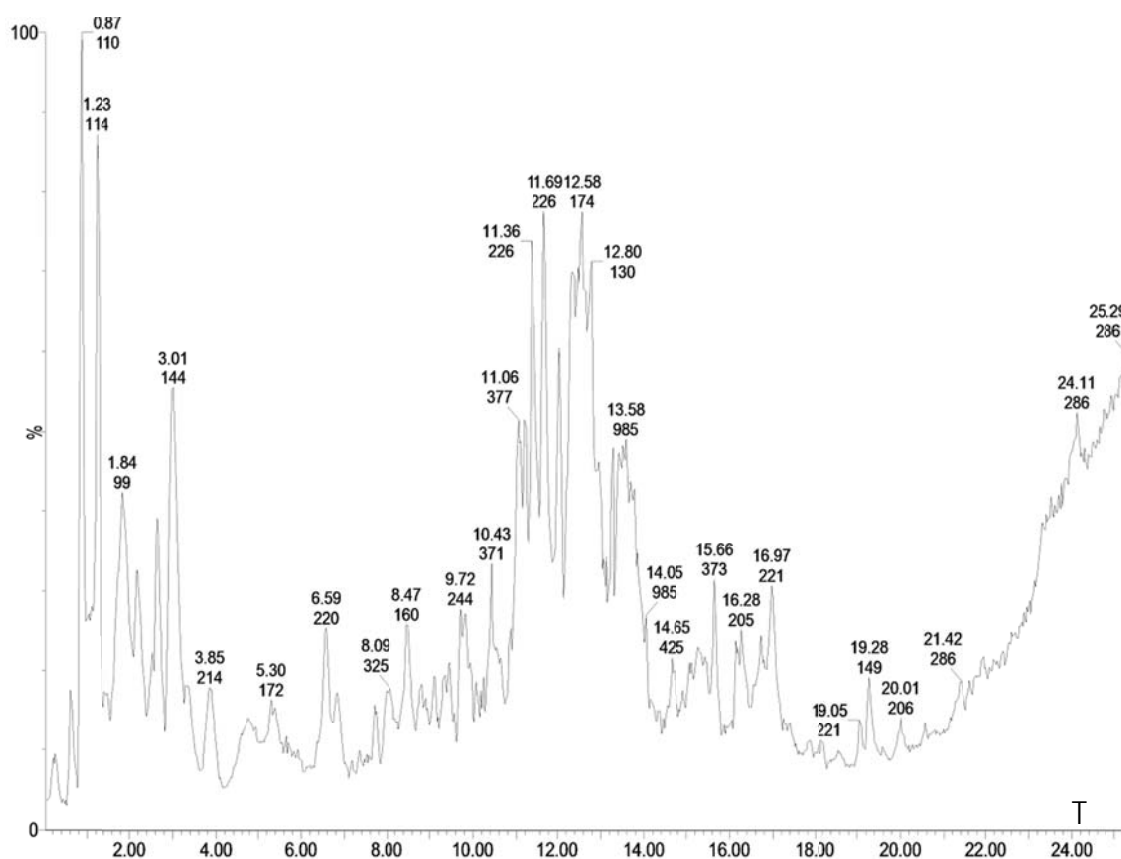


Figure 1 : Exemple de profil métabolique obtenu par spectrométrie de masse d'un extrait de métabolites d'une farine de blé tendre.

On ne dispose pas aujourd'hui d'un outil donnant automatiquement après injection de l'échantillon la liste de ses métabolites identifiés et leur quantité respective. Cependant, les progrès récents sont importants et permettent d'envisager l'analyse de séries d'échantillons et de disposer des données qualitatives et semi quantitatives sur un nombre déjà élevé de molécules.

2.3. Utilisations de l'analyse métabolomique sur les plantes

On ne peut être exhaustif quant aux utilisations potentielles de l'analyse des métabolites sur les plantes. Rappelons que la qualité nutritionnelle de l'alimentation humaine tient compte de la composition des plantes (minéraux, oligo éléments, fibres, hydrates de carbones, lipides, polyphénols, vitamines, etc...). La composition en métabolites des végétaux rentrant dans notre alimentation résulte de l'expression de milliers de gènes des espèces cultivées dans un environnement généralement non maîtrisé. Bien que de grands progrès résulteront de l'usage des séquenceurs de nouvelle génération (Varshney *et al.*, 2009) donnant les informations sur l'identification et la quantification des séquences transcrites (séquences d'ARN résultant de la transcription des gènes), il reste qu'une majorité des protéines du métabolisme cellulaire subit des modifications post traductionnelles (par exemple phosphorylation, méthylation, glycosylation etc.), des influences physico-chimiques aboutissant à des fonctions et des métabolites non encore associés à l'analyse de ces transcrits. Un large domaine de connaissance de génétique métabolique s'ouvre au biologiste soucieux de relier le génotype au phénotype où notamment les interactions entre gènes ainsi qu'entre gènes et métabolites doivent être révélées. L'analyse métabolomique permettra de mieux connaître la composition et les teneurs en lignanes, en de nombreux antioxydants, acides aminés essentiels, en lipides complexes, en vitamines pour lesquels

les sélectionneurs pourront progressivement aborder la sélection mais aussi les technologues par un meilleur suivi de l'incidence des techniques de transformation sur la composition des aliments.

L'approche métabolomique a bien évidemment été conduite sur la plante modèle la mieux connue *Arabidopsis thaliana*. Le base AraCyc <http://www.arabidopsis.org/biocyc/introduction.jsp> est aujourd'hui le site le plus complet et le plus utilisé en métabolomique des plantes. Il contient plus de 2500 métabolites, 5500 enzymes et 350 voies métaboliques. Une collection de nombreux mutants d'*A. thaliana* affectant sa physiologie cellulaire et son développement ont été analysés révélant de nombreuses modifications métaboliques (Beale et Susman, 2011). Plusieurs autres espèces ont bénéficié des avancées sur cette plante modèle. Sur des lignées de tomate cultivées sur plusieurs années, Schauer *et al.* (2008) ont trouvé 889 QTL (Quantitative trait loci) significativement associés à l'accumulation de 74 métabolites analysés par GC-MS. L'héritabilité (rapport de la variance génétique sur la variance phénotypique) moyenne des QTLs des métabolites allait de 0,20 à 0,35. L'association entre des zones cartographiées du génome et le profil de composition métabolomique a été abordée pour quelques métabolites du grain de maïs (Wilson *et al.*, 2004). Cette génétique d'association pour les métabolites des graines est aujourd'hui entreprise sur plusieurs espèces de grande culture.

3-Quelques résultats d'analyse métabolomique chez le blé

Les composés métaboliques du grain de blé sont classiquement segmentés en deux groupes : les hydrosolubles et les liposolubles. Leur présence et abondance relative dans les différentes parties du grain ont été étudiées souvent par des méthodes d'analyse ciblées. Une synthèse en est donnée par Hemery *et al.* (2007) et le Tableau 2 présente les principaux métabolites du grain dont l'identification et le dosage semi quantitatif sont réalisables par spectrométrie de masse. Des sucres, des acides aminés et des lipides peuvent aussi s'ajouter à cette liste.

3.1 Les hydrosolubles

Les acides phénoliques : Environ 70% sous forme d'acide férulique sont insolubles et liés aux arabinoxylanes et 30% sont solubles. Les formes prédominantes des solubles sont l'acide 2,4 dihydrobenzoïque et l'acide sinapique.

Les lignanes : Ils sont exclusivement présents dans la couche à aleurone. Le principal représentant est le secoisolaricirésinol sous forme diglycosylée (SDG). Contrairement à la graine du lin où les lignanes sont abondants et liés, le SDG du blé serait sous forme libre.

Les flavonoïdes : Ils forment une famille de composés pouvant être estérifiés soit à deux sucres (arabinoses, galactose ou glucose), les apigénines, soit à un sucre : les cyanidines.

Ces flavonoïdes, présents dans le son et l'embryon, seraient responsables, une fois incorporés à la farine, du changement de couleur en fonction du pH (Asenstorfer *et al.*, 2006).

Les vitamines B : Le grain de blé est riche en vitamines du groupe B, principalement dans la couche à aleurone et dans le germe, mais ne possède pas de B12. La 5-formyltétrahydrofolate, très sensible à l'oxydation, est la vitamine B9 majeure du grain (Piironen *et al.*, 2008).

Les phytates : Majoritairement présents dans la couche à aleurone, ils constituent la forme majeure de stockage du phosphore. Ils sont formés d'une molécule de glucose sur laquelle sont branchés jusqu'à 6 groupements phosphates (InsP6), portant chacun deux charges négatives. L'hydrolyse enzymatique (phytase) des InsP6 libère le phosphore et atténue leur rôle antinutritionnel de chélation des cations (Reddy, 2002).

Tableau 2 : Principaux composés phyto-chimiques et vitamines du grain de blé.

Familles chimiques	Localisation						Molécules majoritaires	M (Da)	Ref		
	P.I	P.E	T+C	CA	Emb	Alb					
Acides Phénoliques	**	**	***	***	**	*	Acide férulique (65%)	194.187	1		
							Acide 2,4-dihydroxybenzoïque	154.122			
							Acide Sinapique	224.213			
							Acide Vanillique	168.149			
Alkylrésorcinols			***				C21 : 0 (46%)	404.676	2		
							C19 : 0 (35%)	376.623			
							C23 : 0 (8-10%)	432.730			
							C25 : 0 (4-5%)	460.784			
							C17 : 0 (4-5%)	348.569			
Lignanes				***			Sécoisolaricirésinol Diglycoside	688.723	3		
							Syringarésinol	414.498			
							Isolaricirésinol	360.406	4		
							Laricirésinol	360.406			
							Sécoisolaricirésinol	362.422			
Flavonoides	**			**		Cyanidin-3-glucoside	449.391	5			
Caroténoïdes	**			**	*	Lutéine	568.883	6			
						β-Carotène	536.884				
Tocols				*	***		Tocophérols	α (20%)	430.714	4	
								β	416.687		7
								γ	416.687		
								δ	402.661		
	**			*		Tocotriénols	α	424.667	4		
							β (60%)	410.640			
							γ	410.640			
							δ	398.629			
Vitamine B1				*	***		Thiamine	265.359	8		
Vitamine B2				*	*	*	Riboflavine	377.369			
Vitamine B3				***	*		Niacine	123.111			
Vitamine B5				**	*		Acide Pantothénique	219.237			
Vitamine B6				***	**	*	Pyridoxine	168.172	9		
							Pyridoxal	167.164			
							Pyridoxamine	168.195			
							Pyridoxal 5'-phosphate	247.144			
Vitamine B8				***	*		Biotine	212.248			
Vitamine B9				***	*		5-formyltétrahydrofolate (> 40%)	445.435 + n* 149.122	4		
							5-méthyltetrahydrofolate	459 +n* 149.122		8	
							10-formyltetrahydrofolate	473.445 +n* 149.122			
Phytostérols			*	***	***		Sitostérols (50 à 65 %)	414.715	4		
							Campestérol (15%)	400.688		10	
							Campestanol	402.704			
							Sitostanol	416.731			
Phytates	*	*		***	*		InsP6	647.942	4		
									11		

* Présence, ** concentrée, *** très concentrée ; P.E. : Péricarpe Externe ; P.I. : Péricarpe Interne ; T+C : Testa + Couche hyaline ; CA : Couche Aleurone ; Emb : Embryon ; Alb : Albumen ; M : Masse de la molécule Da : Dalton ; Ref : références 1 : Niström *et al.*, 2007 ; 2 : Landberg *et al.*, 2008 ; 3 : Dinelli *et al.*, 2007 ; 4 : Lampi *et al.*, 2008 ; 5 : Asenstorfer *et al.*, 2007 ; 6 : Hidalgo et Brandelini, 2008 ; 7 : Mpofu *et al.*, 2006 ; 8 : Roje 2007 ; 9 : Piironen *et al.*, 2008 ; 10 : Preedy et Watson 2007 ; 11 : Liu 2007.

3.2 Les liposolubles

Les alkylrésorcinols : Ce sont des marqueurs de la testa (Landberg *et al.*, 2008). Ils sont formés à partir d'un noyau phénolique sur lequel est attachée une chaîne latérale saturée de 15 à 25 carbones. Les principales formes sont celles à C21 et C19.

Les caroténoïdes : Ils forment quatre classes : la lutéine, la zéaxanthine, le β -carotène et le β -cryptoxanthine. La lutéine est la forme majoritaire des caroténoïdes du blé (Leenhardt *et al.*, 2006).

Les tocots : Ces composés antioxydants sont absents dans l'albumen. Ils se divisent en deux groupes les tocophérols et tocotriénols ayant respectivement une chaîne latérale saturée et insaturée. Chacun comprend quatre formes (alpha, beta, gamma et delta) qui semblent ne pas être liées à d'autres molécules (Liu 2007).

Les phytostérols : Ils sont majoritairement présents dans la couche à aleurone et l'embryon. Deux classes existent chez les céréales : les stérols et les stanols. Chacun possède deux formes : les sitostérols et campestérols qui sont les principaux phytostérols du blé et les sitostanols et campestanols, moins abondants (Rozenberg *et al.*, 2003)

Bien évidemment, d'autres composés pourront être identifiés dans les deux extraits, hydrosolubles et liposolubles, au fur et à mesure de l'enrichissement des bases de données des composés. Ces avancées sont rendues possibles grâce notamment aux performances offertes aujourd'hui par le spectromètre de type Orbitrap™.

3.3 Quelques facteurs de variations des métabolites

Les analyses conduites dans le programme Healthgrain (paragraphe 1 ci-dessus) ont montré l'incidence du milieu de culture et du génotype sur les variations quantitatives de nombreux métabolites analysés selon les méthodes conventionnelles. L'usage de la spectrométrie de masse pour l'identification et la quantification de métabolites des plantes a été abordé sur des composés bien ciblés et rarement sur le blé. Les derniers développements tant en spectrométrie de masse que sur les outils d'analyse des bases bioinformatiques qui y sont associées, offrent de nouvelles perspectives de mesure fine de la composition du grain.

Ainsi, à partir d'une expérimentation d'une dizaine de cultivars de blé tendre conduite en 2008 sur trois sites en Auvergne incluant deux modes de production (conventionnel et faibles intrants), plusieurs facteurs de variations ont été observés. Brièvement, il fut constaté que :

- Le mode de production a une incidence sur la composition métabolomique mesurée sur la mouture entière.
- En mode conventionnel la taille du grain peut avoir une incidence sur plusieurs métabolites. Il fut par exemple observé qu'entre les grains <2.3mm et >2.8mm les teneurs en certaines vitamines B n'étaient pas différentes mais celles des alkylrésorcinols, des tocots et de la lutéine étaient significativement diminuées dans les gros grains. Cet effet de dilution, dû au volume du grain, indique qu'il serait possible, au moins pour ces constituants, d'enrichir une mouture complète en réalisant un tri selon la taille.
- Bien évidemment, les mesures effectuées sur les farines de type 65, entières et sur les remoulages, ont confirmé d'amples variations de teneurs en métabolites principalement associées à la présence ou non des couches périphériques du grain.
- Le mode de conservation des farines (-20°C, 6°C, température ambiante) a également une incidence sur l'extraction voire sur la composition en métabolites. Ainsi, à -20°C, les tocots et les caroténoïdes sont mieux conservés.
- Enfin, il fut noté des différences significatives entre cultivars, pour de nombreux métabolites notamment pour les alkylrésorcinols, les lutéines, les phytostérols, les tocots et les vitamines B.

Ces observations indiquent que de nouveaux champs d'amélioration de la valeur nutritionnelle sont possibles, à l'aide de ces outils d'analyse métabolomique, par des approches agronomiques, génétiques et technologiques.

4- L'analyse protéomique des couches périphériques du grain

Dans l'objectif d'approcher la diversité des métabolites d'intérêt associés à la valeur nutritionnelle et santé du blé, l'analyse des transcrits des gènes exprimés à un moment donné est une première étape. Mais elle n'est pas suffisante. En effet, bien que les outils de séquençage offrent de réelles possibilités de suivre l'expression des transcrits, on sait aujourd'hui que leur analyse est insuffisante pour prédire la diversité des protéines qui en sont issues. Le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines présentes dans un tissu à un moment donné, constitue donc les molécules réellement impliquées, par leurs différentes structures et fonctions, dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires. Les méthodes pour l'étude du protéome sont très proches de celles employées en analyse métabolomique. Une fois extraite du tissu, les protéines sont souvent séparées par électrophorèse bidimensionnelle ou par chromatographie, puis fragmentées en peptides par hydrolyse enzymatique avant d'être caractérisées par spectrométrie de masse. Les masses des peptides et leurs séquences partielles sont utilisées pour identifier la protéine par interrogation des bases de données protéiques et nucléiques.

L'analyse du protéome du grain en développement et plus particulièrement celui des couches périphériques est une démarche nécessaire pour étudier leurs fonctions respectives et ainsi d'approcher la diversité des métabolites qui les composent. Les couches périphériques du grain (péricarpe interne, couche hyaline, testa et couche à aleurone) ont été dans leur ensemble étudiées au cours de 15 stades du développement du grain de la variété Récital. Les protéines identifiées permirent de révéler quatre phases principales, de la fécondation à la maturité, et furent classées en 16 fonctions biologiques. Il fut montré que les protéines associées à des fonctions de réponse à des stress ou de défense ainsi que d'autres impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires augmentaient au cours du temps (Tasleem *et al.*, 2011). Dans les enveloppes qui constituent le son, seule la couche à aleurone n'est pas un tissu mort. Cette couche cellulaire vivante peut être isolée du grain et son protéome étudié (Figure 2) (Laubin *et al.*, 2007). Le protéome de cette couche cellulaire riche en micronutriments a été étudié sur trois blés tendres et trois blés durs. Pour une variété donnée cultivée deux années différentes il semble que son protéome soit très stable puisqu'aucune différence qualitative et quantitative n'a été décelée sur près de 1200 spots protéiques révélés. Par contre, de fortes différences inter variétales ont été mises en évidence chez le blé tendre et plus encore dans l'espèce blé dur (Meziani *et al.*, 2012). Ces différences protéomiques sont vraisemblablement associées à des variations de composition en métabolites de la couche à aleurone. Pour identifier les différences génétiques responsables des variations en micronutriments de cette couche, il conviendra donc de développer, en parallèle à l'étude du protéome, une analyse des métabolites présents.

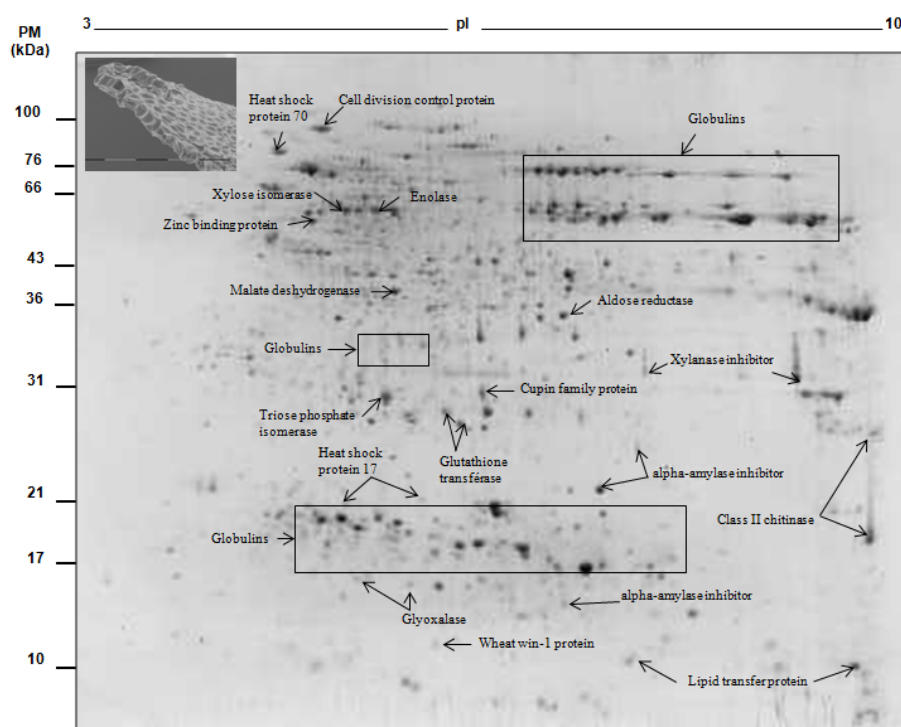


Figure 2 : Electrophorèse bidimensionnelle des protéines extraites de la couche à aleurone vue au microscope électronique à balayage (échelle 100 microns).

Conclusion

Les outils d'analyse des métabolites ont considérablement progressé tant au niveau des équipements que des logiciels pour le traitement des données. Des procédures analytiques se mettent progressivement en place pour extraire, avec une reproductibilité acceptable, de nombreux métabolites identifiants et quantifiables. L'approche métabolomique comme outil d'analyse et d'intégration va progressivement placer le métabolome au centre de la biologie des systèmes, notamment pour avancer dans la connaissance de la composition des organes et fournir des liens (réseaux métaboliques) entre le génotype et le phénotype. La sensibilité de ces appareils devra être poussée à l'analyse de molécules peu abondantes telles que les phytohormones (auxines, gibbérellines, acide abscissique etc.) desquelles dépendent de nombreux changements métaboliques. Sans attendre ces développements fondamentaux, de très nombreuses applications se font jour. Sur les céréales et le blé en particulier, on peut assurer que les opérations de mouture et transformations technologiques seront demain orientées pour garantir une meilleure composition nutritionnelle. La sélection peut s'appuyer sur ces outils pour rechercher les géniteurs, analyser des descendances, identifier des marqueurs associés à plusieurs métabolites d'intérêt nutritionnel. L'agronomie ne sera pas en reste car on sait que les conditions agro-climatiques de production ont une influence sur la composition en métabolites primaires et secondaires.

Références bibliographiques

Asenstorfer R.E., Wang Y., Mares D.J., 2006. Chemical structure of flavonoid compounds in wheat (*Triticum aestivum* L.) flour that contribute to the yellow colour of Asian alkaline noodles. *Journal of Cereal Science* 43, 108-119.

- Beale M.H., Sussman M.R., 2011. Metabolomics of *Arabidopsis thaliana*. In: Hall, R.D. (Eds) Annual of Plants Reviews, Biology of Plant Metabolomics. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 157-180.
- Benton H.P., Wong D.M., Trauger S.A., Siuzdak G., 2008. XCMS2: Processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization. *Analytical Chemistry* 80 (16), 6382-6389.
- Dinelli G., Marotti I., Bosi S., Benedettelli S., Ghiselli L., Cofiacero-Ramirez S., Carrasco-Pancorbo A., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., 2007. Lignan profile in seeds of modern and old Italian soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars as revealed by CE-MS analyses. *Electrophoresis* 28, 4212-4219.
- Fardet A., 2010. New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutrition Reviews* 23, 65-134.
- Fernie A.R., Schauer N., 2008 Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends in Genetics* 25, 39-48.
- Graham S.F., Amigues E., Migaud M., Browne R.A., 2009. Application of NMR based metabolomics for mapping metabolite variation in European wheat. *Metabolomics* 5, 302-306.
- Hardy N.W., Hall, R.D. (Eds), 2011. *Plant Metabolomics Methods*. Humana Press, Ottawa, USA (in press).
- Hemery Y., Rouau X., Lullien-Pellerin V., Barron C., Abecassis J., 2007. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science* 46, 327-347.
- Hall R.D., 2011. Plant metabolomics in a nutshell: potential and future challenges. *Annual Plant Reviews* 43, 1-24.
- Hidalgo A., Brandolini A., 2008. Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) seed fractions. *Food Chemistry* 107, 444-448.
- Lampi A.M., Nurmi T., Ollilainen V., Piironen V., 2008. Tocopherols and Tocotrienols in Wheat Genotypes in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9716-9721.
- Landberg R., Kamal-Eldin A., Salmenkallio-Marttila M., Åman P., 2008. Localization of alkylresorcinols in wheat, rye and barley kernels. *Journal of Cereal Science* 48, 401-406.
- Laubin B., Lullien-Pellerin V., Nadaud I., Gaillard-Martinie B., Chambon C., Branlard G., 2008. Isolation of the wheat aleurone layer for 2D electrophoresis and proteomics analysis. *Journal of Cereal Science* 48, 709-714.
- Leenhardt F., Lyan B., Rock E., Boussard A., Potus J., Chanliaud E., Remesy C., 2006. Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties *Europ. J. Agronomy* 25, 170-176.
- Liu R.H., 2007. Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science* 46, 207-219.
- Luedemann A., Strassburg K., Erban A., Kopka J., 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* 24, 732-737.
- Martinant J-P, Billot A, Bouguennec A, Charmet G, Saulnier L, Branlard G., 1999. Genetic and environmental variations in water-extractable arabinoxylan content and flour extract viscosity. *Journal of Cereal Science* 30, 45-48.
- Meziani S., Nadaud I., Gaillard-Martinie B., Chambon C., Benali M., Branlard G., 2012. Proteomic analysis of the mature kernel aleurone layer in common and durum wheat. *Journal of Cereal Science* doi:10.1016/j.jcs.2012.01.010.
- Mpofu A., Sapirstein H.D., Beta T., 2006. Genotype and Environmental Variation in Phenolic Content, Phenolic Acid Composition, and Antioxidant Activity of Hard Spring Wheat. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1265-1270.
- Nicholson J.K., Lindon L.C., Holmes E., 1999. Metabonomics: understand the metabolic responses of living systems to pathophysiological multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29, 1181-1189.

- Nyström L., Paasonen A., Lampi A.M., Piironen V., 2007. Total plant sterols, steryl ferulates and steryl glycosides in milling fractions of wheat and rye. *Journal of Cereal Science* 45, 106-115.
- Piironen V., Edelmann M., Kariluoto S., Bedö Z., 2008. Folates in Wheat Genotypes in the HEALTHGRAIN Diversity Screen. *J. Agric. Food Chem.* 56 (21), 9726-9731.
- Preedy V.R., Watson R.R., 2007. *The encyclopedia of vitamin E*, CABI Publishing, 960p
- Reddy N.R., 2002. Occurrence, distribution, content and dietary intake of phytate. In: Reddy, N.R., Sathe, S.K. (Eds), *Food Phytates*. CRC Press, Boca Raton, pp. 25-51.
- Redestig H., Szymanski J., Hirai M.Y., Selbig J., Willmitzer L., Nikoloski Z., Saito K., 2011. Data integration, metabolic networks and systems biology. In: Hall, RD (Eds) *Annual Plant Reviews, Biology of Plant Metabolomics*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 261–316.
- Roje S., 2007. Vitamin B biosynthesis in plants. *Phytochemistry* 68, 1904-1921.
- Rozenberg R., Ruibal-Mendieta N.L., Petitjean G., Cani P., Delacroix D.L., Delzenne N.M., Meurens M., Quetin-Leclercq J., Habib-Jiwan J.L., 2003. Phytosterol analysis and characterization in spelt (*Triticum aestivum ssp.spelta* L.) and wheat (*T. aestivum* L.) lipids by LC/APCI-MS. *Journal of Cereal Science* 38, 189-197.
- Saulnier L., Sado, P.E., Branlard G., Charmet G., Guillon F., 2007. Wheat Arabinoxylans: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science* 46, 261-281.
- Schauer N., Semel Y., Balbo I., Steinfath M., Repsilber D., Selbig J., Pleban T., Zamir D., Fernie A.R., 2008. Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *Plant Cell* 20, 1199-1216.
- Shewry P.R., Gebruers K., Andersson A.A.M., Aman P., Piironen V., Lampi A.M., Boros, D., Rakszegi, M., Bedö, Z., Ward J.L., 2011. Analysis of wheat lines from the HEALTHGRAIN Diversity screen shows that intensive plant breeding has not resulted in decreased contents of bioactive components in grain. *J. Agric. Food Chem.* 59, 928-933.
- Shewry P.R., Piironen V., Lampi A.M., Edelmann M., Kariluoto S., Nurmi T., Fernandez-Orozco R., Andersson A.A.M., Aman P., Fras A., Boros D., Gebruers K., Dornez E., Courtin C.M., Delcour J.A., Ravel C., Charmet G., Rakszegi M., Bedö, Z., Ward J.L., 2010. Effects of genotype and environment on the content and composition of phytochemicals and dietary fiber components in rye in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9291-9298.
- Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G., 2006. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry* 78 (3), 779-787.
- Soga T., 2007. Capillary electrophoresis - Mass spectrometry for metabolomics. In: Weckwerth, W. (Eds) *Metabolomics: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, USA. Vol 358, pp. 129-137.
- Tasleem-Tahir A., Nadaud I., Girousse C., Martre P., Marion D., Branlard G., 2011. Proteomic analysis of peripheral layers during wheat (*Triticum aestivum* L.) grain development. *Proteomics* 11, 371–379.
- Varshney R.K., Nayak S.N., May G.D., Jackson S.A., 2009. Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in Biotechnology* 27, 522-530.
- Wilson L.M., Whitt S.R., Ibanez A.M., Rocheford T.R., Goodman M.M., Buckler E.S., 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *Plant Cell* 16, 2719-2733.